

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL ALERJİK ENSEFALOMİYELİT(DAE)
MODELİNDE MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNE SIZAN
LÖKOSİTLERİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMAL ERTOSUN

DENİZLİ, MAYIS - 2018

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



DENEYSEL ALERJİK ENSEFALOMİYELİT(DAE)
MODELİNDE MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNE SIZAN
LÖKOSİTLERİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMAL ERTOSUN

DENİZLİ, MAYIS - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

KEMAL ERTOSUN tarafından hazırlanan “**DENEYSEL ALERJİK ENSEFALOMİYELİT(DAE) MODELİNDE MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNE SIZAN LÖKOSİTLERİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 18.05.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Üye

Doç. Dr. Seda ÖZBAL

Üye

Dr. Öğrt. Üyesi Ergun METE

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/06/2018 tarih ve 23/14.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez alışması PAUBAP tarafından 2017FEBE017 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

KEMAL ERTOSUN



ÖZET

**DENEYSEL ALERJİK ENSEFALOMİYELİT (DAE) MODELİNDE
MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNE SIZAN LÖKOSİTLERİN
BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KEMAL ERTOSUN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, MAYIS - 2018

Multipl skleroz hakkındaki güncel araştırmalar ve bilgiler deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE) modelinden elde edilen verilere dayanmaktadır. Merkezi sinir sistemi içine hücre göçünde rol oynayan belirleyici faktörler anlaşılma çalışmakta, elde edilen verilerle yeni tedaviler geliştirilmektedir. MSS'e lökosit infiltrasyonu, multipl skleroz (MS) gibi hastalıklarda gerçekleşen bir olgudur ve MSS patolojik dejenerasyonlardan sorumludur. Dolayısıyla MSS'e sızan lökosit popülasyonunun analizi MS'in patojenik mekanizmalarının anlaşılmasında ve tedavi amaçla sıklıkla başvurulmaktadır. Bu çalışmada toplam 50 adet 6-8 haftalık C57BL/6 fareler kullanılmış ve hayvanlarda deneysel MS modeli olan DAE MOG₃₅₋₅₅ peptidi ile oluşturulmuştur. Sağlıklı 10 adet fare ile kontrol grubu yapılmıştır. Süreç sonunda farelerin beyin dokuları alınmıştır. Beyin dokularından bağışıklık hücrelerinin etkin bir şekilde izolasyonu için yoğunluk gradientine göre santrifüjle ayrılmıştır. Sağlıklı ve DAE fare beyin lökosit izolasyonu sonunda hücre yüzey molekül ekspresyonu olarak CD45, CD3, Ly6G, Ly6C, CD11b saptanmış ve flow sitometrik yöntemle incelenmiştir. Sonuçta hasta gruplarında CD45^{parlak} Ly6G gruplarında sayısal bir farklılık görülmemesine karşılık, CD3 hastalarda azalma, sağlıklılarla karşılaştırıldığında Ly6C ve CD11b hücre gruplarının anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir. Bulgularımız, MSS'ne lökosit infiltrasyonunun DAE'nin patogeneğinde rol oynadığını ve DAE'nin ilerlemesini izlemek için kullanılabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER:

Deneysel Alerjik Ensefalomyelitis (DAE), Lökosit sızması, Multipl skleroz, Akış Sitometresi

ABSTRACT

**DETERMINATION OF LEUKOCYTES INFILTRATING CENTRAL
NERVOUS SYSTEM IN EXPERIMENTAL ALLERGIC
ENCEPHALOMYELITIS (EAE) MODEL
MSC THESIS
KEMAL ERTOSUN
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, MAY - 2018

Most of the current knowledge and the research on multiple sclerosis is based on data obtained from the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) model. The factors that play a crucial role in cell migration into the central nervous system are being investigated for development of and new treatments. Leukocyte infiltration into the CNS occurs in diseases such as multiple sclerosis (MS) and is responsible for degenerative inflammatory pathologies. Hence, the analysis of leukocyte populations infiltrated into the CNS is a frequent examination for understanding the pathogenic mechanisms of MS and for therapeutic purposes. In this study, a total of 50 C57BL6 mice at the age of 6-8 week were used to develop EAE by subcutaneous injection of the MOG₃₅₋₅₅ peptide in complete Freud's adjuvant. Ten healthy mice of same age and strain were used as a control group. After induction of EAE (3.5 ± 0.5 clinical score) brain tissues were removed. Leucocytes were isolated applying density gradient centrifugation from brain tissues. CD45, CD3, Ly6G, Ly6C, CD11b expressions at cell surfaces were detected using specific antibodies at both control and EAE mice by flow cytometric analysis. The results have shown that there was no statistical difference among the animals in the CD45-bright Ly6G groups, but a significant increase in the CD11b⁺-Ly6C cells in EAE mice compared to healthy groups were observed. Our findings have shown that the leukocyte infiltration into the CNS plays a role in the pathogenesis of EAE and could be used to follow the progression of EAE.

KEYWORDS: Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE), Leukocytes infiltration, Multiple sclerosis (MS), Flow Cytometry

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Multipl skleroz tanımı ve tarihçesi	2
1.1.1 Sıklık ve epidemiyoloji	4
1.1.2 Etiyolojisi	5
1.1.2.1 Genetik	5
1.1.2.2 Çevresel etmenler	5
1.1.2.3 Enfeksiyonlar	6
1.1.2.4 Bağışıklık sistemi	6
1.1.3 Hastalığın klinik seyri	8
1.1.3.1 Ataklı-remisyonlu (RR) MS	8
1.1.3.2 Birincil-ilerleyici (PP) MS	9
1.1.3.3 İkincil-ilerleyici (SP) MS	9
1.1.3.4 Ataklı-ilerleyici (RR) MS	10
1.2 Deneysel alerjik ensefalomiyelit.....	10
1.3 Deneysel alerjik ensefalomiyelit oluşturan antijenler	12
1.4 Multipl skleroz immünopatogeneziindeki hücre grupları	13
1.5 Multipl sklerozda doğal bağışıklık elemanları	16
1.6 Ly-6 antijenleri	17
1.7 CD45 antijeni.....	17
1.8 CD3 antijeni.....	18
1.9 CD11b antijeni.....	18
1.10	
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1 Materyal.....	20
2.1.1 Araştırmada kullanılan cihazlar	20
2.1.2 Araştırmada kullanılan kimyasallar.....	20
2.1.3 Araştırmada kullanılan kitler.....	21
2.1.4 Deney hayvanları	22
2.1.5 Akan hücre ölçer	23
2.1.6 Antikorların bağlanma ve boyanma şekli.....	23
2.2 Yöntem	25
2.2.1 MS modeli (Deneysel Alerjik Ensefalomiyelit-DAE) oluşturulması.....	25
2.2.2 Deney ve kontrol protokolü	26
2.2.3 Dokuların temini	26

2.2.4	Dokuların homojenize edilmesi	26
2.2.5	Dokulardan lökosit izolasyonu ve saflaştırılması.....	26
2.2.6	İstatiksel analiz.....	27
3.	BULGULAR	28
3.1	Deneyisel alerjik ensefalomiyelit oluşturulması	28
3.2	İmmünolojik değerlendirme	29
3.2.1	DAE grubu fare beyinlerinin immün fenotiplemesi.....	30
3.2.2	Kontrol grubu fare beyinlerinin immün fenotiplemesi.....	39
4.	TARTIŞMA.....	52
5.	SONUÇLAR.....	59
6.	KAYNAKLAR.....	60
7.	ÖZGEÇMİŞ	69



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Multipl skleroz haritası.....	4
Şekil 1.2: Lökositlerin doku içine geçişi	7
Şekil 1.3: Ataklı-Remisyonlu (RR) MS	9
Şekil 1.4: Birincil-İlerleyici (PP) MS	9
Şekil 1.5: İkincil-İlerleyici (SP) MS	10
Şekil 1.6: Ataklı-İlerleyici MS	10
Şekil 1.7: DAE oluşumu ve skorlama tablosu.....	11
Şekil 1.8: Myelinin yapısal proteinleri	12
Şekil 1.9: MSS dışında bağışıklık sisteminin düzensizlikleri	15
Şekil 2.1: Farelerin günlük skor ve gözlemlmeleri	22
Şekil 2.2: Direk ve indirek antikor bağlanması.....	24
Şekil 2.3: Erişkin fare beyin immün hücre izolasyonu ve ficoll gradyan şeması	27
Şekil 3.1: Lökosit tipleme için kapılama stratejisi	29
Şekil 3.2: DAE kontrol 1 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	30
Şekil 3.3: DAE kontrol 2 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	31
Şekil 3.4: DAE kontrol 3 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	32
Şekil 3.5: DAE kontrol 4 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	33
Şekil 3.6: DAE kontrol 5 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	34
Şekil 3.7: DAE kontrol 6 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	35
Şekil 3.8: DAE kontrol 7 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	36
Şekil 3.9: DAE kontrol 8 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı	37
Şekil 3.10: DAE kontrol 9 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	38
Şekil 3.11: Sağlıklı kontrol 1 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	39
Şekil 3.12: Sağlıklı kontrol 2 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	40
Şekil 3.13: Sağlıklı kontrol 3 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	41
Şekil 3.14: Sağlıklı kontrol 4 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	42
Şekil 3.15: Sağlıklı kontrol 5 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	43

Şekil 3.16: Sağlıklı kontrol 6 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	44
Şekil 3.17: Sağlıklı kontrol 7 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	45
Şekil 3.18: Sağlıklı kontrol 8 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	46
Şekil 3.19: Sağlıklı kontrol 9 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	47
Şekil 3.20: Sağlıklı kontrol 10 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı.....	48
Şekil 3.21: DAE ve kontrol grubunda ki örneklerin a) CD3+ ve b) CD11b hücre oranlarının karşılaştırılması.....	50
Şekil 3.22: DAE ve kontrol grubunda ki örneklerin a) LyC ^{low} b) LyC ^{high} ve c) LyG hücre oranlarının karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.1: a) DAE grubu CD45 ^{parlak} - CD3+ ortalama değeri, b) Kontrol grubu CD45 ^{parlak} - CD3+ ortalama değeri.....	55
Şekil 4.2: a) DAE grubu CD45 ^{parlak} - Ly6C + ortalama değeri, b) Kontrol grubu CD45 ^{parlak} - Ly6C + ortalama değeri.....	56
Şekil 4.3: a) DAE grubu CD45 ^{parlak} -CD11b+ ortalama değeri, b) Kontrol grubu CD45 ^{parlak} -CD11b+ ortalama değeri.....	57
Şekil 4.4: a) DAE grubu CD45 ^{parlak} - Ly6G + ortalama değeri, b) Kontrol grubu CD45 ^{parlak} - Ly6G + ortalama değeri	58

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: MS' de ayırt edici tanı.....	3
Tablo 1.2: DAE örneklerinin farklı türlerinde ki patolojik özellikleri.....	13
Tablo 2.1: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar.....	21
Tablo 2.2: Florokrom maddelerin renkleri ve dalga boyları.....	24
Tablo 2.3: MS takibinde kullanılan skorlama tablosu.....	25
Tablo 3.1: Skor-zaman grafiği.....	28
Tablo 3.2: Flow sitometri hücre oranları	49



SEMBOL LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APC	: Allofikosiyanin
APC(ASH)	: Antijen sunan hücre
CFA	: Komplet Freund"s adjuvan
DAE	: Deneyisel Alerjik Ensefalomiyelit
DC	: Dendritik hücre
EBV	: Epstein-Barr virüs
FITC	: Flurescein isothiocyanate
GPI	: Glikozilfosfatidilinozitol
HTLV-I	: İnsan T-hücre lenfotropik virüs tip1
IFA	: İnkomplet Freund"s adjuvan
IFN-γ	: İnterferon gama
IL-17	: İnterlökin-17
IL-21	: İnterlökin-21
IL-22	: İnterlökin-22
KBB	: Kan beyin bariyeri
MAG	: Miyelin ilişkili glikoprotein
MBP	: Miyelin basic protein
MHC	: Major histokompatibility kompleks
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MOG35-55	: Miyelin oligodendrosit glikoprotein35-55
MS	: Multipl skleroz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NK	: Doğal öldürücü
PBS	: Fosfat tuzlu serum fizyolojik
PE	: Phycoerytrin
PerCP/Cy5.5	: Peridinin Chlorophyll
PLP	: Proteolipid protein
PMN	: Polimorfonükleer nötrofil
PT	: Pertussis toksin
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TCR	: T hücre reseptörü
Th1	: Yardımcı T hücre 1
Th17	: Yardımcı T hücre 17

ÖNSÖZ

Deneyisel Alerjik Ensefalomyelit (DAE) Modelinde Merkezi Sinir Sistemine Sızan Lökositlerin Belirlenmesi çalışması Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi ve Flow Sitometri Laboratuvarında tamamlanarak yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Daha detaylı şekilde araştırılırsa klinik bulguların tespitinde önemli bir veri bankası oluşturacak bu projeyi destekleyen PAUBAP'a,

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e,

Veteriner hekim Barbaros ŞAHİN ve tüm ekibine,

Laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Gösterdikleri sabırdan dolayı eşim Benay ERTOSUN ve oğlum Abdurrahman Ali ERTOSUN'a teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemine (MSS) lökosit infiltrasyonu, multipl skeroz (MS) gibi hastalıklarda gerçekleşen bir olgudur ve MSS patolojik dejenerasyonlardan sorumludur. Dolayısıyla MSS'ne infiltre eden lökosit popülasyonunun analizi MS'in patojenik mekanizmalarının anlaşılmasında ve tedavi etmenlerinin araştırılmasında sıklıkla başvurulmuş yöntemlerdendir. Her ne kadar MS'i tetikleyen unsurlar bilinmesede, MSS yapılarına karşı gelişen otoreaktif T hücreleri ve antikorların, inflamasyon ve doku hasarının oluşmasında etkin rol aldığı bilinmesine karşılık, makrofajlar, mast hücreleri B lenfosit hücreler ve NK hücrelerinin de etkisi göz ardı edilemez.

Son yıllarda MS modelinde, hastalığın moleküler mekanizmasını anlamada ve klinik bulguları daha detaylı tespit etmede önemli katkı sağlamaktadır.

MSS'ne infiltre eden lökosit tiplmesi çeşitli hastalıklarda kullanılan bir yaklaşımdır ve MS için de dünyada kullanılmaktadır.

Ancak benzer çalışmalar Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde özellikle MS'in modeli olan DAE ile gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmanın amacında MS'in deneysel hayvan modeli olan DAE modelinde, beyne sızan lökosit popülasyonunu tanımlamak üzere gerekli çalışmalar gerçekleştirerek ve moleküler çalışmalara ek derinlik kazandıracak araştırma ve analizlerin yapılması amaçlanmıştır. İmmün aktivasyonda lökositlerin ve alt gruplarının belirlenmesinde beyin homojenize hücreleri kullanılmıştır. Beyne sızan lökositler CD45 antikorı ile tanımlandı. Polimorfonükleer nötrofiller (PMN) Ly6G ekspresyonu ile tanımlanırken, T lenfositleri CD3 antikorı ile tasvir edildi. CD11b fraksiyonu monositleri, Ly6C'ler ile makrofajlar, dendritik hücreler (DC) ve enflamatuvar monositleri kapsayan popülasyon belirlenmiştir.

1.1 Multipl Skleroz Tanımı ve Tarihçesi

Multipl skleroz (MS), genç erişkinlerde görülen, merkezi sinir sistemini (MSS) zayıflatıcı inflamatuvar bir hastalıktır (Lock ve ark., 2002). Multiple skleroz 1868 yılında ilk kez Fransız nöroloji uzmanı Jea-Martin-Charcot tarafından tanımlanmıştır (Murray, 2006).

1916'da Dr Dawson plakların mikroskop ile gösterimi, 1934'de Thomas Rivers otoimmün alerjik ensefalomyelit tablosunun gösterimi, 1981'de ilk defa MRG cihazı ile MS hastası üzerinde görüntüleme yapılmıştır (Miller vd., 2003).

MS in sebebi tam olarak açıklanamasada; çevresel, immünolojik ve genetik faktörlerin neden olduğu düşünülmektedir (Gale CR, 1995).

Multipl Sklerozun ilk başlangıç aşamasında hastalığın çoktürlü yapısı yüzünden Tablo1.1 de gösterildiği gibi bazı hastalıklara benzemektedir.

Genetik Miyelin Hastalıklar	Adrenolökodistrofi Metakromatik lökodistrofi
Enfeksiyon Hastalıklar	Hiv enfeksiyonu HTLV-I Lyme hastalığı Nörosifiliz Progresif multifokal lökoensefalopati
İnflamatuvar Hastalıklar	Sistemik lupus eritematozus Granüloamatöz anjitis Behçet hastalığı Sjögren hastalığı Akut disemine ensefalomiyelopati Paraneoplastik ensefalomiyelopatiler Postinfeksiyöz ensefalomiyelitler Poliarteritis nodosa
Granüloamatöz Hastalıklar	Lenfomatoid granülomatozis Sarkoidoz Wegener granülomatozu
Diğer Hastalıklar	B12 vitamin eksikliği Kraniyovertebral anomaliler Spinocerebellar anomaliler

Tablo 1.1: MS' de ayırt edici tanı

MS'i daha ayrıntılı olarak incelemek için, deneysel otoimmün (alerjik) ensefalomiyelit (DAE) adı verilen bir hayvan modeli oluşturulmuştur (Baxter, 2007).

1.1.1 Sıklık ve Epidemiyolojisi

Multipl skleroz (MS), ağırlıklı olarak yüksek gelirli ülkelerde Kafkas ırkını etkileyen yaygın bir nörodejeneratif hastalıktır ve MS'den mustarip olan insan sayısı son yıllarda artmış ve tüm dünyada 2,5 milyonu aşmıştır (Milo ve Miller, 2014).

MS'in dünyada prevelansı 126/100000, insidansı 6.5/100000 olarak ortalama bildirilmiştir (Melcon ark.,2014). Hastalığın sık görüldüğü Kuzey Avrupa, seyrek görüldüğü bölge ise Asyadır (McAlpine, 2005).

MS ülkeler arasında prevelansı farklılık göstermekle birlikte 40-50 derece enlemler arasında daha sık görülmekte olup kuzey ve güney yarım kürelerde ekvatordan uzaklaştıkça sıklığı artmaktadır (Hauser ark., 2005). Ülkemizde ulusal bir MS epidemiyoloji çalışmamız olmamakla birlikte İstanbul da yapılan çalışmada MS prevelansı 100/100000 bildirilmiştir (Eraksoy ve ark., 2013).



Şekil1.1: Multipl skleroz haritası

MS'de ilk klinik tanının ortaya çıkması 20-40 yaşlar arasındadır. 2-70 yaş gibi erken yada geç dönemde ortaya çıkışı istisnadır. Ailede MS'li olanlar da, beyaz ırkta ve sosyo ekonomik düzeyi yüksek olanlarda ve ılıman-soğuk iklim kuşağında olanlarda daha yüksek görülür. Hastalığın farklı seyir tipleri açısından tek bir oran söz konusu olamamak kaydıyla kadınlar da erkeklere göre görülme sıklığı 2:1 oranındadır (Hauser vd., 2005; Dobson and Giovannoni, 2013; Siva vd., 2014).

1.1.2 Etiyolojisi

Yapılan alışmalar hastalığın etiyolojisi açısından tam olarak bilinmemekle beraber, genetik, çevresel faktörler, enfeksiyonlar ve immün sistemin hastalığı açığa çıkarmakta etikili olduğu düşünülmektedir (Tavşanlı, 2010).

1.1.2.1. Genetik

Hastalığın genetik geçişinde belli bir kalıtım paterni gösterilemediğinden, MS'i "hastalığa yatkın kişilerde çevresel tetikleyici faktörlerle karşılaşıldığında ortaya çıkan, genetik olarak kompleks bir hastalık" olarak tanımlamak uygundur.

Kardeşler ve ikizler üzerinde yürütülen alışmalar MS'e yatkınlıkta genetik faktörlerin etkili olduğunu düşündürmektedir (Tavşanlı, 2010).

MS riski, özellikle ikizlerde, ebeveynlerde ve hasta olanların çocuklarında genel akrabalık popülasyona göre yüksek derecededir (Compston, 2002).

1.1.2.2. Çevresel Etmenler

Multipl skleroz; Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa, Yeni Zelanda ve Güney Avustralya gibi bölgelerde daha sık olmasına karşın, Asya ve tropik bölgelerde daha nadirdir

Sigaranın MS hastalığı için risk artışına neden olduğuna ve MS de kötü prognoz olarak etkilediğine dair kanıtlar vardır. Yüksek sigara içicilerinde bu risk artışı %70 civarında rapor edilmektedir (Ascherio A. vd., 2008).

Çevresel etmenler, çocukluk çağından ileri yaşlara MS gelişiminde etki edebilmektedir. Göçmenler üzerinde yapılan araştırmada; 15 yaşından sonra farklı bölgeye göç eden bireyin kendi ülkesinde ki duyarlılığı koruduğu, 15 yaşından önce yapılan gte ise göçmenin yeni yerleşilen bölgeye yatkınlık kazandığını göstermektedir.

Kanıtları düşük olmakla, ağır stresin de bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (Marrie, R.A., 2004).

Yakın geçmişte stresli yaşam olaylarının MS'in tekrarına ve yeni lezyonlarının gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (Ackerman, K.D., 2002).

Fizyolojik stresin MS semptomlarının %70-80'inde başlangıç ve nükste tetikleyici olduğu öne sürülmektedir (Warren, 1982).

MS ile doğum mevsimi arasında ki bir çalışma D vitamini ve güneş ışığının ilişkisini saptamıştır. Örneğin, Mayıs ayında doğanların Kasım ayında doğanlara göre MS hastalık sayısı fazladır (Ascherio, A.vd., 2008).

1.1.2.3. Enfeksiyonlar

MS patogeneğinde rol oynadığı kanıtlanan mikroorganizma bulunmamakla birlikte muhtemel enfeksiyöz başlatıcısı olarak birçok mikroorganizma öne sürülmektedir (Compston, 2002).

Epstein-Barr virüs (EBV) enfeksiyonunun hangi mekanizmalarla MS riskini arttırdığı tam olarak bilinmemekle birlikte hastalık gelişiminde rolü olduğu ileri sürülmektedir (Cook, 2004).

EBV ile erişkin yaşta enfekte olan bireylerin hastalık riski, daha erken yaşta enfekte olanlara göre daha yüksektir, EBV ile hiç hiç enfekte olmamış bireylerde risk daha düşüktür (Compston 2008; Ascherio 2007).

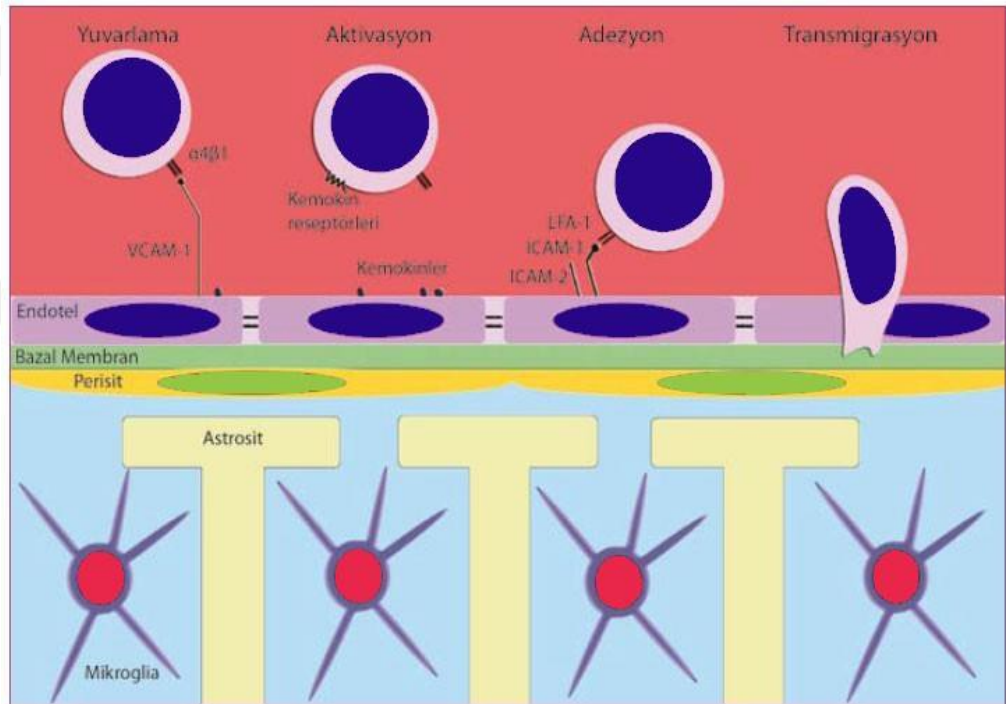
Kabakulak, kızamık ve kızamık MS ile ilişkilendirilen diğer hastalıklardandır (Compston, 2008).

1.1.2.4. Bağışıklık Sistemi

Hastalığın oluşmasında immün sistemin temel rol oynadığına dair birçok bulgu vardır. Merkezi sinir sistemine sızan ve miyelin antijenlerini tanıyan otoreaktif T hücrelerinin, hastalığın oluşmasında birincil derecede etkili olduğu düşünülmektedir (Altıntaş, 2009).

Santral sinir sistemi içine hücre göçünde rol oynayan belirleyici faktörler anlaşılmaya çalışılmakta, elde edilen verilerden yola çıkılarak yeni tedaviler geliştirilmektedir.

Bugünkü bilgilerimiz lökositlerin doku içine geçişinin, farklı adımlarla gerçekleştiğini göstermektedir. Bu adımlarda rol oynayan faktörler sırasıyla; selektinler ve ligandları, kemokinler ve kemokin reseptörleri, integrinler ve hücre adezyon molekülleri, matrix metalloproteinazlar (MMP) ve bunların doku inhibitörleri (TIMP)'dir. Lökosit ve endotel hücresi arasındaki ilk temas "tethering" olarak isimlendirilen bağlanma aşaması olup, ardından "rolling" olarak adlandırılan hücrenin endotel üzerinde yuvarlanması fazı gelir. Lökosit göçünün başlangıç evresindeki bu reaksiyonlarda selektin ve selektin ligandları rol alırlar. Takip eden evrede, kemotaktik faktörler integrinlerin aktivasyonunu tetiklerler. İntegrinlerle, hücre adezyon moleküllerinin etkileşimleri sonucunda, lökositler endotele sıkıca yapışır ve ardından endoteli geçerek migrasyonlarını gerçekleştirirler (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Lökositlerin doku içine geçişi

Aktif demiyelinizasyonun gözlemlendiği MS lezyonlarındaki inflamatuvar infiltrattan izole edilen hücrelerin yaklaşık %10'u T hücresi, geri kalanı ise monosit ve mikrogliyalardan köken alan makrofajlardır (Tavşanlı M. ve Altıntaş A., 2010).

MS'in deneysel hayvan modeli olan DAE'li hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, öz antijenler için spesifik T hücrelerinin hastalığın oluşumunu destekleyen bulgular sağlanmıştır (Fletcher, 2010).

Sağlıklı bireyde kan-beyin bariyerlerinin yapısını oluşturan endotelial hücreler arasında ki sıkı bağlantılar, naif T hücrelerinin MSS ine girişini engellemektedir. Buna karşın aktive T hücrelerinin eksprese ettiği hücre yüzey proteinleri bariyerleri aşmayı ve vasküler duvara yapışmayı sağlamaktadır. Bu neden MS oluşumunda meydana geldiği düşünülen ilk olgu, sağlık bireyle periferik kanda dolaşmakta olan naif T hücrelerinin toleransında ki kırılma sonucu aktive olmasıdır.

Epidemiyolojik ve genetik araştırmalar, MS'in genetik yatkınlığının yanı sıra çevresel faktörlerin etkisiyle muhtemel tolerans kaybı ve miyelin-spesifik T hücre aktivasyonu sonucunda meydana geldiğini göstermektedir (Goverman, 2011).

Hastalığın gelişmesinde T hücrelerin rolü olduğu bilinmekle birlikte kronik gelişiminde NK hücrelerinin de rol aldığı düşünülmektedir (Altıntaş, 2009).

1.1.3 Hastalığın Klinik Seyri

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Multipl Skleroz Derneği tarafından 4 klinik seyir tipi belirlenmiştir (Lublin, 1996).

1.1.3.1 Ataklı-Remisyonlu (RR) MS

MS'in en yaygın tipi olup, nörolojik fonksiyonlarda gerilemeyle sonuçlanan okut enflamatuvar dönemlerle ilişkilidir. Aylar hatta yıllar süren hastalığa ait yeni gözlemlerin izlenmediği sessiz periyotlarda izlenen ve önceden tahmin edilemeyen ataklarla karakterizedir. Uzun dönemde dereceli olarak yeti kaybı görülse de, ataklar arasında hasarların tamamen iyileştiği durumlarda benign MS (iyicil MS) olarak tanımlanmaktadır (Link, 2006).

Hastaların bir kısmı nöksler arasında kısmi yada tam düzelmeler gösterebilmekle birlikte, RR-MS'li hastaların büyük kısmın da nörolojik olarak fonksiyonların kademeli kaybıyla sonuçlanmaktadır ve SP-MS olan daha ilerleyici forma dönüşmektedir (Gandhi, 2010).

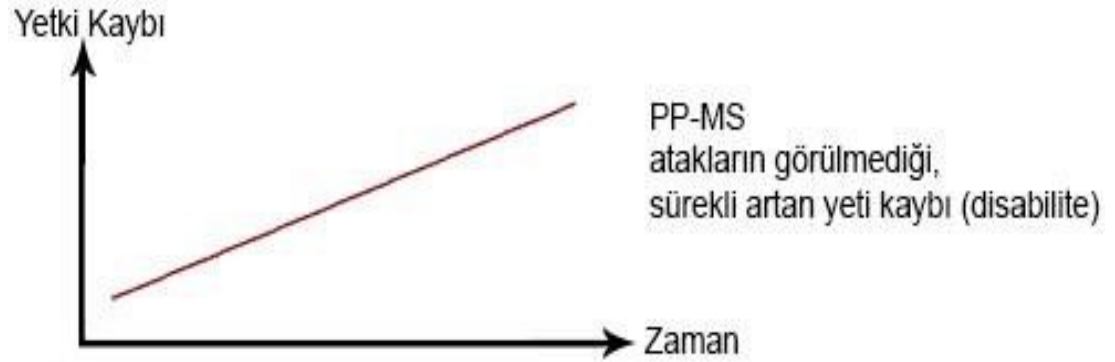


Şekil 1. 3: Ataklı-Remisyonlu (RR) MS

1.1.3.2 Birincil-İlerleyici (PP) MS

Başlangıçta ki hastalık belirtilerinden sonra hiç gerileme göstermeyen hastalar bu sınıfta olup, MS hastalarının yaklaşık %10-15'ini oluştururlar (Feinstein, 2005).

PP-MS hastalarının yaşı RR-MS'ten daha genç olup 40 yaş civarındadır (Compston, 2008).

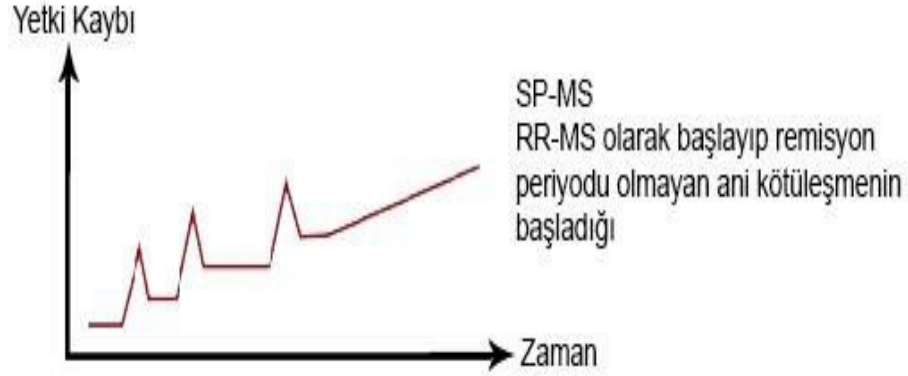


Şekil 1.4: Birincil-İlerleyici (PP) MS

1.1.3.3 İkincil-İlerleyici (SP) MS

Başlangıçta RR-MS hastası olanların yaklaşık %65'i daha sonradan akut ataklar arasında hiçbir kesin gerileme dönemi olmayan ilerleyici nörolojik yeti kaybının görüldüğü SP-MS formuna dönüşür (Lublin, 1996; Compston, 2008).

Hastalık başlangıcı ile RR-MS'ten SP-MS'e dönüşüm ortalama 19 yılda olur (Pittock, 2008).



Şekil 1.5 : İkincil-İlerleyici (SP) MS

1.1.3.4. Ataklı-İlerleyici MS

Hastalığın başlangıcından itibaren nörolojik olarak sürekli gerilemenin görüldüğü ve aynı zamanda üzerine eklenen ataklar ile kendini gösteren MS tipleri içinde en az görülenidir (Pittock, 2008).



Şekil1.6 : Ataklı-İlerleyici MS

1.2 Deneysel alerjik ensefalomyelit

MS'in immünpatogenezin aydınlatılması ve araştırılması açısından farklı deneysel modeller geliştirilmiştir.

Deneyssel otoimmün(alerjik) ensefalomyelit, bu amaç ile kullanılan ve farklı hayvanlarda çeşitli antijenik yapılar ile oluşturulan genel bir tanımlamadır. Hastalığın patogenezinin anlaşılması ve tedavi seçeneklerinin araştırılması amacıyla farklı hayvan türlerinde oluşturulabilmektedir (Mix E, 2008).

Modeli oluşturma temelleri 1888’de Louis Pasteur’un tavşanda kuduz aşısı sonrasında paralizi geliştiğini göstermesiyle atılmıştır (Baxter AG., 2007).

Hayvanlarda otoimmün kökenli paralitik tablo için çoklu enjeksiyonlar gerekirken, 1942’de Freund tarafından bulunan, parafin yağı ve inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* karışımı (Freund adjuvan) uygulanması ile enjeksiyon sayısı azaltılarak DAE geliştirebilmek mümkün olmuştur (Freund J., 1942).

Adjuvan maddeler 80 yılı aşkın süredir immün yanıtı artırmak için aşılarında kullanılan maddelerdir. Daha az antijen ve enjeksiyon uygulanarak immün gelişimini sağlamaktadırlar (Brunner R., 2010).

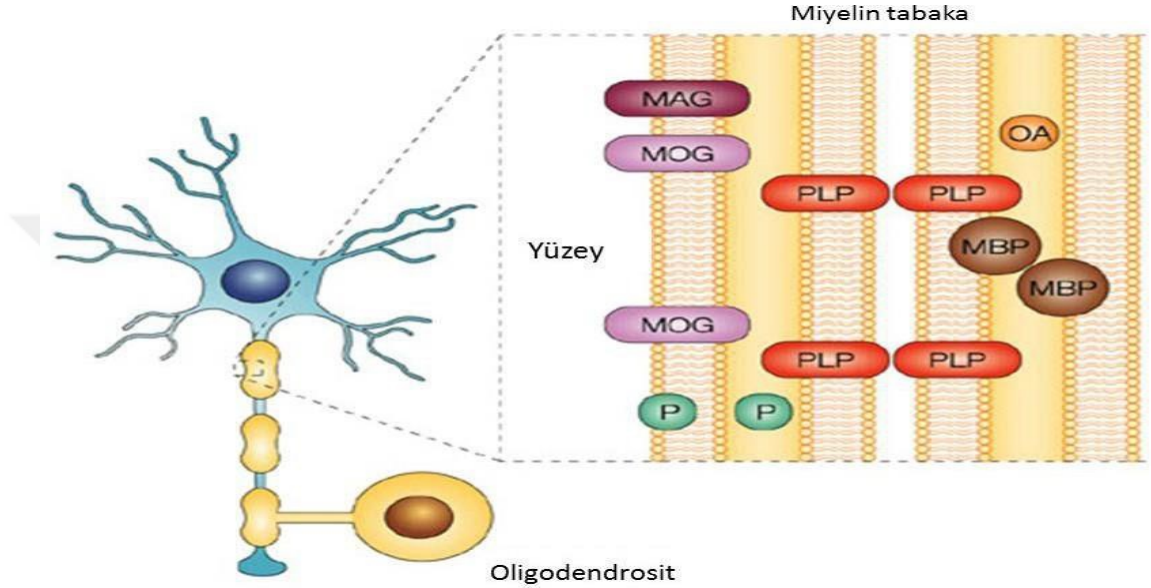
Pertussus toksin (PT) ise DAE’nin daha kolay oluşturulmasını sağlayan adjuvan bir madde olup in vivo olarak glukoz regülasyonunun bozulması, lökositoz, adjuvan aktivite ve kan-doku geçirgenliğinde artış, vazoaaktif ajanlara duyarlılık gibi fizyolojik yanıtlar ortaya çıkarır (Luc, 2008). DAE de MSS’nin farklı antijenik yapılara karşı gelişen otoimmün yanıtın içeriği birbirinden farklı olmaktadır. DAE’de izlenen lezyonların dağılımına ait çeşitlilik MS de farklı alt tiplerin anlaşılmasına yardımcı olabilir (Mix E., 2008).



Şekil 1.7 : DAE oluşumu ve skorelama tablosu

1.3 Deneyisel alerjik ensefalomyelit oluşturan antijenler

Miyelin kılıfındaki bazı proteinlere karşı inflamatuvar cevap oluşabilmektedir (Sriram, 2005). Proteolipid protein (PLP), myelin basic protein (MBP), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG), miyelin associated glikoprotein (MAG) ve S-100 proteinlerine karşı gelişen reaksiyon farelerde immün yanıt ve paralitik hastalığa neden olabilmektedir (Allegretta M, 1990; Hohlfeld R, 1995).



Şekil 1.8 : Myelinin yapısal proteinleri (Hemmer vd., 2002)

Hayvanlarda tekrarlayan, tek fazlı ataklar ile seyirli ya da ilerleyici özellikli olacak şekilde farklı modeller oluşturulabilmektedir. Hayvan modelleri oluşturmada fare, sıçan, köpek, tavşan, domuz, koyun, makak maymunları gibi farklı hayvanlar kullanılabilmektedir (Baxter AG., 2007).

Tür	Patolojik özellikler
Fare	Multipl perivasküler mononükleer inflamasyon odakları, kronik olanlarda demiyelinizasyon içerebilir
Tavşan	Menenjit, grive beyaz cevherde yaygın perivasküler lenfositik infiltratlar, demiyelinizasyon ve mikrogliyal hiperplazi
Sıçan	Perivasküler lenfosit, monosit ve nadiren granülosit infiltrasyonu
Hamster	Perivasküler lenfosit, histiosit, plazma hücresi ve bazen granülom gelişimi, infiltratlarla ilişkili ve izole plaklar halinde demiyelinizasyon.

Tablo 1.2: DAE örneklerinin farklı türlerinde ki patolojik özellikleri (Baxter AG.2007 revize edilmiştir.)

DAE modellerinin miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) antijeni kullanılarak yapılmasıyla, sadece otoimmün T hücre yanıtı değil yatkınlığın olması halinde demiyelinizasyon yapabilecek otoantikor yanıtında indüklendiği görülmüştür.

Bu DAE modeli hem T hem de B hücre aktivasyonunu birlikte sağlayan tek modeldir. MOG antijenine karşı gelişen antikor varlığının demiyelinizasyonun yaygınlığını artırdığı ve klinik bulgulara artışa neden olduğu fare, sıçan ve primat modellerinde gösterilmiştir (Gold R, 2006).

1.4 Multil skleroz immünpatogenezindeki hücre grupları

Hastalığın ilerlemesi, beyin ve omuriliğin içinde aksiyel hasar ve dolayısıyla duyu ve motor bozukluk, ataksi, spastisite, yorgunluk ve kognitif bozukluk gibi klinik semptomlarla sonuçlanan birden fazla enflamatuvar ve demiyelinizan lezyon varlığı ile karakterize edilir (Pierson vd., 2012).

MS'in otoimmün özellik taşıdığı kabul edilmektedir ve önemli bir enflamatuvar bileşkeni vardır.

Geçen on yıllardaki yoğun araştırmalara rağmen, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesinin kesin mekanizmaları halen bilinmemektedir.

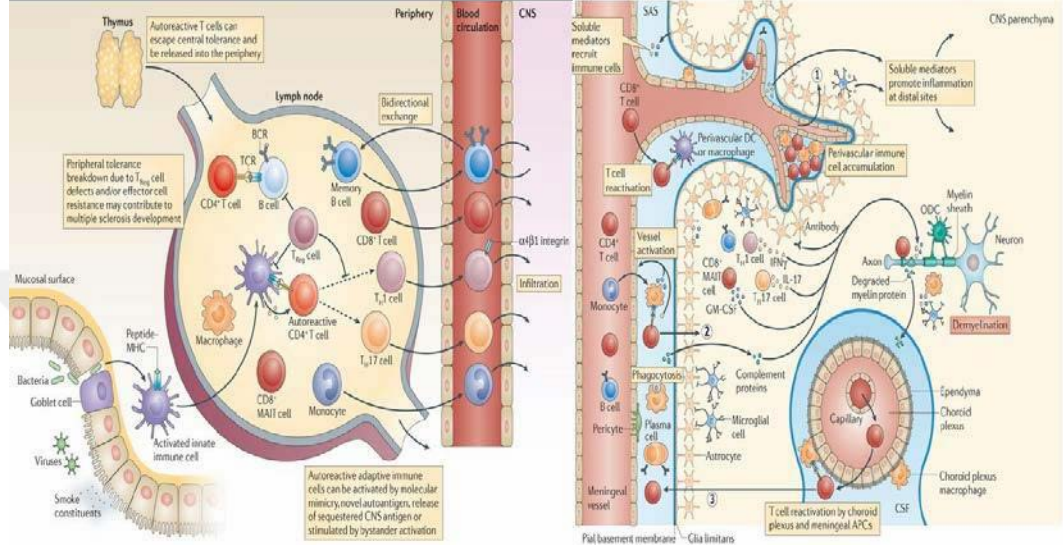
En yaygın kabul gören güncel konsept şematik olarak Şekil 1'de gösterilmektedir. Buna göre, bağışıklık sisteminin çoklu bileşenleri ile MSS'nin elemanları arasındaki etkileşim, MS patogenezi belirlemektedir. Kısaca, periferel T hücreleri bakteriyel, viral veya başka bir enfekte antijen veya bir süperantijen tarafından aktive olurlar. Yukarıda bahsedilen enfeksiyöz ajanlar ve sigara gibi bileşenler de dahil olmak üzere, genetik, diyetel ve çevresel faktörler, bu olaylara katkıda bulunur (Dendrou vd., 2015).

Bu antijenler bazı MSS antijenleri ile moleküler benzerlik göstermektedir (Sospedra ve Martin, 2005). Aktive olan CD8⁺-T hücreleri, enflamatuvar sitokinler üretebilir ve aktivasyon neticesinde Th1 (IFN- γ üreten) veya Th17 hücrelerine (IL-17, IL-22, IL-21) veya her ikisine birden dönüşebilirler. Aktive olmuş olan CD8⁺-T hücreleri, çeşitli integrinlerin ekspresyonlarını da düzenleyerek Kan-Beyin Bariyerini (KBB) geçebilirler. Böylelikle geçirgenliği artmış olan KBB'den kemokin salınımlarının da etkisiyle birlikte B hücreleri ve monosit/makrofajlar gibi diğer bağışıklık hücreleri de MSS'ne göç ederler veya sızarlar (Barnett et al., 2006; McFarland ve Martin, 2007; Cusick vd., 2013; von Büdingen vd 2015). Orada, muhtemelen miyelin antijenlerinden türetilen, MSS'nde ikametgah eden veya göçmen antijen sunan hücreler (APC) tarafından sunulan miyelin kökenli antijenler ile karşılaşılır.

Bunlar makrofaj/mikroglia ve bazı durumlarda dendritik hücreler veya astrositler olabilir. Bu antijenler ile karşılaştıklarında, otoreaktif T hücreleri tekrar aktive olurlar ve komşu bağışıklık veya sinir hücrelerini aktive ederek daha fazla enflamatuvar hücrelerin MSS'ne göçünü sağlarlar. Miyelin, bu hücreler tarafından fagositize edilir (Barnett vd., 2006).

Hümmoral bağışıklık tepkisinin unsurları ve çözünür araçlar, kompleman aktivasyonu, doğrudan yoluyla patolojiye katkıda bulunurlar. Aktive olan MSS-yerleşik mikroglia ve astrositler ile birlikte bu giren hücreler, doğrudan hücre teması ilişkili mekanizmalar vasıtasıyla ve çözünür enflamatuvar ve nörotoksik araçların etkimesi ile (sitokin sitotoksitesi, nitrik oksit, reaktif oksijen ve azot türleri) oligodendrosit (ODC) hasarı, demiyelinasyon ve nöroaksonal yaralanmaları tetiklerler (Hemmer ve ark. 2006; Fletcher ve ark., 2010; Heneka vd., 2014).

Bunun sonucu miyelinin tahrip olması, tekrarlayan ataklardan dolayı rejenerasyon potansiyelinden kısmen yoksun olması, aksonların kısmen miyeloidden yoksun olması ve kısmen de metabolik hasar yoluyla trofik desteğinden mahrum kalması nedeniyle aksonların dejenerasyona uğraması ile ilerleyen süreçte bu hasarlar skleroz adı verilen plakların oluşumuna neden olur (Piaton vd., 2009; Wu ve Tsirka, 2009, Mikita vd., 2011).



Şekil 1.9: MSS dışında bağışıklık sisteminin düzensizlikleri ve otreaktif T ve B hücrelerin çevresel sistemde aktive olmaları ve MSS içerisine bağışıklık sistemi hücrelerinin infiltrasyonu neticesinde enflamatuar multipl skleroz oluşumu (APC= Antijen Sunan Hücre; CD8⁺-MAIT hücresi= CD8⁺-T Hücresi Değişmez Mukoza İlişkili; FDC=Foliküler Dendrit Hücresi; IFN γ =İnterferon- γ ; IL-17=İnterlökin-17; NO=Nitrik Oksit; RNS=Reaktif Nitrojen Türleri; ROS=Reaktif Oksijen Türleri; TH1 Hücre=T Yardımcı 1 Hücre) (Dendrou vd., 2015'ten alınmıştır).

DAE, MS özelliklerini çoğunu taklit eder ve tüm kısıtlılıklarına rağmen, hastalığı in vivo olarak incelemek için en iyi araç olmaya devam etmektedir (Yong, 2004; Gold vd., 2006). MS'de olduğu gibi, DAE progresyonu da MSS'in de periferik hücrelerin infiltrasyonu ve birikimiyle karakterizedir (Muller vd., 2000). Bu nedenle, MSS'ne infiltre eden hücrelerin izolasyonu ve analizi MS / DAE patogenezi mekanizmalarını anlamak için vazgeçilmez bir adımdır (Huppert vd., 2010). Santral sinir sistemine (MSS) lökosit infiltrasyonu MS gibi bazı patojenik koşullar altında oluşur ve çoğu zaman ciddi bozukluklarla sonuçlanır.

Dolayısıyla, bu şekilde MSS'ne infiltre eden hücre popülasyonlarının izolasyonu ve analizi, alttaki patojenik mekanizmaların aydınlatılması için önemlidir (Schmitt, vd.,2012).

Kan-beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğü, MSS içine ve dışına besin maddeleri ve hücreler arabolucuların normal geçiş işlemlerini belirler ve bu nedenle sağlıklı bireyin önemli bir özelliğini temsil eder.

Bununla birlikte, bazı durumlarda, KBB'nin bozulması ciddi işlevsizliklere neden olur. KBB yıkımı Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, beyin enfeksiyonları, inme, epilepsi ve multipl skleroz (MS) ile ilişkilendirilmiştir (Wong vd., 2013).

MSS'ne sızan toplam löosit sayısı ile DEA şiddeti ve hastalığın progresyon evresi arasında güçlü bir korelasyon varlığı gösterilmiştir (Guinti vd., 2003). Örneğin, DEA oluşturulan hayvanların MSS'nde en fazla miktarda T hücresi hastalığın en yüksek skorunda tespit edilmiştir (Skor 3,5-4).

1.5 Multipl sklerozda doğal bağışıklık elemanları

Bağışıklık sisteminin kazanılmış ve doğal olmak üzere iki alt grubu vardır. Kazanılmış bağışıklık sistemi, erken dönem sonrası devam eden immün reaksiyonlardan sorumludur. Doğal bağışıklık sistemi ise enfeksiyöz ajan ve nonenfeksiyöz yapılara karşı immün yanıtta erken reaksiyonları oluşturmaktadır.

Doğal bağışıklık sistemini oluşturan ana yapılar; fiziksel ve kimyasal bariyerler (örneğin epitel dokusu ve epitel yüzeyinde sentezlenen bazı moleküller), fagositik hücreler (nötrofiller, makrofajlar) ile NK (doğal öldürücü) hücreleri, mast hücreleri, kompleman sistemi ve diğer inflamasyon araçları gibi protein yapısındaki maddeler, sitokinler olarak özetlenebilir.

Doğal immünitinin elemanları mikroorganizmalardaki ortak yapılara özgüdür ve yabancı yapılara karşı iyi bir ayırtetme mekanizması yoktur. Kazanılmış immünite ile arasındaki önemli farklar çeşitliliğinin sınırlı olması ve bellek özelliğinin olmamasıdır.

Kazanılmış immünitede ise çeşitlilik çok fazladır ve genlerin somatik düzenlenmesi ile yeni reseptörler üretilebilmektedir. Bellek fonksiyonu vardır. Doğal bağışıklık sistemi çeşitli yollarla kazanılmış immün sisteme ait olan T ve B hücrelerini uyarmak üzere sinyaller oluşturmaktadır (Abbas AK, 2005).

1.6 Ly-6 Antijenleri

Ly-6 antijenleri glikozilfosfatidilinozitol (GPI) kaplı membran glikoproteinler olup moleküler ağırlıkları 15.000-18.000 kDa değişir. Bu antijenler bir multigen ailesi tarafından kodlanır. Ly-6 lokusu yapısal olarak ilişkili sekiz farklı serotipi kodlar (Ly-6 A/E, Ly-6B, Ly-6C, Ly-6D/ThB, Ly-6F, Ly-6G, Ly-6I ve Ly-6M).

Ly-6 antijenleri; timositler, kemik iliği hücreleri, böbrek hücreleri, fibroblastlar, matur veya immatür T-lenfositler, B-lenfositler ve makrofajlarca sentezlenir.

Beyin, kalp veya karaciğer parankim hücrelerince de sentezlendiği bilinmektedir. Ly-6G, granulositler üzerinde eksprese edilen fonksiyonel olarak önemli moleküldür.

Nötrofiller gelişimleri boyunca Ly-6G eksprese ederler. Ly-6G^{lo} ifade eden hücreler çoğunlukla immatür blastlar, miyelositlerken az oranda nötrofiller, makrofajlar ve lenfositlerdir. Ly-6G^{high} ifade eden miyeloid hücreler ise çoğunlukla nötrofillerdir (Gumley TP. vd., 1995; Biermann H. vd., 1999).

1.7 CD45 Antijeni

Tüm çekirdekli hematopoetik hücrelerde eksprese olan CD45 bir transmembran glikoproteinidir ve insan lökositlerinde tanımlanmış 5 farklı izoformu (ABC, AB, BC, B, O) mevcuttur.

T hücrelerinin birden fazla izoform eksprese edebildikleri özellikle periferik kanda bulunanların ABC, AB, BC ya da BO izoformlarını içerdiği, B hücrelerinin ise yüksek molekül ağırlıklı izoformları (ABC) eksprese ettikleri, monosit ve dendritik hücrelerinde düşük molekül ağırlıklı izoformları (B,O) eksprese ettikleri bildirilmiştir (Sewell W A. vd., 1998).

İnsanlarda deneyimsiz T lenfositlerin çoğu; CD45 yüzey molekülünün 200 kD'luk izoformunu taşırlar (CD45^{RA}). Bu izoform A ekzonu tarafından kodlanan bir segment içerir. Birçok aktive ve bellek T lenfosit ise, CD45'in 180-kD'luk izoformunu taşır (CD45^{RO}). Bu izoformda A ekzonu splicing işlemi ile çıkarılmıştır (Abbas AK. vd., 2003).

Yapılan alışmalar CD45'in hem T lenfosit hem B lenfosit, bunların yanı sıra mast hücreleri ve diğerk lökositlerin aktivasyonunda da rol oynadığını göstermiştir (Visser L. vd., 1998).

1.8 CD3 Antijeni

T lenfositleri tanımlayabilmemizi sağlayan yüzey işaretleyici gruplardan en özgün olanları küme farklanma (Cluster of Differentiation = CD) molekülleri ailesidir. CD molekülleri esasında membran glikoproteinleridir ve immün yanıtın denetimi ve aktivasyonu açısından çok önemlidir. Bu moleküller, antijenler için reseptör görevini üstlenerek lenfositlerin aktivasyonunu sağlarlar ve sinyal iletiminde de görev alırlar. Günümüzde 200' aşkın CD molekülü tanımlanmıştır.

CD3 molekülü, T lenfosit içine doğru sinyal iletiminden sorumludur. Antijeni tanıyarak, bu haberi T lenfositin sitoplazma ve çekirdeğine ileten moleküldür. CD3 antijeni erken dönem, olgunlaşmamış T lenfositlerin yüzeyinde bulunur. Kortikal timositlerde CD3 tutulumu intrasitoplazmik iken, medulladaki timositlerde CD3 ekspresyonu hücre zarındadır. Bu antijen normal ve neoplastik T lenfositlerin tanımlanması açısından da oldukça özeldir (Tatsumi Y. vd., 1990; Cho EY. vd., 2001).

1.9 CD11b Antijeni

CD11b antijeni CD11b/CD18 (Mac1) integrin heterodimerinin α subunitidir. İntegrin Mac-1' i (CD11b/CD18, α M β 2, CR3, iC3bR, Mo-1) oluşturmak için CD18 antijenini (integrin β 2 subunit) bağlamaktadır. CD11b tip1 transmembran glikoprotein olup indirgenmiş ve indirgenmemiş durumlarda sırasıyla 170 ve 165 kDa ağırlığındadır. Hücre yüzeyinde CD11b zinciri ekspresyonu CD18 antijeni (β 2 integrin zinciri olarak da bilinmektedir) varlığına ihtiyaç duymaktadır. CD11b/CD18 yüksek oranda NK hücreleri, nötrofiller, monositler, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlarca eksprese edilmektedir. Mac-1'in ligandları ICAM-1, fibrinojen, faktör X ve 32 iC3b'dir. Mac-1 hem monositler hem de nötrofillerin vasküler endotele adherensinde anahtar bir rol oynamaktadır (Granchi D. vd., 1998).

CD11b yapısal olarak periferel kan lökositlerinin yüzeyinin %50 sinden fazlasında eksprese olmakta; lökosit aktivasyonu sonrası CD11b içeren sekretuar granüllerin hücre membranına füzyonu sonrası ekspresyonu oluşmaktadır. CD11b ekspresyonu lökosit aktivasyonunun bir belirteci olarak hem in vivo hem de in vitro temel ve klinik araştırmalarda kullanılmaktadır (Li N. vd., 2000).



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Araştırmada Kullanılan Cihazlar

Deneyisel araştırmalarımız esnasında;

- Flow sitometri cihazı Navios(Beckman Coulter),
- Salınlımlı rotorlu santrifüj(Sigma 1-14),
- Vortex(Dragon Lab MXF),
- Pipet(Thermo scientific),
- Su Banyosu(Nüve, Türkiye),
- Dispenser(Vitlab simplex, Germany),

2.1.2 Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

- Freund's adjuvant complete(Sigma, F5881),
- Gliserol(Sigma, G2289), Ketamin,
- Kloroform(Sigma,C2432),
- Ksilazin, Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco),
- Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide Fragment 35-55 Rat, Mouse (Anaspec, 60130-5),
- Pertussis toxin from Bordetella pertussis (Sigma, P7208),
- Etanol (Riedel, 071029) (%70 konsantrasyonu),
- Kalsiyum ve Magnezyum içermeyen fosfat tamponlu salin PBS (Sigma-Aldrich,USA)
- Ficoll(Lonza, USA)

2.1.3 Araştırmada Kullanılan Kitler

İzolasyonu sağlanan beyin örneklerinde hücre yüzey ekspresyonlarını saptamak amacıyla -CD45 FITC,- CD 3 PerCP-Cy5.5,-Ly6G APC,-Ly6C PE-Cy7,-CD11b PE monoklonal antikorlarıyla boyama yapılmıştır. (Tablo 3-1)

Monoklonal Antikor	Renk	Firma
CD 45	FITC	(BD, San Jose,CA)
CD 3	PerCP-Cy5.5	(BD, San Jose,CA)
Ly 6G	APC	(BD, San Jose,CA)
Ly6C	PE-Cy7	(BD, San Jose,CA)
CD 11b	PE	(BD, San Jose,CA)

Tablo 2.1: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar

Bunun için tüplere, önceden titrasyonu yapılarak uygun miktarları belirlenen florasan işaretli monoklonal antikorlar ve üzerine 100µl beyin izolasyon örneği eklenmiştir. Tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 2 ml PBS eklenen tüplerin 1200 devirde 5 dakika santrifüjü takiben üst sıvılar uzaklaştırılmış ve tekrar 2 ml PBS eklenerek 1200 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvıları uzaklaştırılmasını takiben tüplere 500 mikrolitre IsoFlow Sheath Fluid sıvısı eklenmiş ve Beckman Coulter NAVIOS cihazında değerlendirilmiştir.

2.1.4 Deney Hayvanları

Bu çalışmada KOBAY A.Ş. Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarından temin edilen 6-8 haftalık C57BL/6 fareleri kullanılmıştır. Hayvanların bakımı Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Biriminde yapılmıştır. Her kafes içerisinde en fazla 3 hayvan barındırılmıştır. Yiyecek içecek sınırlaması yapılmamıştır. Kafes ve ortamlarına uyum sağlayabilmeleri için fareler deneye başlamadan bir hafta önce laboratuara getirilmiştir. Hayvan deneyleri için gerekli etik kurul onayı Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Birimi'nden alınmıştır (PAUHDEK-2015/021).



Şekil 2.1: Farelerin günlük skor ve gözlemlmeleri

2.1.5 Akan Hücre Ölçer

Akan hücre ölçer, bir kanalda hareket eden çok sayıda hücrenin granülite, büyüklük ve flöresan yoğunluğunu hızlı şekilde ölçen elektronik bir sistemdir (Kipps TJ, 1995). Hücreler akan hücre ölçerde okutulmadan önce flöresan boyaları ile bağlanmaları sağlanır ve Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) ile okutulur. Bu floresan moleküller lazer ışını absorbe ederek uzun dalga boyunda ışın saçarlar. Saçılan ışınlar ayna ve filtre sistemlerinin yardımıyla detektörlerle toplanarak optik sinyaller alınır. Bu optik sinyaller elektronik sinyallere dönüştürülerek bilgisayara dataları aktarılır ve hücrelerin verisel analizi yapılır.

Akan hücre ölçer sistemi, optik, lazer ışık kaynakları, elektronik ve bilgisayar sistemi olmak üzere dört bileşenden oluşmaktadır. Akım sistemi örnek sıvının “hidrodinamik focus” ilkesine göre aktığı sistemdir. Bu sistem ile hücreler akım odası denilen ana kısma gelirler ve burada lazer ışını ile çarpışırlar. Lazerler tek renkli ışık kaynaklarıdır. Akım sitometrede en çok kullanılan lazer ışık kaynağı ‘Argon iyon lazer’dir. Bunlar 488 nm dalga boyunda ışın yayarlar ve birçok florokrom tarafından emilirler. Elektronik sistemde, her hücreden saçılan ışınların sinyalleri elektronik voltaj atımlarına çevrilir ve her sinyalin yükseklik, alan, genişlik boyutları depo edilen dijital sinyallere dönüştürülür. Optik filtreler, belirli dalga boyundaki ışınların geçmesini sağlarken belirli dalga boyunun altındaki veya üstündekilerin geçmesini engelleyerek filtrelerler. Bilgisayar sisteminde optik ve elektronik sistemce saçılan ışınlar ve flöresan, elektrik sinyallere çevrilir ve bu bilgi dijital dataya çevrilerek bilgisayarda analiz edilmek üzere aktarılır (Alice Longabardi Givan, 1992; Pruitt S.C., ve ark., 2004).

2.1.6 Antikorların bağlanma ve boyama şekli

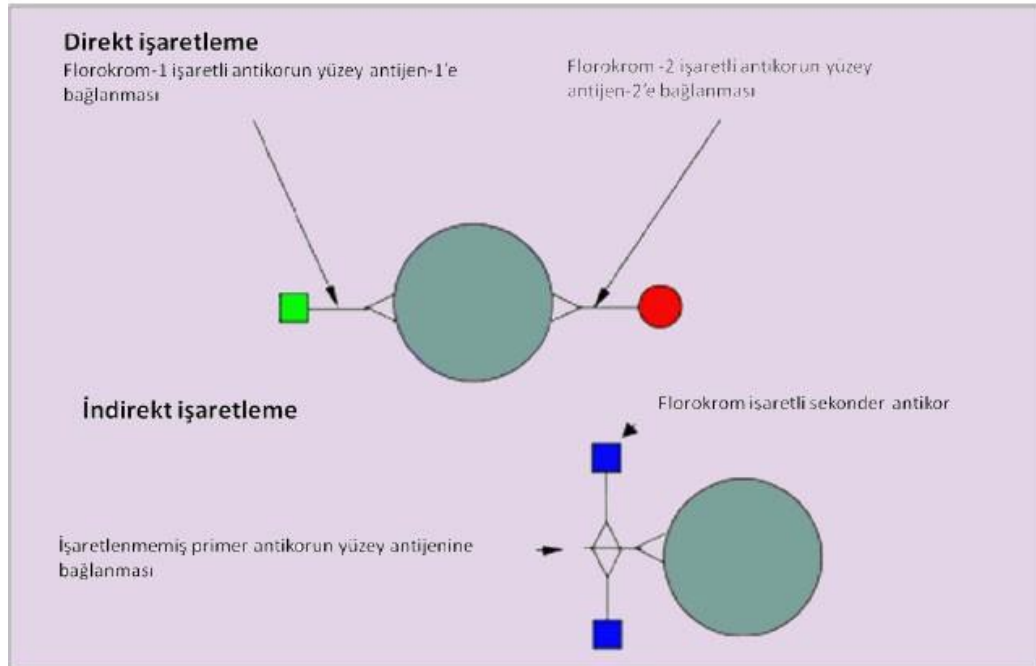
Primer antikorlar belirli bir antijenik yapıyı (karbonhidrat, protein, yağ) hedeflemektedir. Özgün olarak işaretli değildirler. Yüksek özgüllükte olan poliklonal veya monoklonal antikorlar şeklindedirler. Sekonder antikorlar problemlerle işaretli olup, primer antikora bağlanan antikordur. Antikorlar farklı florokrom maddelerle bağlanarak değişik dalga boyunda ve farklı renklerde flöresan sinyaller oluşturmaktadırlar (FITC: yeşil, PE: turuncu...gibi) (Sun T., 2008) (Tablo 2.2).

Florokrom	Eksitasyon Maks.(nm)	Emisyon Maks.(nm)	Renk
Propidium iodide	488	620	Kırmızı
Peridin Chlorophyll (PerCP)	488	670	Kırmızı
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	494	517	Yeşil
Phycoerythrin(PE)	495	576	Turuncu
Rhodamine	545	575	Turuncu
Texas red	596	615	Kırmızı
Phycocyanin	620	655	Kırmızı
Allophycocyanin	620	660	Kırmızı
Cyanin5	633	670	Kırmızı

Tablo 2.2: Florokrom maddelerin renkleri ve dalga boyları (Sun T. 2008)

Akım sitometrede hücreler iki şekilde işaretlenerek boyanabilmektedir. Direkt boyama; örnekler florokrom bağlı spesifik bir antikorla inkübasyonu yapılır. Negatif kontrol ise nonspesifik bir antikor ile ve özgül antikorun benzer florokrom ile işaretlenmiş izotipi ile yapılır.

İndirekt boyama; örnekler işaretlenmemiş tipik bir antikorla inkübasyonu yapılır ve yıkama sonrası florokrom işaretli sekonder antikorla tekrar örnek inkübe edilir. Aynı zaman da negatif kontrol örneği alınarak bağlanmamış izotip eşli nonspesifik primer antikorla işaretlenir. Buradaki primer antikor da florokrom ile konjuge sekonder antikorla işaretlenmiştir (Macey MG, 2007) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Direk ve indirek antikor bağlanması (Macey MG, 2007)

2.2 Yöntem

2.2.1 MS modeli (Deneyisel Alerjik Ensefalomyelit- DEA) oluşturulması

C57BL/6 farelerinde DAE'ye sebep olmak için bilinen ve labımızda rutin uygulanan metod kullanılmıştır (Zheng ve diğ. 2008). Bunun için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptit (MOG35- 55), *Mycobacterium tuberculosis* (ısı inaktive edilmiş) ve Freund adjuvan kullanılmıştır. Freund adjuvan ile emülsifiye edilmiş 225 µg MOG 35-55 ve 400 µg ısı inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* karışımı, daha önce ketamin (80 mg/kg)/ksilazin (8 mg/kg) karışımı ile anestezi yapılan her hayvanın deri altına enjekte edilmiştir. Bu işlemden hemen sonra ve 48 saat sonra 400 ng pertussis toksin karın boşluğuna enjekte edilmiştir. 33 gün boyunca deney hayvanları her gün kontrol edilmiş ve gösterdikleri davranışlar 5 basamaklı bir ölçek kullanılarak belirlenmiştir. Söz konusu gözlemlerde video kaydı yapılmış ve her gün ölçeğe göre skorelama işlemi kaydedilmiştir. Kullanılan ölçek aşağıdaki Tablo 2.3 de verilmektedir.

Skor	Gözlenen etki
0	Herhangi bir etki yok 
1	Kuyruk zayıflığı 
2	Arka uzuvlarda zayıflık ve anormal yürüme 
3	Arka uzuvlardan 1 ya da 2 tanesinin tamamen felci 
4	Ön ve arka uzuvların felci 
5	Can çekişme-ölüm 

Tablo 2.3: MS takibinde kullanılan skorelama tablosu (Zheng ve diğ. 2008).

2.2.2 Deney ve Kontrol Protokolü

2.2.1. de anlatıldığı şekilde deneysel alerjik ensefalomiyelit modeli oluşturulmuştur. 9 adet C57BL/6 farede DAE oluşturulurken 10 adet C57BL/6 fare ise kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.3 Dokuların temini

Deney işlemleri süreci sonunda fareler izofuran kullanılarak derin bir şekilde anestezi edilmiştir. Analizler için önemli bir unsur, MSS (beyin) numulerinin olası periferik kan hücreleri ile kontaminasyonunu önlemektir. Bu amaçla, ilk olarak normal salin solüsyonu ile hayvanların kardiyak perfüzyonu gerçekleştirilmiştir.

Takip eden aşamada fareler dekapite edilmiş, beyin kafatasından çıkarılmış ve PBS çözeltisi içine alınmıştır.

2.2.4 Dokuların Homojenize edilmesi

Bir keskin ve steril jilet kullanarak beyin dokuları küçük parçalara (yaklaşık 1 mm) kesilmiş ve 15 ml bir Falcon tüpünde toplanmıştır. Küçük olarak parçalanmış doku parçaları mekanik olarak homojenize edilmesi amacıyla 2 cc kadar PBS doku homejenizator havanına konulup, beyin dokuları içine katılmıştır ve 5 ile 10 kere yaklaşık olarak çek ver işlemi yapılarak homojenizasyon işlemi sağlanmış oldu.

2.2.5 Dokulardan lökosit izolasyonu ve saflaştırılması

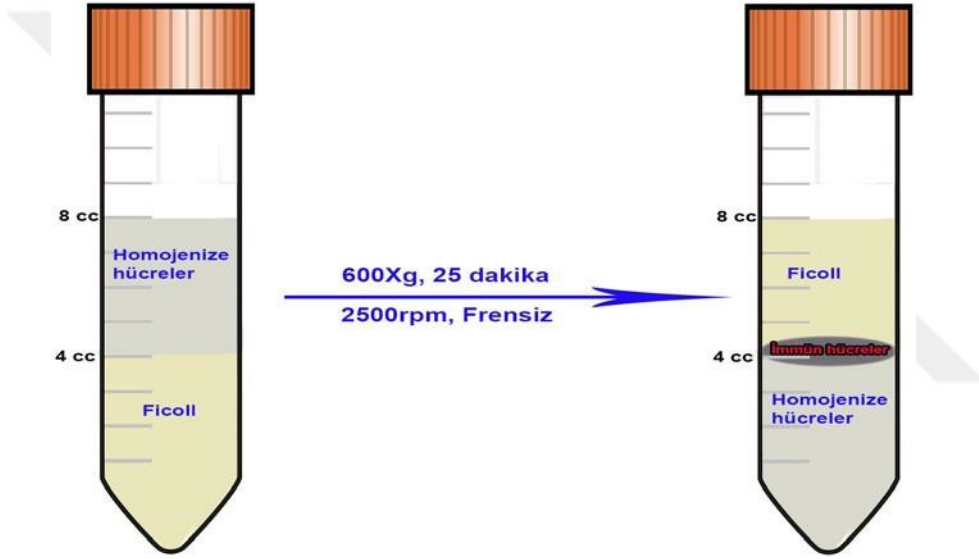
Sağlanan homejenizasyon ile yaklaşık 4 cc kadar PBC ile homejenize hücre çözeltisi elde edilmiş olur. 15 ml lik falcon tüp alınır. Falcon tüpe 1:1 oranını sağlaması açısından 4 cc kadar ficol sıvısından konulur.

2. Aşamada elde edilen homojenize beyin çözeltilisini falconun üstünden pastör pipet yardımı ile sızdırma yapılarak ficollün üstünde tabaka oluşturulur.

Bu tüpler 25 dk 2500 rpm (600g) de frensiz olarak santrifüj edilir.

Hücreler yaklaşık 33 dk sonra santrifüjden çıkınca 15 ml lik falcon tüpte ficoll yüzeyine yapışmış olarak görülür, tüpler sarsılmadan bu yüzeyden lenfositler pasteur pipet ile çok dikkatlice boş bir 15 mli lik falcon tüpe alınır. Üzerine 5 ml PBS eklenir 1500 rpm de 5 dk santrifüj edilir.

Santrifüj sonunda süpernatant atılır ve pelet flow sitometri boyaması için hazır hale gelir.



Şekil 2.3: Erişkin fare beyin immün hücre izolasyonu ve ficoll gradyan şeması

2.2.6 İstatiksel analiz

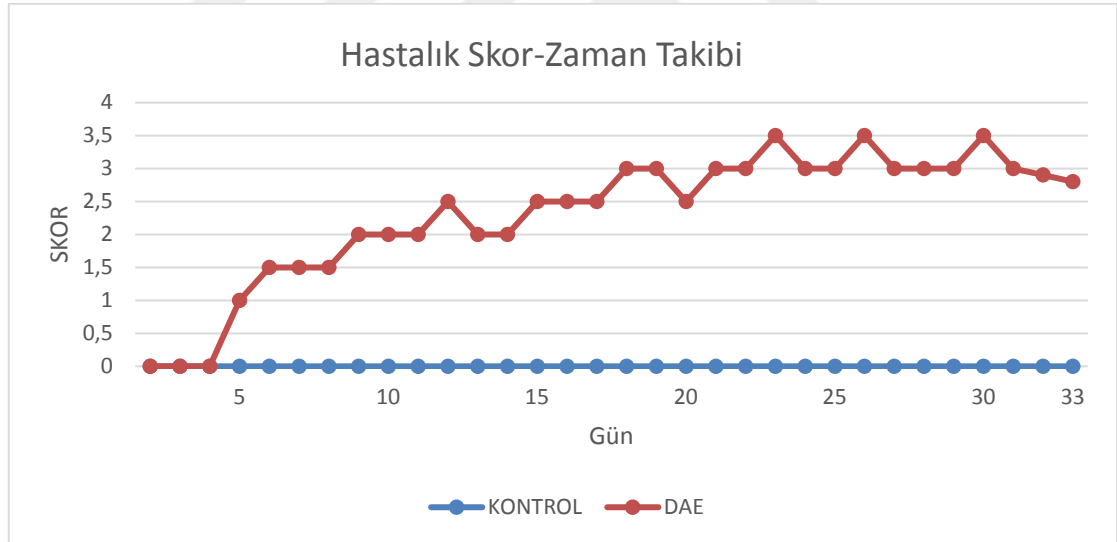
Çalışmada gerçekleştirilen tüm deneylerin sayım ve analizleri NAVIOS Software ve Kaluza Analysis Flow Cytometry Software Version 1.3 yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

Verilerin istatiksel analizleri SPSS 21 programı ile yapılmış ve gruplar arası farkların değerlendirilmesinde non-parametrik Mann-Whitney U testi, grup içi parametlerin değerlendirilmesi için Wilcoxon testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir

3. BULGULAR

3.1 Deneyisel alerjik ensefalomyelit oluşturulması

Hayvanlarda deneyisel alerjik ensefalomyelit indüksiyonu için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptit (MOG35-55), *Mycobacterium tuberculosis* (ısı inaktifte edilmiş) ve Freund Adjuvan kullanılmıştır. 33 gün boyunca deney hayvanları her gün kontrol edilmiş ve farelerin gösterdikleri davranışlar 5 basamaklı bir ölçek kullanılarak belirlenmiştir. DAE oluşturulan fareler ve sağlıklı fareler (kontrol grubu) olarak iki gruba ayrılmıştır.



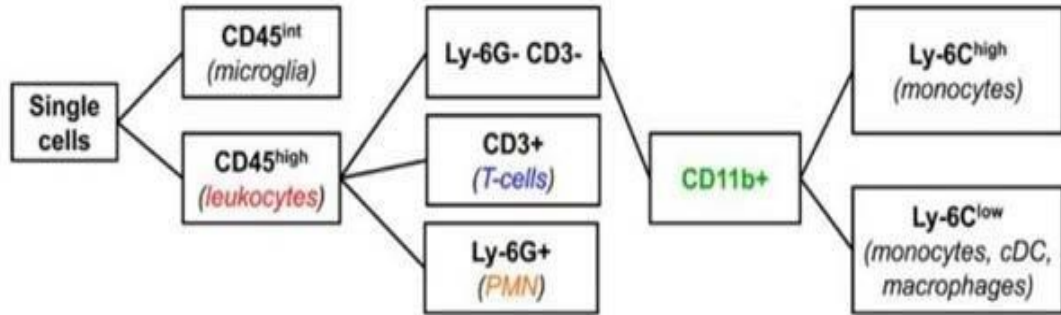
Tablo3.1: Skor-zaman grafiğı

Deneyisel alerjik ensefalomyelit oluşturulan dokuz farenin ortalama hastalık başlama günü enjeksiyon sonrası $18,66 \pm 1,58$ gündür. Ortalama maksimum nörolojik kötüleşme skorları ise $3,11 \pm 0,22$ olarak hesaplanmıştır. Fareler tek tek değerlendirildiğinde ise iki hayvanın skoru 3.5'a diğerkalan yedi hayvanın ise skor 3'e ulaştığını görmekteyiz.

3.2 İmmünolojik değerlendirme

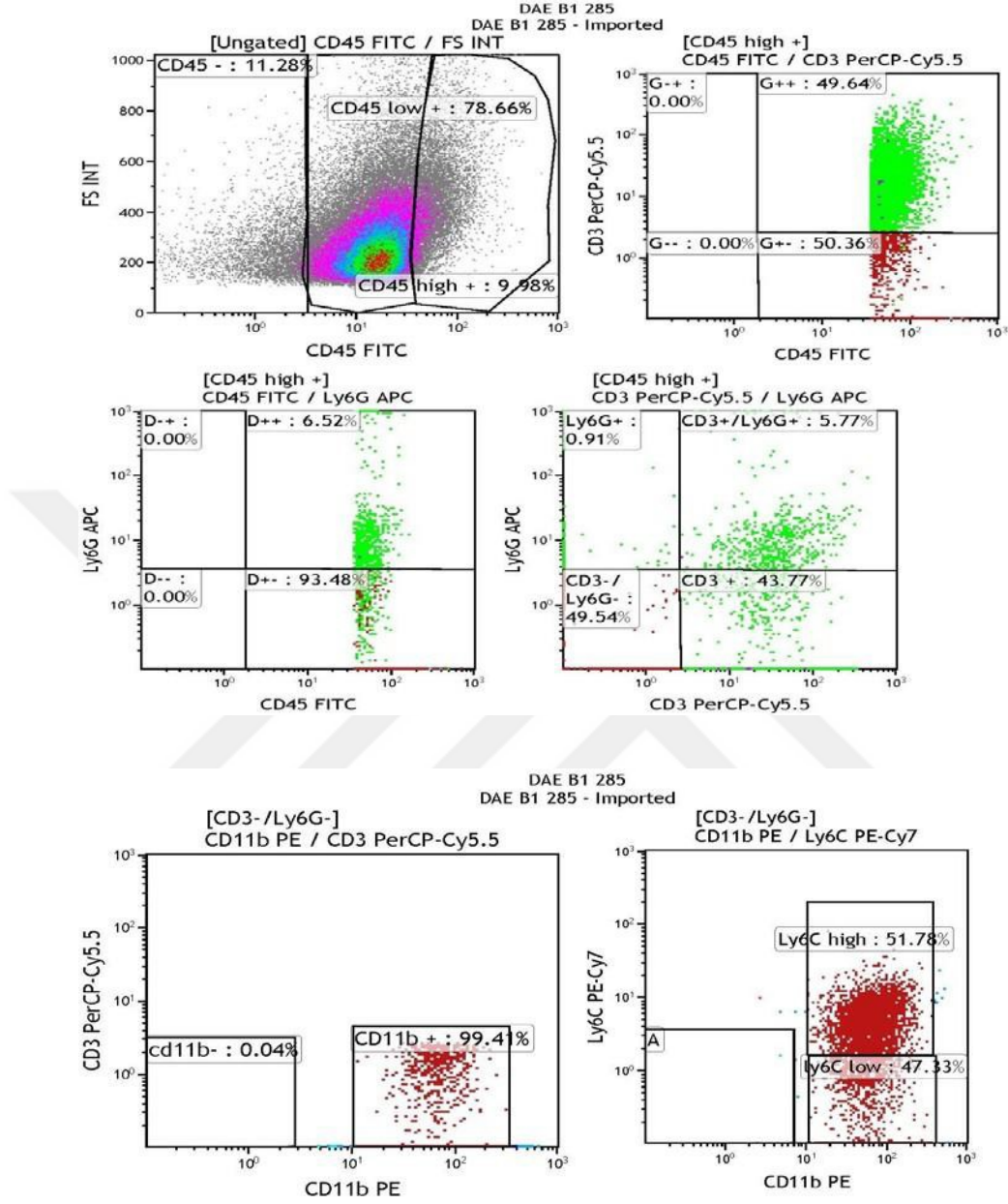
İmmünolojik değerlendirme için DAE ve kontrol gurubu farelerin eksize edilen beyin örneklerinin flow sitometrik değerlendirme sonuçları analiz edilmiştir. Önerilen antikor panelini analiz etmek için flow sitometri cihazımız; mavi (488nm), kırmızı (635nm) ve mor (405nm) renkli lazerlere sahiptir. Beşli boyamalarda (CDD45,CD3,CD11b, Ly6G, Ly6C) flow sitometrik analize uygun olan DAE grbundan(s=9) ve kontrol (s=10) farelerin örnekleri analiz edilmiştir. Flow sitometrik değerlendirmede primer antikorlar ile işaretlenmiş örneklerde lökositler, T lenfositleri, polimorfonükleer nötrofiller (PMN), monositler, dendritik hücreleri (DC) ve makrofajların varlığı ve oranı analiz edilmiştir.

Beyin immün hücrelerin yüzeyel antikorlar ile boyandıktan sonra flow sitometri cihazında okutulup dataların lökosit tiplendirilmesi ve alt grupların tayininde kapılama stratejisi şekil 3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Lökosit tiplemesi için kapılama stratejisi

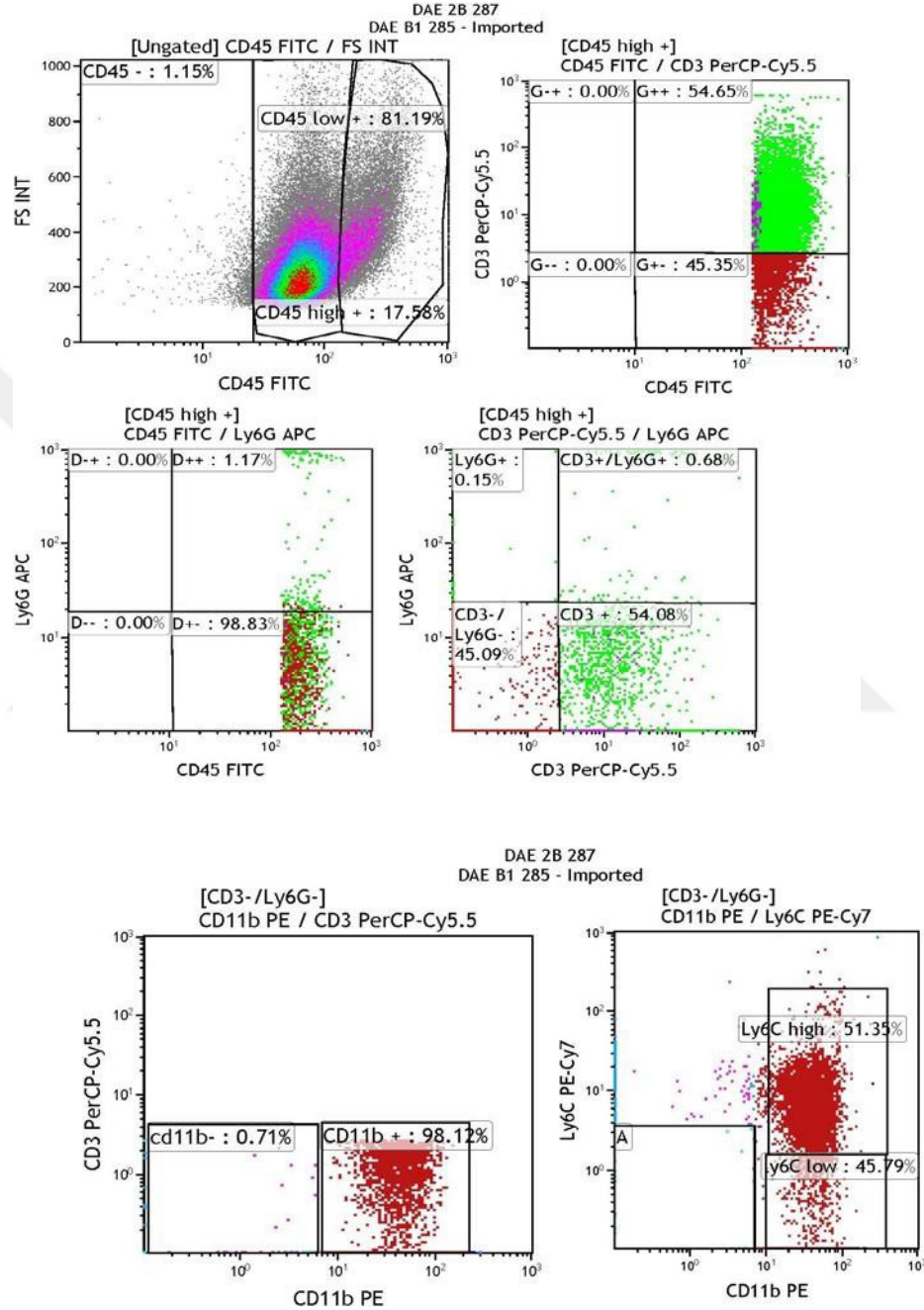
3.2.1 DAE grubu fare beyinlerinin immün fenotipleri



Şekil 3.2 : DAE kontrol 1 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

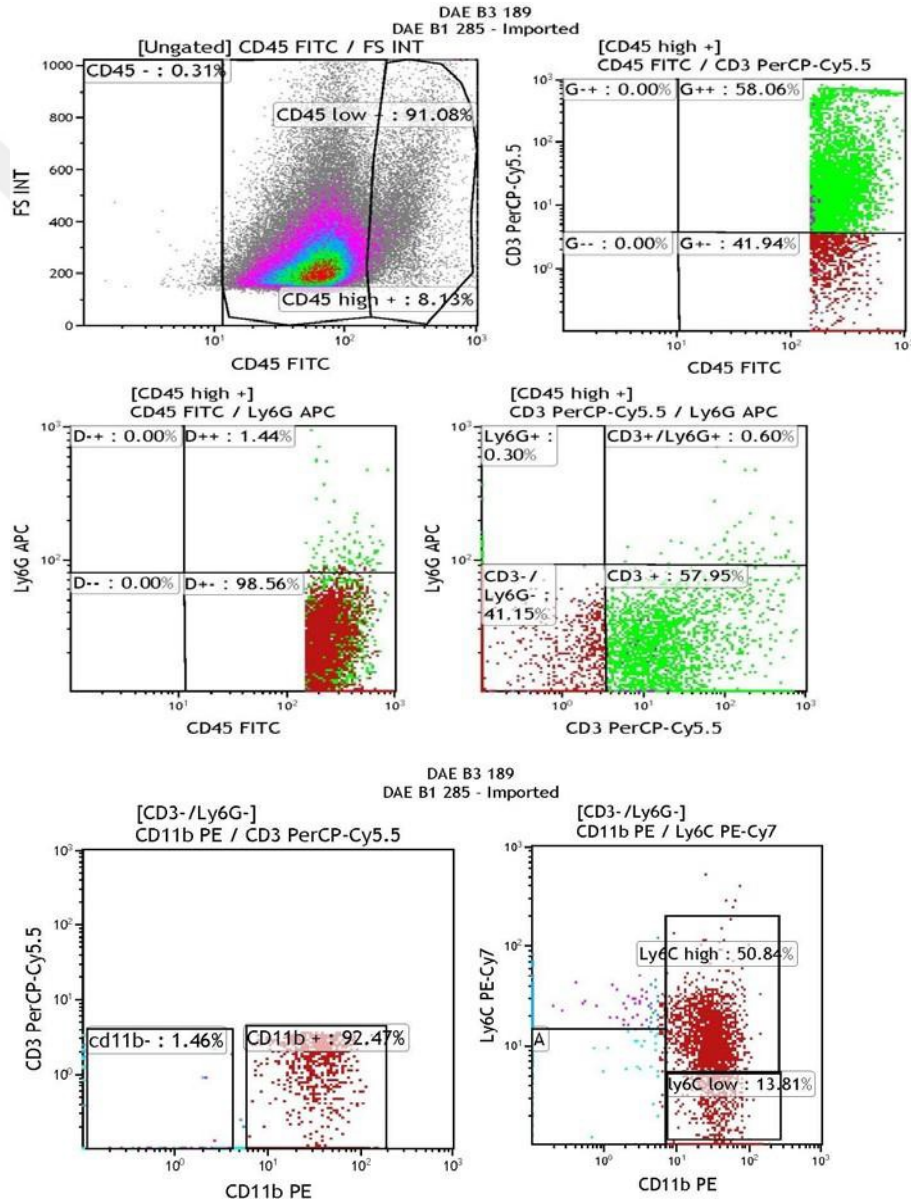
DAE grubu 1. fare beyinde ki immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.2 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sıзан lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %11.28, CD45^{soluk} pozitif oran %78.66, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %9.98 olarak değerlendirilmiştir.

CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %9.98'lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %49.64, Ly-6G %6.52 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %49.54'lük popülasyondan kapılama ile CD11b %99.41, Ly-6C^{soluk} pozitif %47.33 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %51.78 oranı elde edilmiştir.



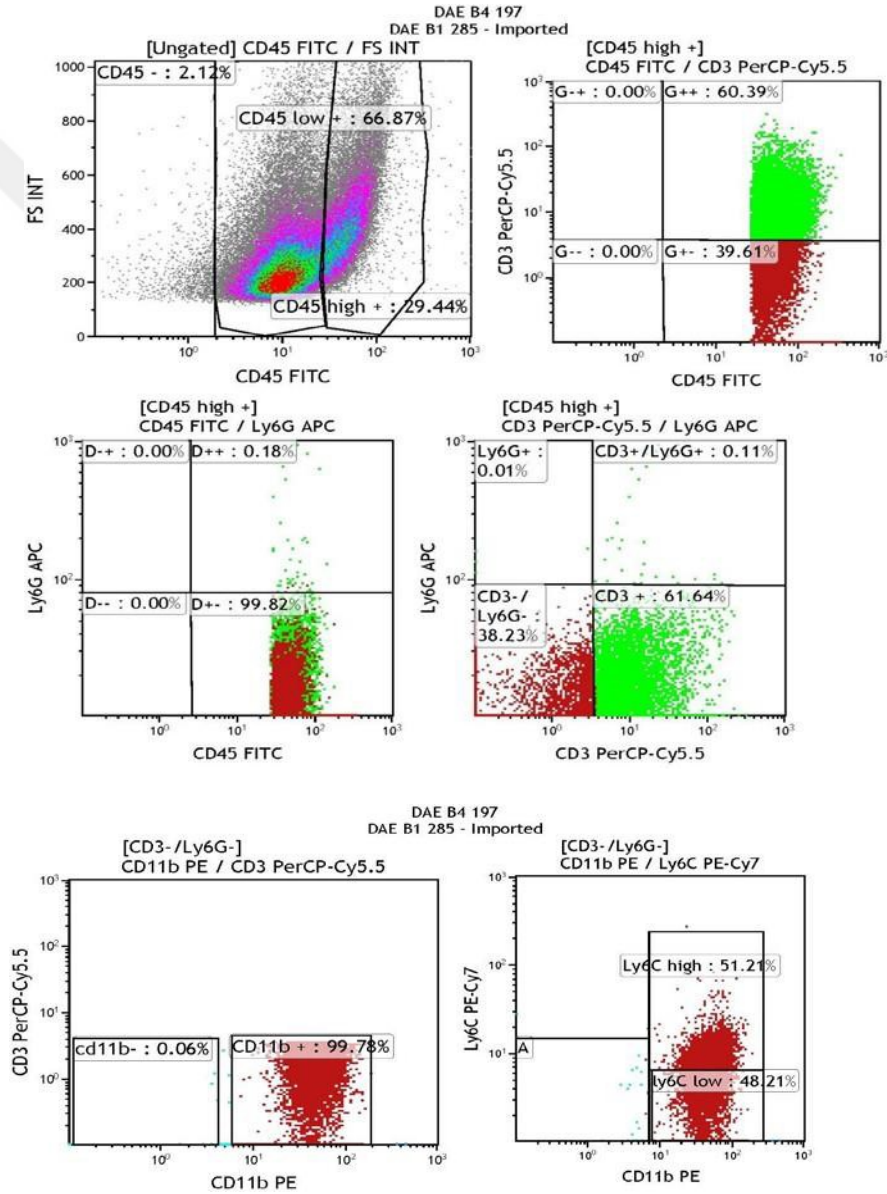
Şekil 3.3 : DAE kontrol 2 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

DAE grubu 2. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.3 de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %1.15, CD45^{soluk} pozitif oran %81.19, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %17.58 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %17.58’lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %54.65, Ly-6G %1.17 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %45.09’lik popülasyondan kapılama ile CD11b %98, Ly-6C^{soluk} pozitif %45.79 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %51.35 oranı elde edilmiştir.



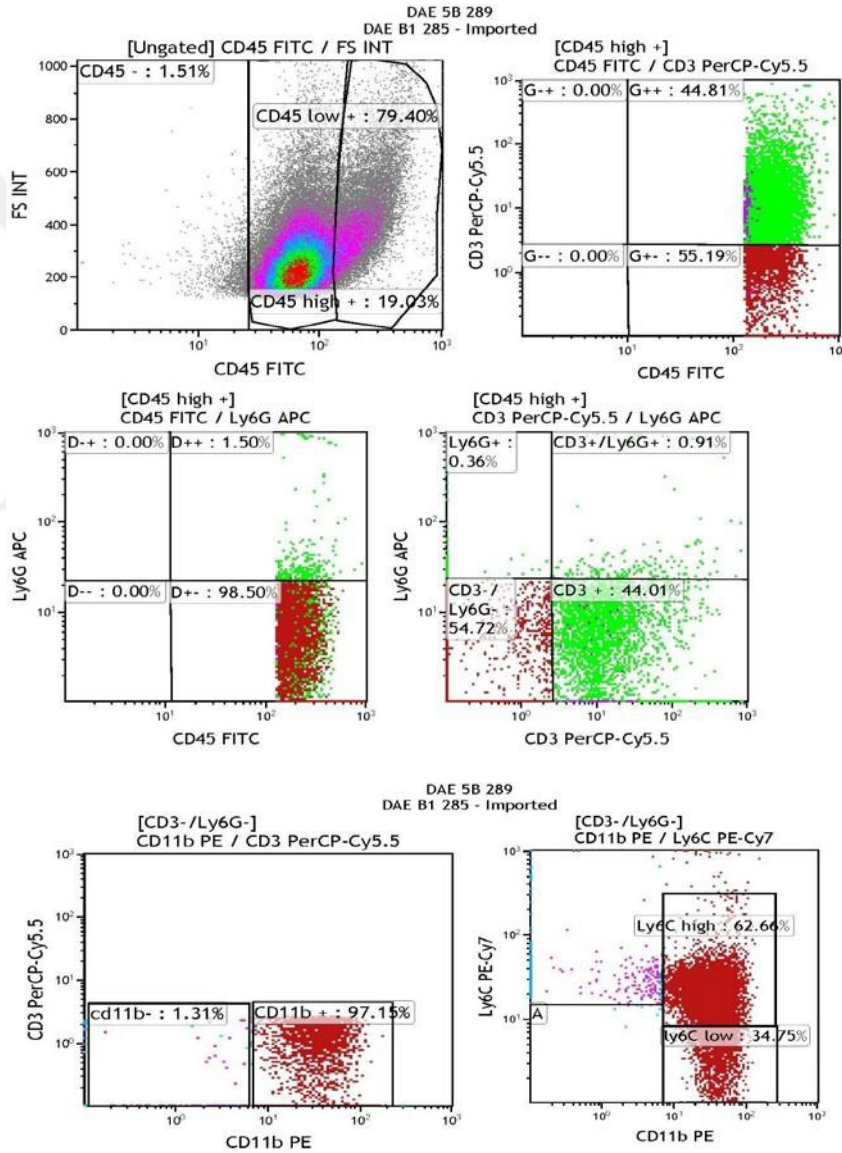
Şekil 3.4 : DAE kontrol 3 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

DAE grubu 3. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.4 de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.31, CD45^{soluk} pozitif oran %91.08, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %8.13 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %8.13'lük bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %58.06 ve Ly-6G %1.44 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %41.15'lik popülasyondan kapılama ile CD11b %92.47, Ly-6C^{soluk} pozitif %13.81 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %50.84 oranı elde edilmiştir.



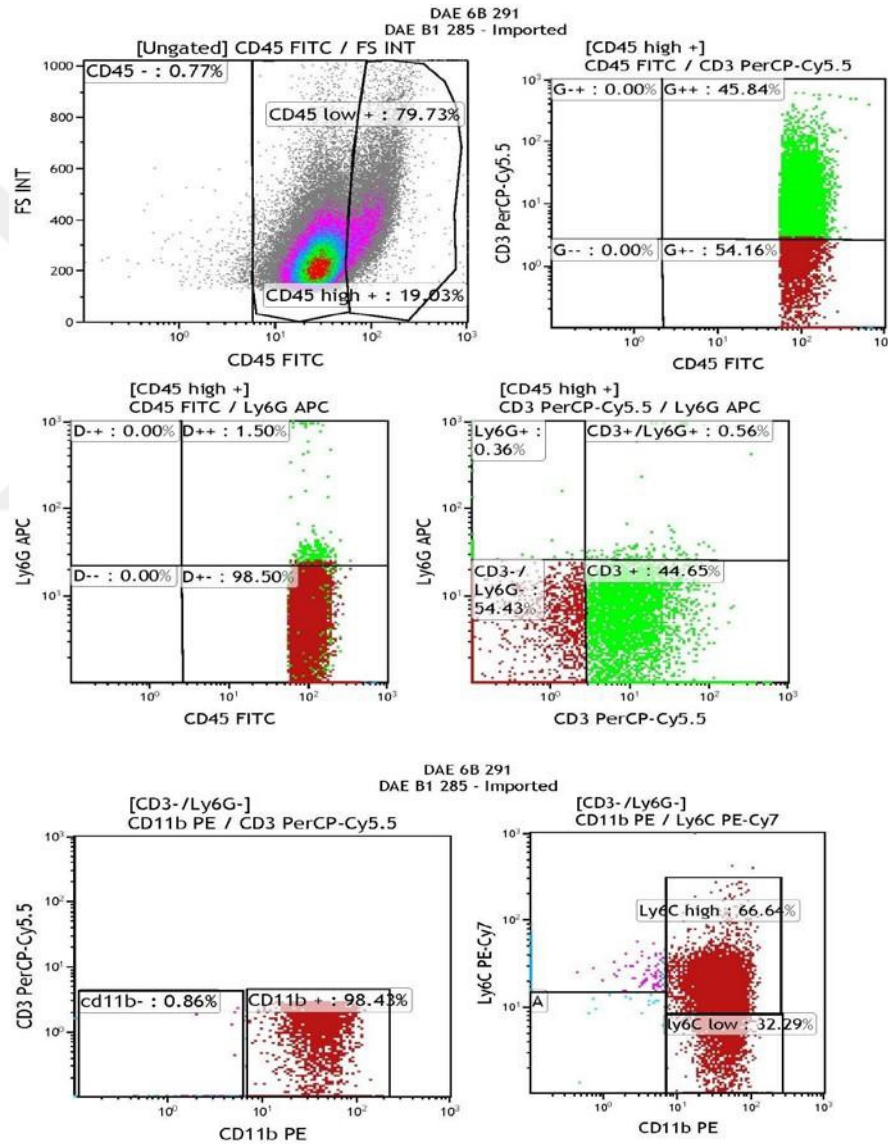
Şekil 3.5 : DAE kontrol 4 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

DAE grubu 4. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.5 de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %2.12, CD45^{soluk} pozitif oran %66.87, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %29.44 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %29.44'lük bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %60.39, Ly-6G %0.18 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %38.23'lük popülasyondan kapılama ile CD11b %99.78, Ly-6C^{soluk} pozitif %48.21 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %51.21 oranı elde edilmiştir.



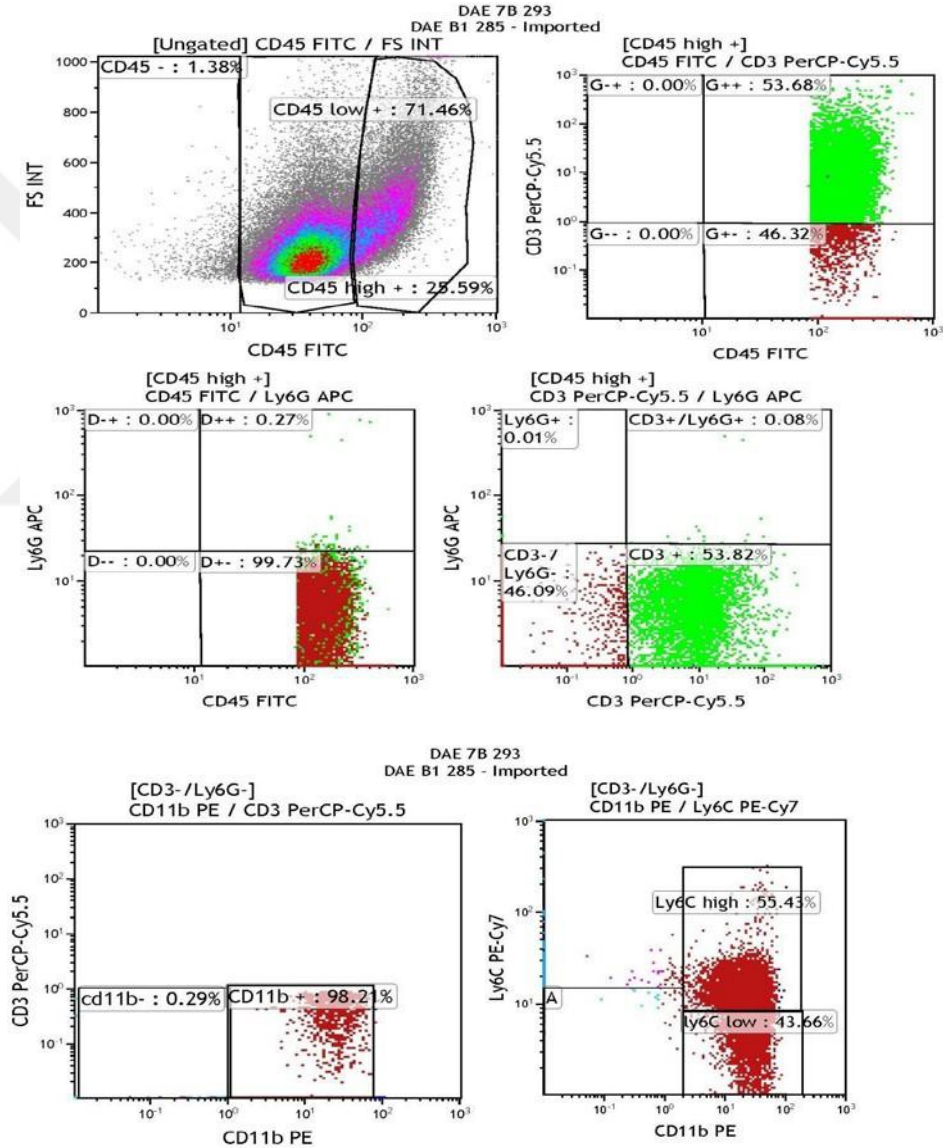
Şekil 3.6 : DAE kontrol 5 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

DAE grubu 5. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.6 da gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %1.51, CD45^{soluk} pozitif oran %79.40, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %19.03 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %19.03'lük bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %44.81, Ly-6G %1.50 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %54.72'lik popülasyondan kapılama ile CD11b %97.15, Ly-6C^{soluk} pozitif %34.75 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %62.66 oranı elde edilmiştir.



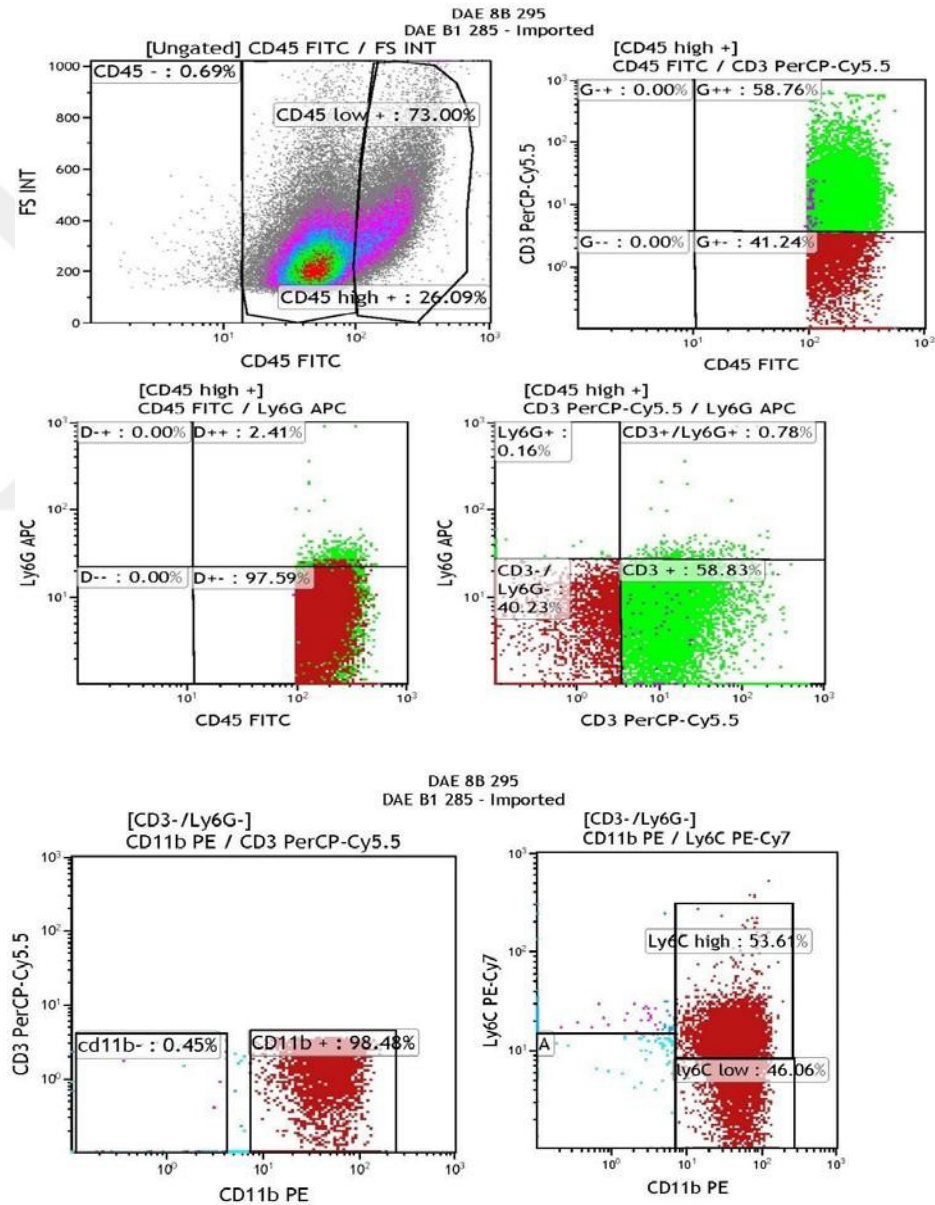
Şekil 3.7 : DAE kontrol 6 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

DAE grubu 6. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.7 de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.77, CD45^{soluk} pozitif oran %79.73, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %19.03 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %19.03'lük bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %45.84, Ly-6G %1.50 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %54.43'lük popülasyondan kapılama ile CD11b %98.43, Ly-6C^{soluk} pozitif %32.29 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %66.64 oranı elde edilmiştir.



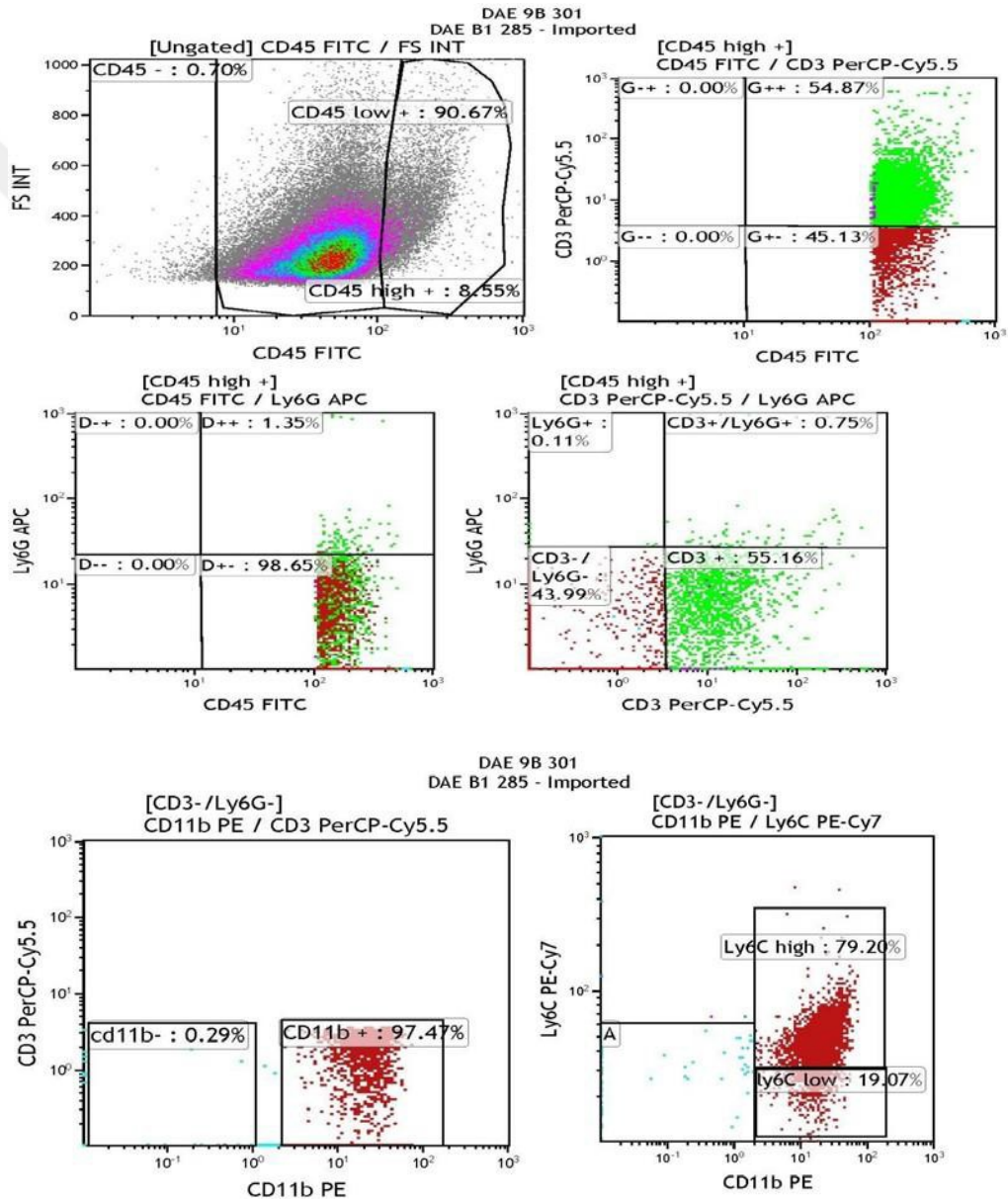
Şekil 3.8 : DAE kontrol 7 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

DAE grubu 7. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.8 de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %1.38, CD45^{soluk} pozitif oran %71.46, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %25.59 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %25.59'luk bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %53.68, Ly-6G %0.27 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %46.09'luk popülasyondan kapılama ile CD11b %98.21, Ly-6C^{soluk} pozitif %43.66 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %55.45 oranı elde edilmiştir.



Şekil 3.9 : DAE kontrol 8 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

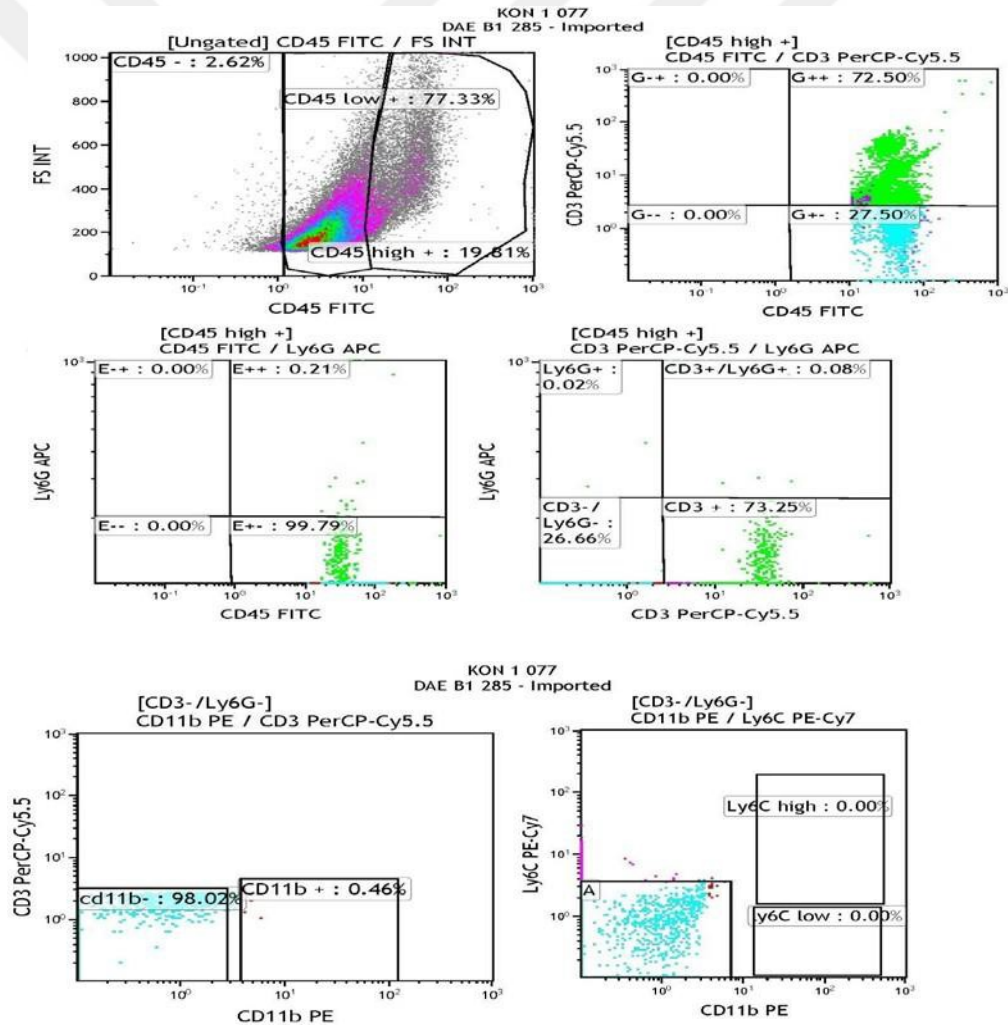
DAE grubu 8. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.9 da gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.69, CD45^{soluk} pozitif oran %73, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %26.09 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %26.09'luk bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %58.76, Ly-6G %2.41 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %40.23'lük popülasyondan kapılama ile CD11b %98.48, Ly-6C^{soluk} pozitif %46.06 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %53.61 oranı elde edilmiştir.



Şekil 3.10 : DAE kontrol 9 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

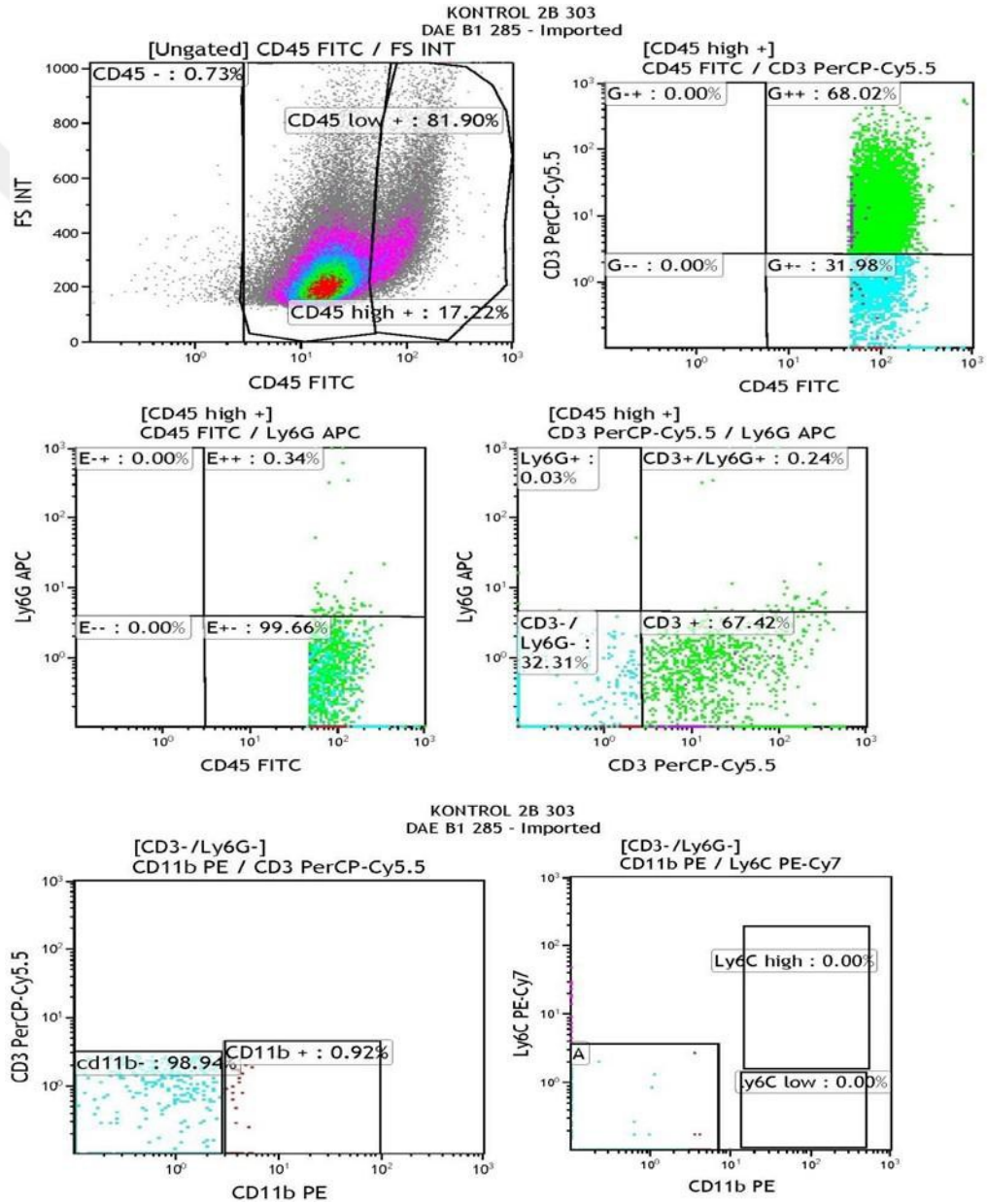
DAE grubu 9. fare beyinde ki immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.10 da gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.70, CD45^{soluk} pozitif oran %90.67, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %8.55 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %8.55'lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %54.87, Ly-6G %1.35 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %43.99'lik popülasyondan kapılama ile CD11b %97.47, Ly-6C^{soluk} pozitif %19.07 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %79.20 oranı elde edilmiştir.

3.2.2 Kontrol farelerinin beyin immün fenotipleri



Şekil 3.11 : Sağlıklı kontrol 1 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

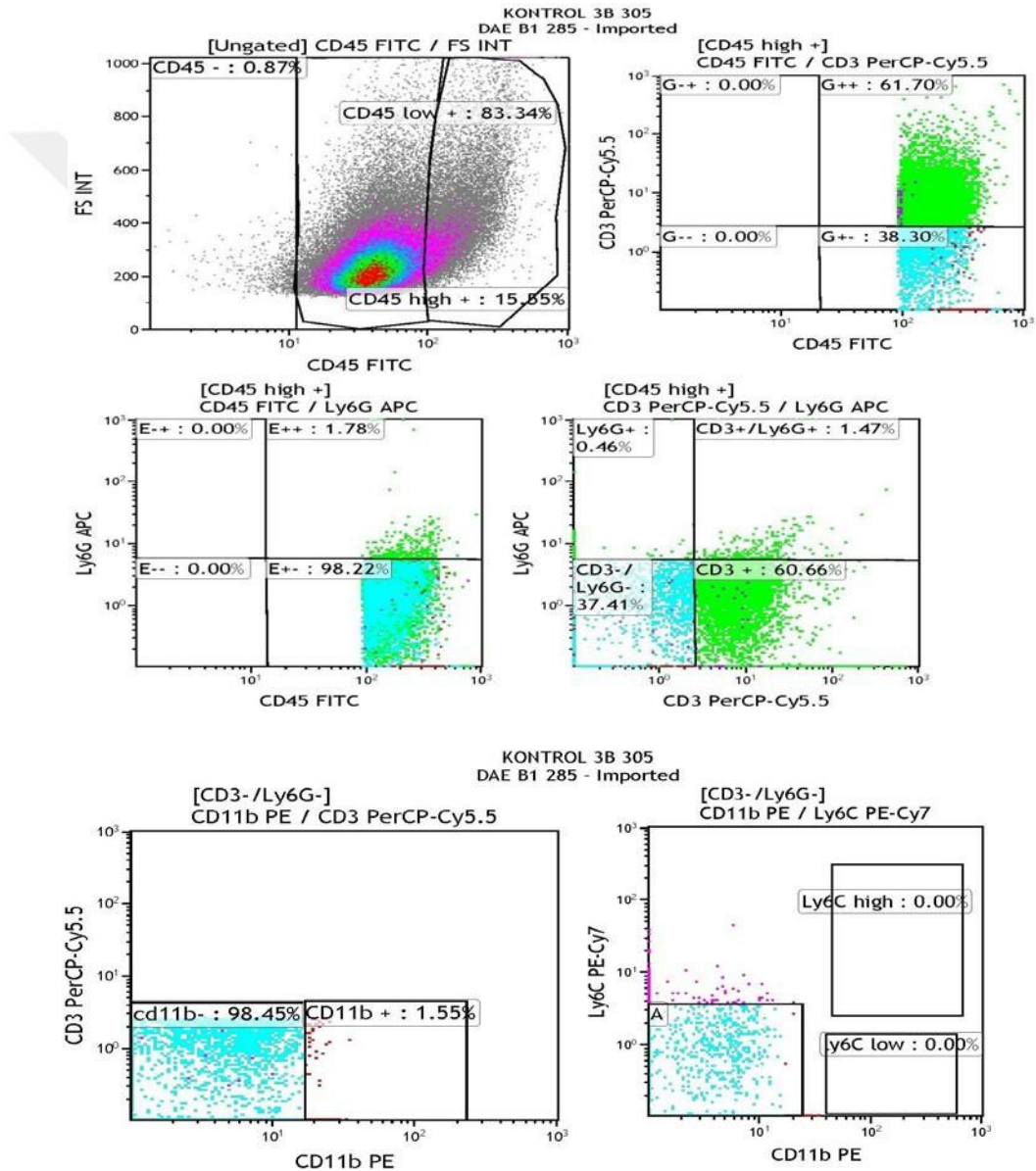
Kontrol grubu 1. fare beyninden immün hücrelerin boyanması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.11 de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %2.62, CD45^{soluk} pozitif oran %77.33, CD45^{parlak} pozitif oran %19.81 olmuştur. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %19.81’lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %72.50 ve Ly6G %0.21 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %26.66’lık popülasyondan kapılama ile CD11b %0.46, Ly6C^{soluk} pozitif %0 ve Ly6C^{parlak} pozitif %0 oranı elde edilmiştir.



40

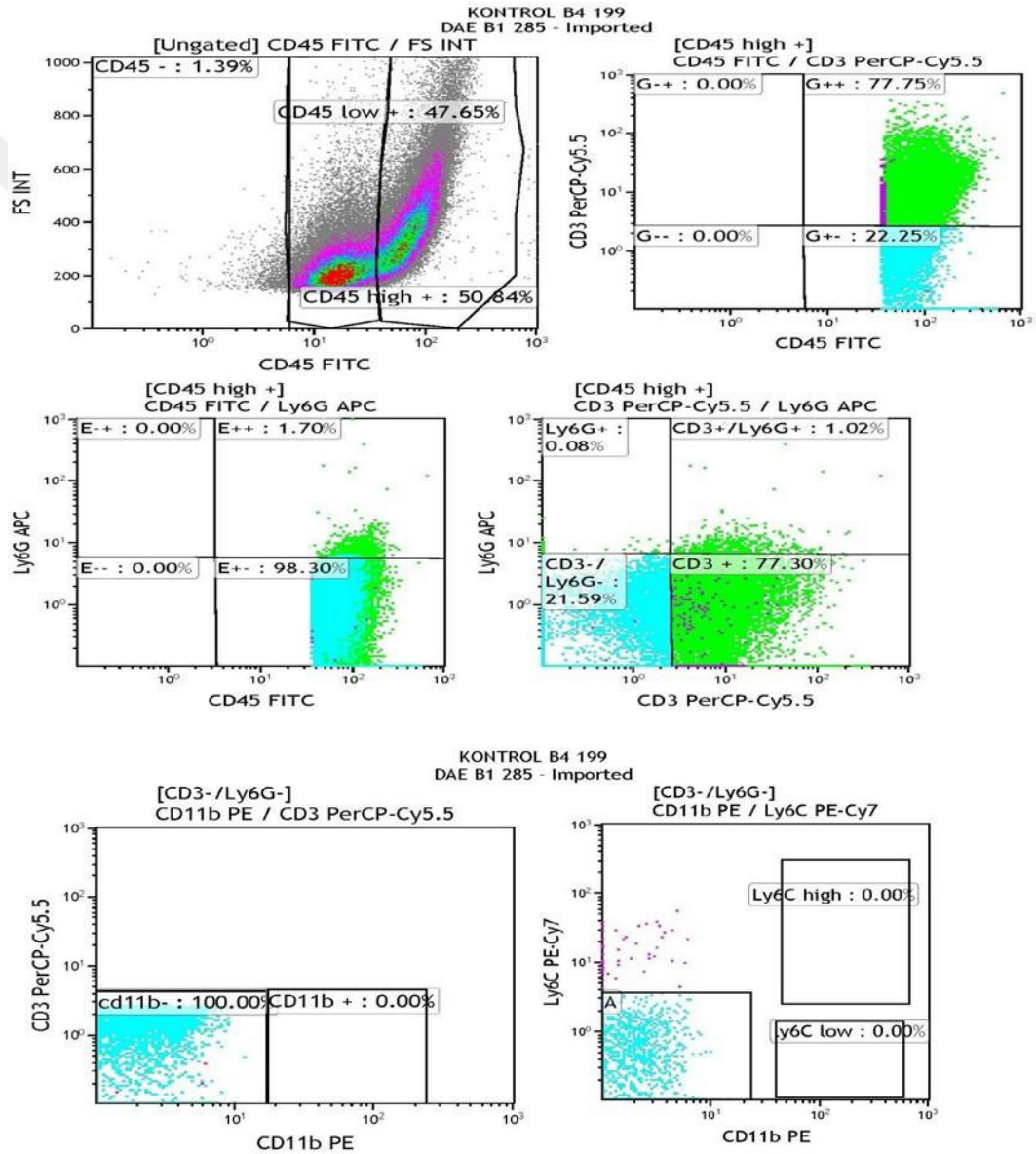
Şekil 3.40 : Sağlıklı kontrol 2 beyin hücrelerine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 2. fare beyninden immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.12 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.73, CD45^{soluk} pozitif oran %81.90, CD45^{parlak} pozitif oran %17.22 olmuştur. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %17.22'lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %68.02 ve Ly6G %0.34 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %32.31'lik popülasyondan kapılama ile CD11b %0.92, Ly6C^{soluk} pozitif %0 ve Ly6C^{parlak} pozitif %0 oranı elde edilmiştir.



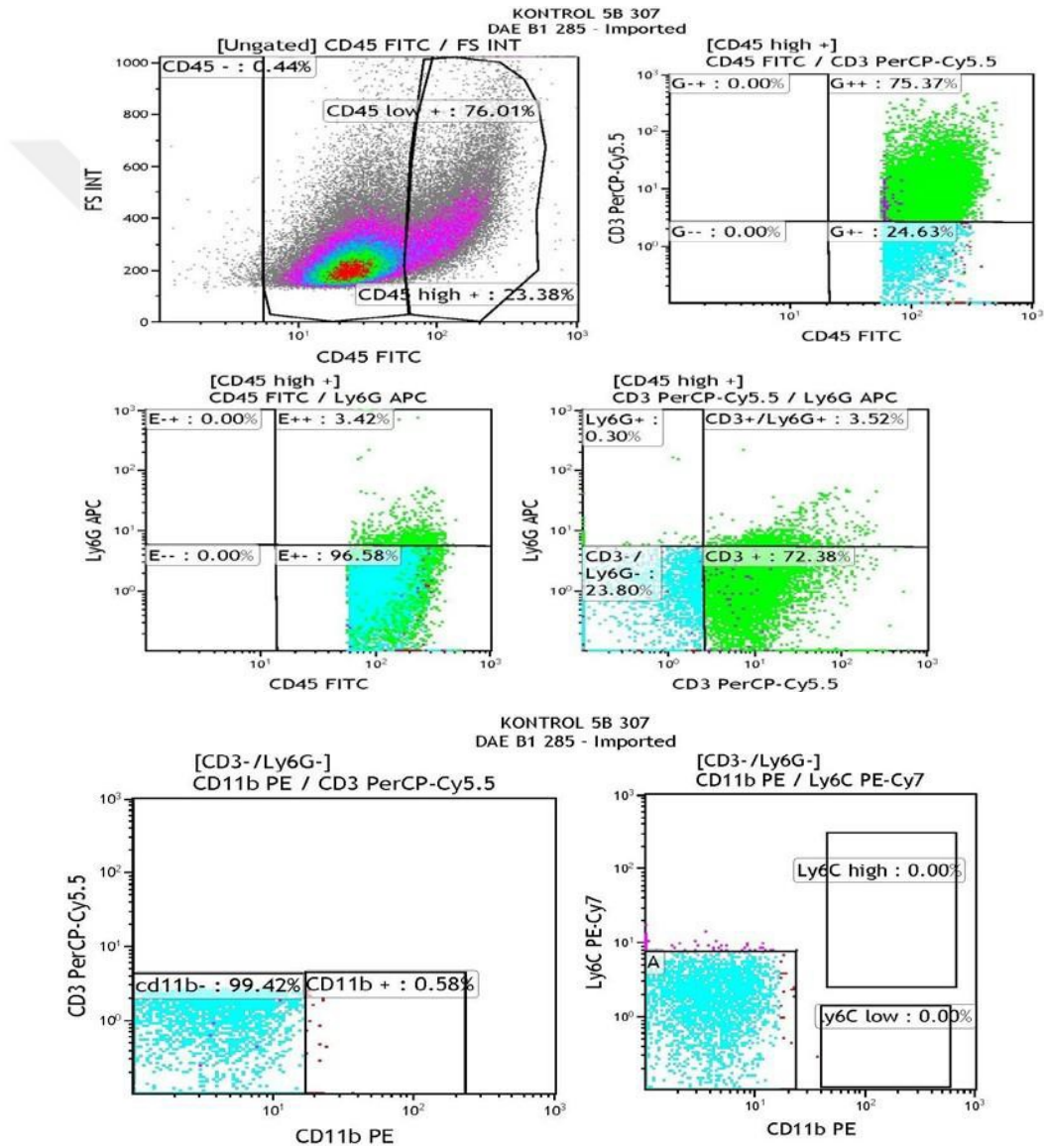
Şekil 3.41 : Sağlıklı kontrol 3 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 3. fare beyninden immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.13 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.87, CD45^{soluk} pozitif oran %83.34, CD45 parlak pozitif oran %15.85 olmuştur. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %15.85'lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %61.70 ve Ly-6G %1.78 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %37.41'lik popülasyondan kapılama ile CD11b %1.55, Ly6C^{soluk} pozitif %0 ve Ly6C^{parlak} pozitif %0 oranı elde edilmiştir.



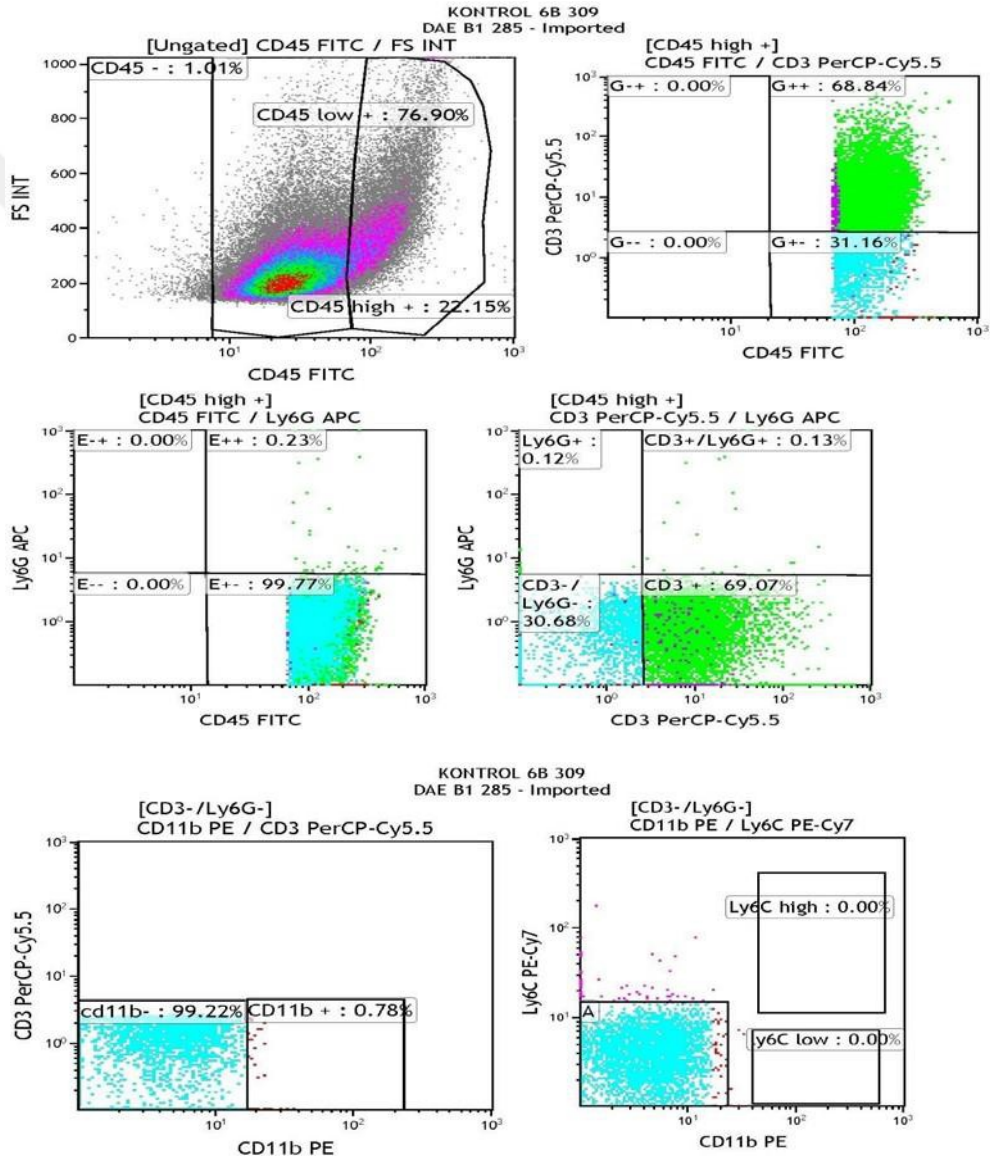
Şekil 3.42 : Sağlıklı kontrol 4 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 4. fare beyninden immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.14 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %1.39, CD45^{soluk} pozitif oran %47.65, CD45^{parlak} pozitif oran %50.84 olmuştur. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %50.84'lük bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %77.75 ve Ly6G %1.70 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %21.56'lık popülasyondan kapılama ile CD11b %0, Ly6C^{soluk} pozitif %0 ve Ly6C^{parlak} pozitif %0 oranı elde edilmiştir.



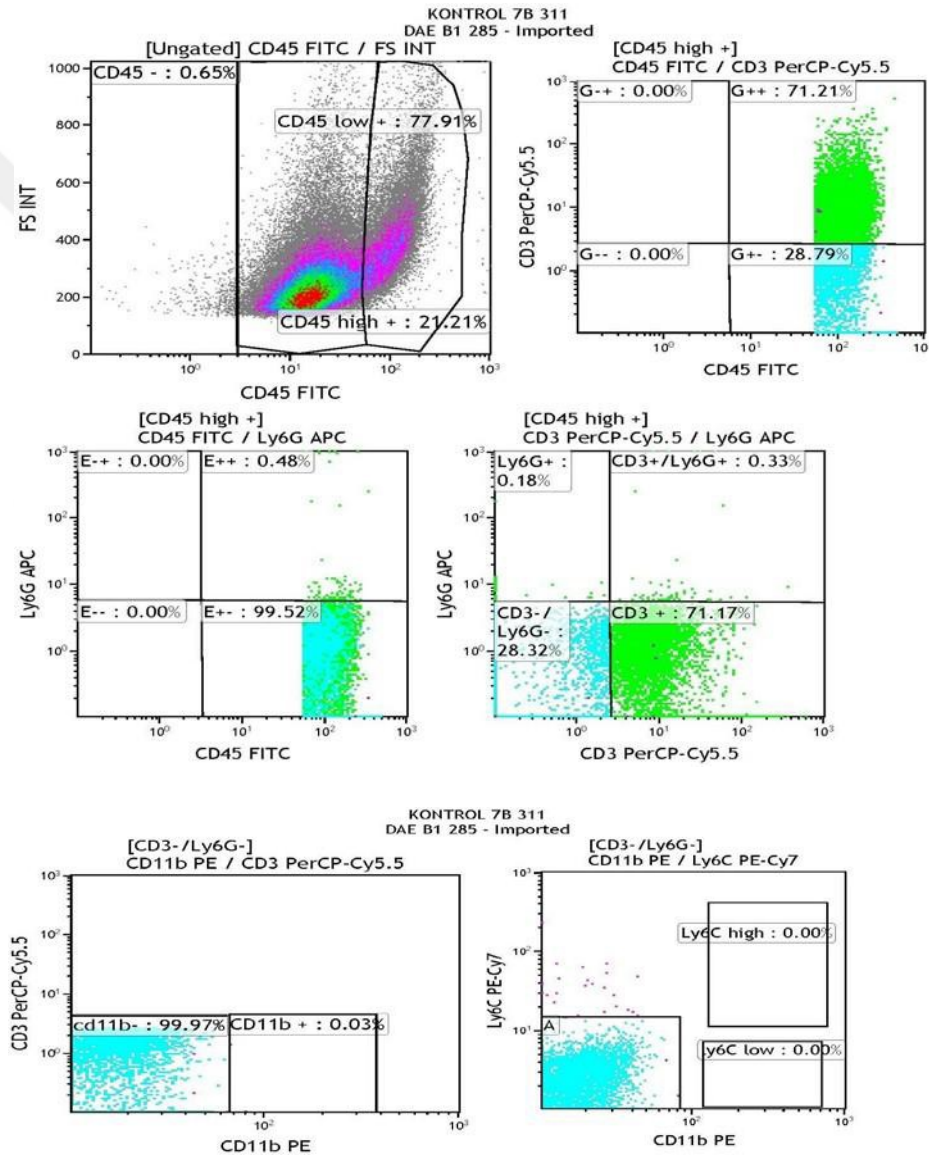
Şekil 3.15 : Sağlıklı kontrol 5 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 5. fare beyinde ki immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.15 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.44, CD45^{soluk} pozitif oran %76.01, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %23.38 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %23.38'lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %75.37, Ly-6G %3.42 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %28.80'lik popülasyondan kapılama ile CD11b %0.58, Ly6C^{soluk} pozitif %0.00 ve Ly6C^{parlak} pozitif %0.00 oranı elde edilmiştir.



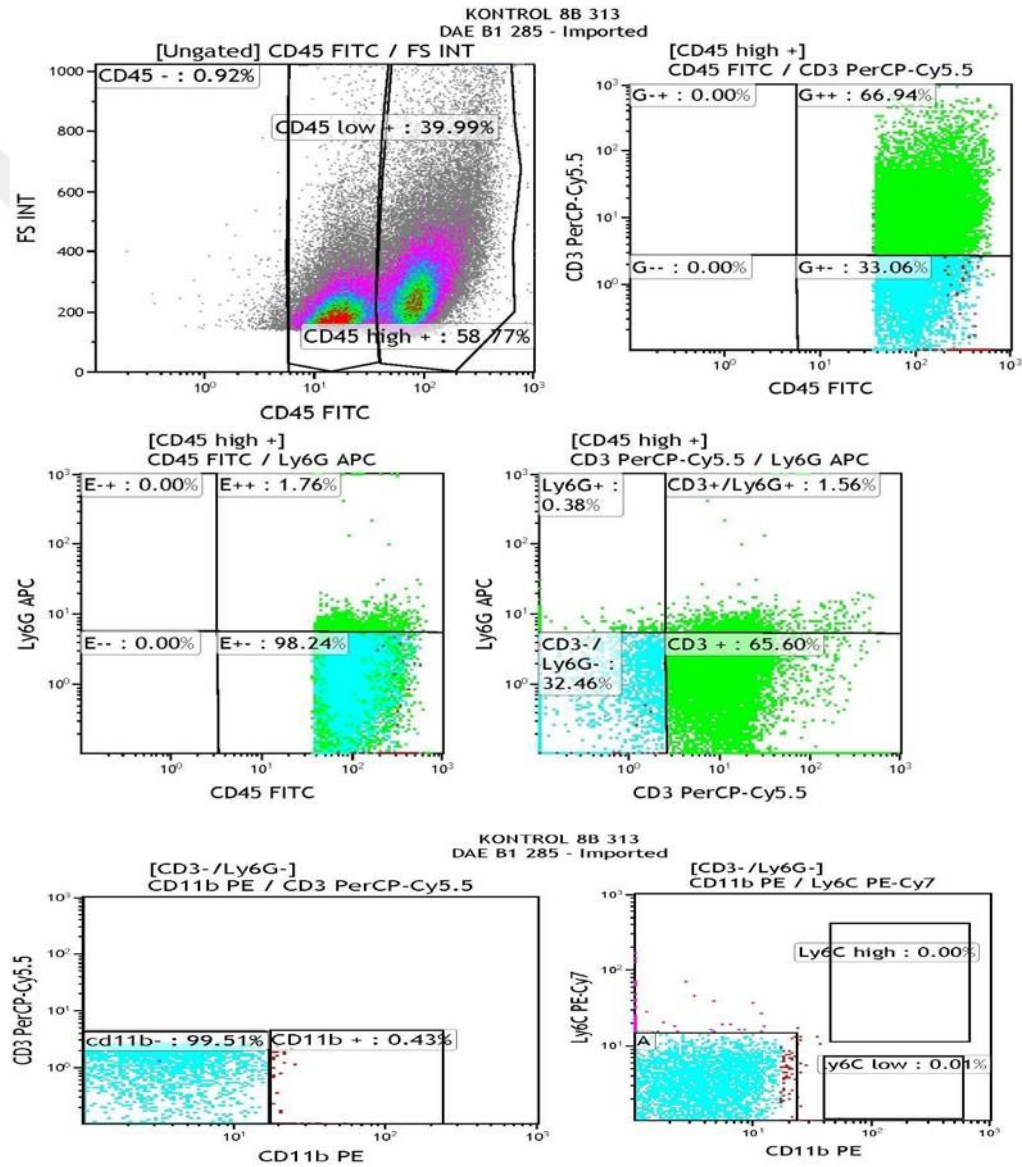
Şekil 3.16 : Sağlıklı kontrol 6 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 6. fare beyinde ki immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.16 da gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %1.01, CD45^{soluk} pozitif oran %76.90, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %22.15 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %22.15’lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %68.84, Ly6G %0.23 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %30.68’lik popülasyondan kapılama ile CD11b %0.78, Ly6C^{soluk} pozitif %0.00 ve Ly6C^{parlak} pozitif %0.00 oranı elde edilmiştir.



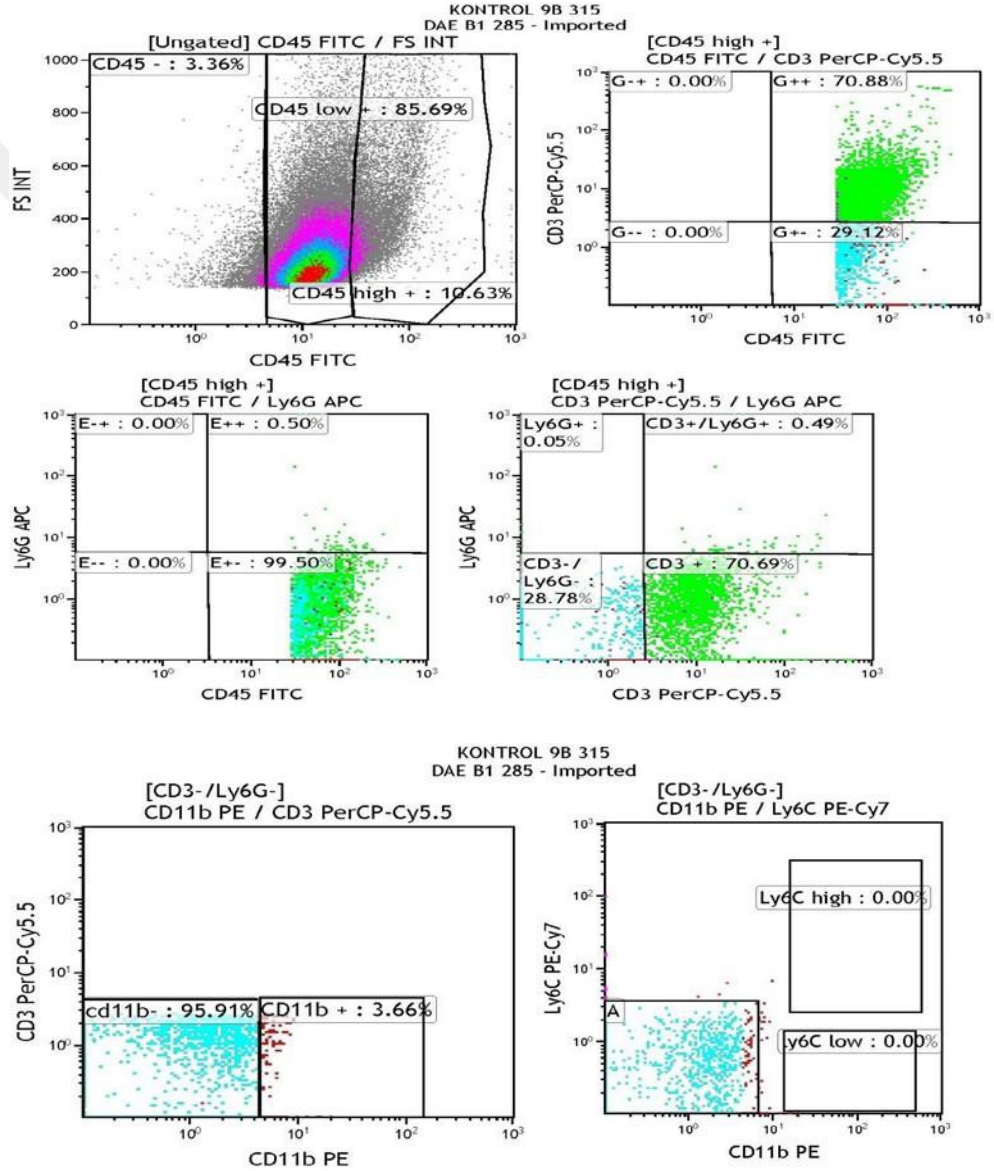
Şekil 3.17 : Sağlıklı kontrol 7 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 7. fare beyinde ki immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.17 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %0.65, CD45^{soluk} pozitif oran %77.91, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %21.21 olarak değerlendirilmiştir. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %21.21'lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %71.21, Ly6G %0.48 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %28.32'lik popülasyondan kapılama ile CD11b %0.03, Ly6C^{soluk} pozitif %0.00 ve Ly6C^{parlak} pozitif %0.00 oranı elde edilmiştir.



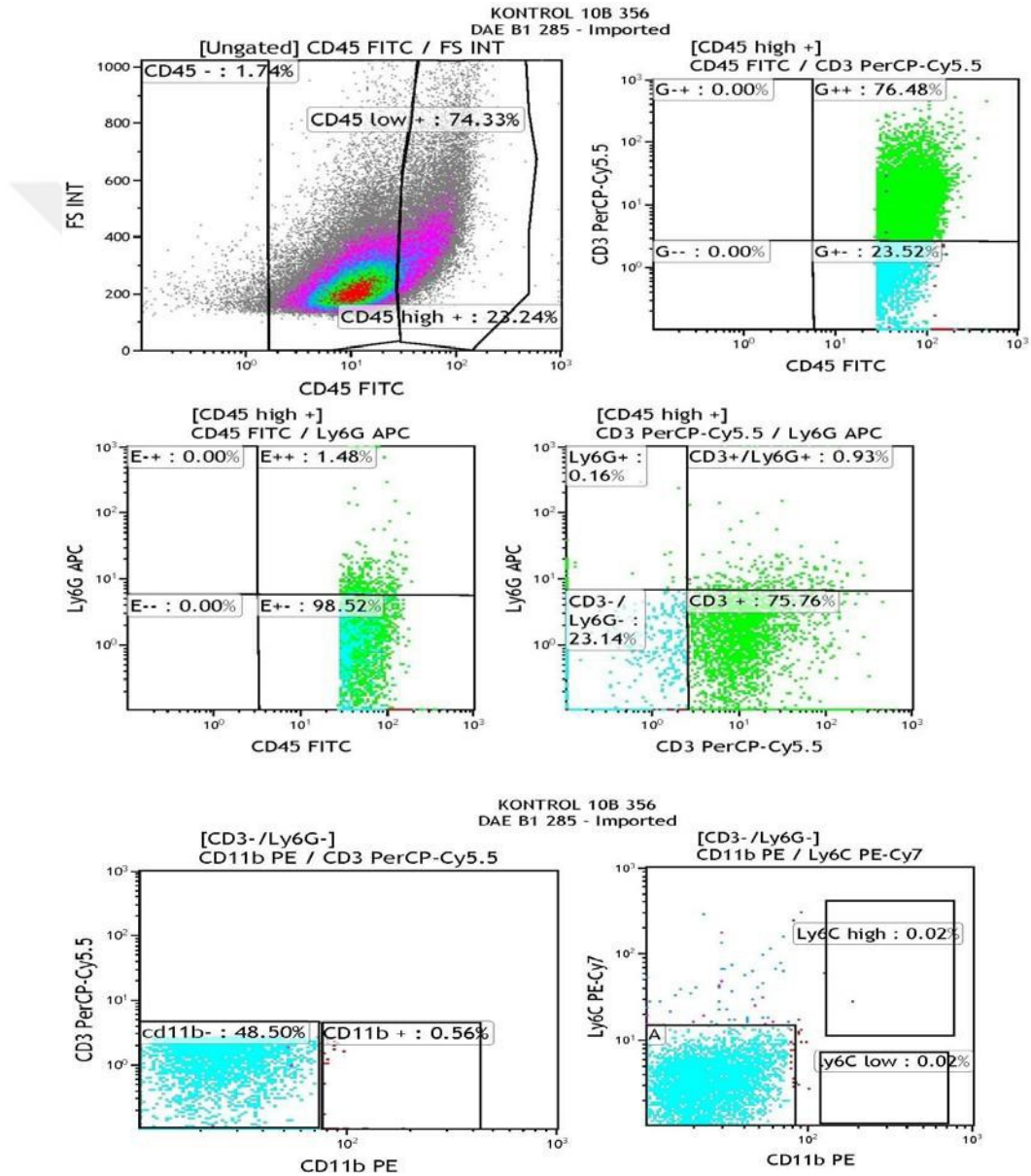
Şekil 3.18: Sağlıklı kontrol 8 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 8. fare beyninden immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.18 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif oran %0.92, CD45^{soluk} pozitif oranı %39.99, CD45^{parlak} pozitif oran %58.77 olmuştur. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %58.77'lik bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %66.94, Ly-6G %1.76 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly6G- olan bölge %32.46'lık popülasyondan kapılama ile CD11b %0.43, Ly-6C^{soluk} pozitif %0.01 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %0.00 oranı elde edilmiştir.



Şekil 3.19: Sağlıklı kontrol 9 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

Kontrol grubu 9. fare beynindeki immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile elde edilen sonuca göre; beyne sıızan lökosit kapılaması için CD45 negatif bölge oranı %3.36, CD45^{soluk} pozitif bölge oranı %85.69, CD45^{parlak} pozitif bölge oranı %10.63 olmuştur. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %23.24'lük bölgeden kapılama ile CD3+ olan alan %70.88, Ly-6G+ %0.50 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly-6G- olan bölge %28.78'lik popülasyondan kapılama ile CD11b + %3.66, Ly-6C^{soluk} pozitif %0.00 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %0.00 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.20: Sağlıklı kontrol 10 beyin hücresine ait monoklonal antikor düzeylerini gösteren flow sitometri çıktısı

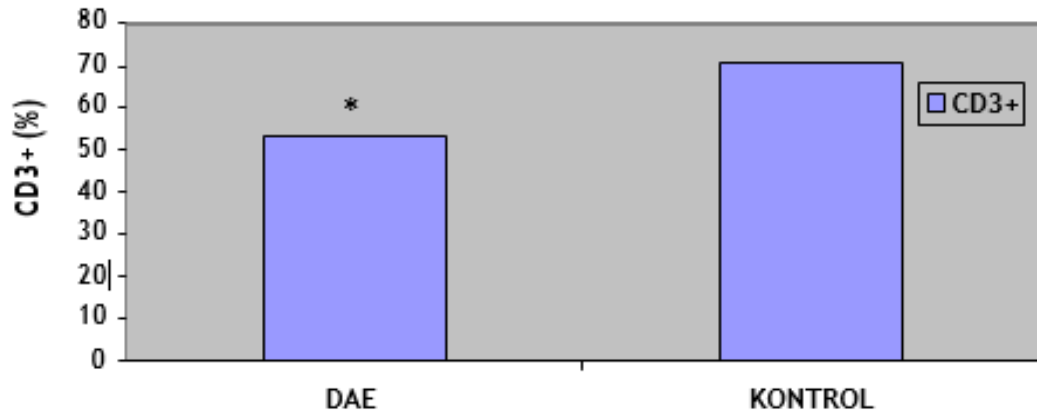
Kontrol grubu 10. fare beyninden immün hücrelerin boyaması ve flow sitometrik analiz ile değerlendirilmesi şekil 3.20 de gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre; beyne sızan lökosit kapılaması için CD45 negatif alan oranı %1.74, CD45^{soluk} pozitif oran %74.33, CD45^{parlak} pozitif oran %23.24 olmuştur. CD45^{parlak} pozitif hücre popülasyonu olan %23.24'lük bölgeden kapılama ile CD3 pozitif olan alan %76.48, Ly-6G %1.48 olarak belirlenmiştir. CD3- ve Ly-6G- olan bölge %23.14'lük popülasyondan kapılama ile CD11b %0.56, Ly-6C^{soluk} pozitif %0.02 ve Ly-6C^{parlak} pozitif %0.02 oranı elde edilmiştir.

	DAE (n=9) (ort.±SD; %)	Kontrol (n=10) (ort.±SD; %)
CD45 -	2,15±3,28	1,37±0,94
CD45^{soluk}	79,12±7,66	72,11±15,42
CD45^{parlak}	18,16±7,51	26,31±15,62
CD3 +	53,47±5,31	70,97±4,87
Ly6G +	1,82±1,78	1,19±1,03
CD11b	97,71±2,01	0,90±1,06
Ly6C^{soluk}	36,77±12,12	0,00±0,00
Ly6C^{parlak}	58,08±9,14	0,00±0,00

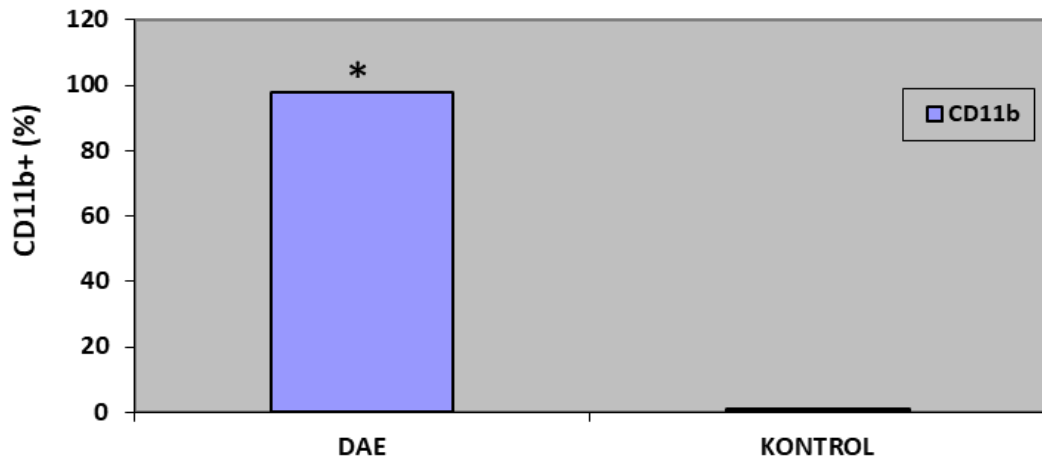
Tablo 3.2: Flow sitometri hücre oranları DAE (n=9), Kontrol (n=10)

Lökosit kapılaması açısından CD45 ile boyanma paterni görülmüş ve hücrelerin oranları çıkarılmıştır. DAE ve kontrol grubu hücrelerin immün alt gruplarının oranları; ortalama, standart sapma değerleri hesaplanmış ve grafikleri oluşturularak karşılaştırılmaları sağlanmıştır. Mikroglial hücrelerin ayrımı CD45^{parlak} pozitif bölge ile yapılarak bu kapılama ile elde edilen T hücre serisini temsilen CD3 +’lik değerler, kontrol grubu beyin hücrelerine göre kısmi düşüklüğü anlamlı saptanmıştır ($p<0.05$). Monositik seri içinde DAE grubunda ki CD11b+ popülasyonunda, Ly-6C+’lerin kontrol grubuna göre yüksekliği istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Nötrofil seriyi temsil eden Ly6G paternin kontrol grup ile arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

a)

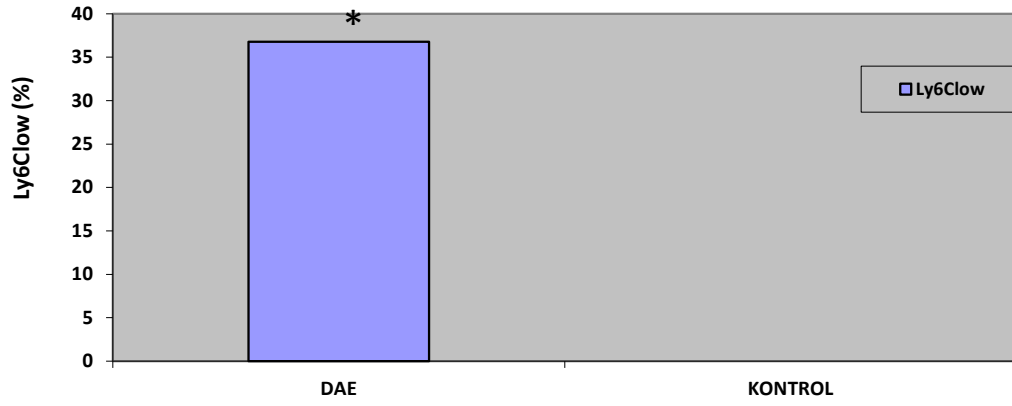


b)

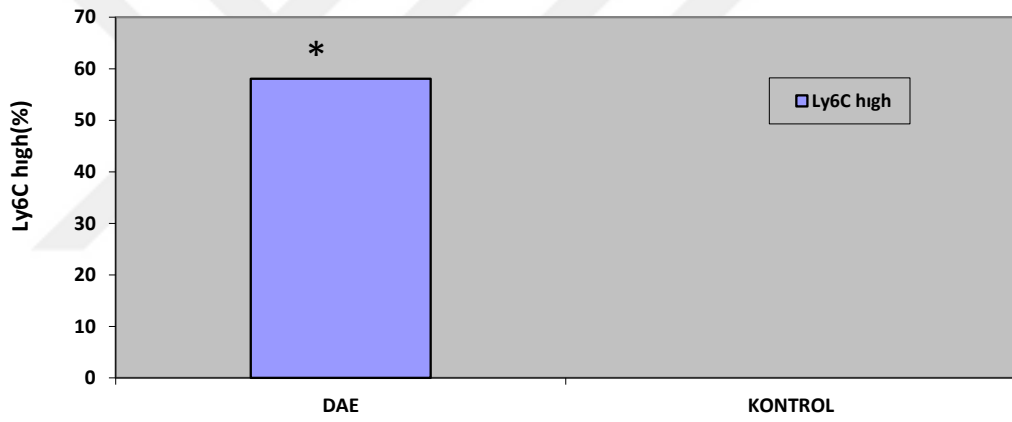


Şekil 3.21: DAE ve kontrol grubunda ki örneklerin a) CD3+ ve b) CD11b hücre oranlarının karşılaştırılması. ((*); $p<0.05$)

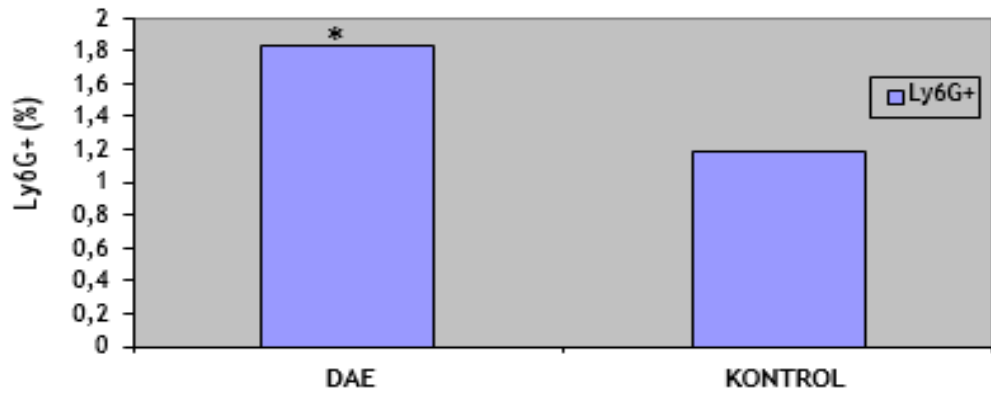
a)



b)



c)



Şekil 3.22: DAE ve kontrol grubunda ki örneklerin a) LyC^{low} b) LyC^{high} ve c) LyG hücre oranlarının karşılaştırılması. ((*): $p < 0.05$)

4. TARTIŞMA

Kan-beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğü, çeşitli besinlerin ve hücrel aracılarn merkezi sinir sistemine geçişlerini doğrudan ve dolaylı olarak belirler ve bu nedenle sağlıklı bireyin önemli bir özelliğini temsil eder. Bununla birlikte, bazı durumlarda KBB'nin bozulması, ciddi fonksiyon bozukluklarına yol açar. Literatürde multipl skleroz yanısıra alzheimer, parkinson, inme ve epilepsi ile KBB bütünlüğü arasında bir ilişki olduğu ve bu patojenik durumlarda KBB bütünlüğünün bozulduğu bildirilmiştir (Wong vd., 2013). Biz de bu çalışmamızda Multipl skleroz hastalığının ayrıntılı olarak incelendiği deneysel hayvan modeli olan Deneysel alerjik ensefalomyelit (DEA) modelinde beyne infiltre eden immün hücrelerini karakterize ederek MS patojenitesinde düzey belirlemede bir markör olarak kullanılabilirliğini tespit etmek istedik.

Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalara rağmen, hala MS'in başlangıç ve ilerlemesinin kesin mekanizmaları bilinmemektedir. MS'yi daha ayrıntılı olarak incelemek için deneysel bir otoimmün ensefalomyelit (DAE) adı verilen bir hayvan modeli oluşturulmuştur (Baxter, 2007). DAE, kemirgenlerde MS özelliklerinin çoğunu taklit eder ve tüm sınırlamalarına rağmen, in vivo hastalığı incelemek için en iyi araç olmaya devam etmektedir. MS'de olduğu gibi, DAE progresyonu, CNS içine infiltre (sızan) edici periferel hücrelerin birikmesi ile de karakterize edilir (Mufazalov ve Waisman, 2015). Bu nedenle, MSS'ne sızan hücrelerin tanınlanması MS/DAE patogenezinin mekanizmalarını anlamak için çok önemli ve vazgeçilmez bir adımdır.

Deneysel alerjik ensefalomyelit multipl skleroz tanı ve tedavisine ait bilgilerimizin önemli bir kaynağını oluşturmaktadır. C57BL/6 türü fareler hastalık oluşturmada yaygın kullanılan bir denektir. MOG₃₅₋₅₅ ise DAE oluşturulurken sıklıkla kullanılan miyelin antijenik yapısıdır. Çalışmamız da sağlıklı farelerden DAE modeli oluşturulmuş, farelerde maksimum skor düzeyi 3,5 olarak saptanmıştır. Özellikle üç farede nörolojik klinik skor daha yüksek olarak izlenmiştir. Bu nedenle deneylerde kullanılan hayvanlar yüksek skorlara ulaşmış denekler olarak seçilmiş, düşük klinik skorlara sahip hayvanlar deneyden çıkarılmış ve kullanılmamıştır.

DAE modelinin MOG₃₅₋₅₅ peptidi ile yapılmasıyla akut kötüleşmeyi izleyen seyir beklenmektedir. (Kuerten S.,vd, 2007). Aynı türe ait bu hayvanlarda MOG₃₅₋₅₅ in dozu düzenlenerek hastalığın klinik seyri de değiştirilebilir.

2009 yılından beri birim laboratuvarımızca DAE modeli oluşturulmakta ve kullanılmaktadır (Özden, 2011; Özden-Acar vd., 2016). Skorun yüksek değerde oluşması için immünizasyon protokolü gözden geçirilerek modelin tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir. Litaretürde çalışmamızda belirtilen dozlarda DAE modeli oluşturulmaktadır (Berard JL. vd., 2010).

Bu çalışmamız da imünolojik olarak değerlendirme beyin örnekleri ile yapılmıştır. Öncelikle hem sağlıklı hemde hasta deneklerde beyin dokusunun olumlu bir şekilde kullanılabilmesi amacıyla hayvanlar sakrifiye edildikten hemen sonra kardiyak perfüzyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlem dokularda interferans olarak kalan kan dokusunun uzaklaştırılmasına ve sağlıklı sonuçlar elde edilmesine çok önemli bir adım olduğu yaptığımız deneylerde teyit edilmiştir. Kardiyak perfüzyonun iyi yapılamadığı deneklerden alınan dokularda hücre boyamaları karmaşık sinyaller üretmiş ve analizler sağlıklı olmamıştır. Bu nedenle, deney sürsince kardiyak perfüzyonun iyi olmadığı deneklerde kullanılmamıştır. Bu basamağın önemi bu çalışma ile birkez daha ortaya konmuştur. Bu nedenle, çalışmamızda kanda ki doğal ve kazanılmış immün hücrelerin beyin dolaşımındaki lökositlerle karışmasını önlemek için kapsamlı bir transkardiyal perfüzyon işlemi uygulanmıştır. Perfüzyon sırasında farelerin burun deliklerinden izotonik sıvı akışı izlenmiş basıncın yüksek olarak sağlandığı gözlemlenmiştir. Bu sayede dekapite edilen beyin dokusunun soluk veya beyaz olması çok iyi perfüzyon sağlandığını göstermiştir.

Perfüze edilmiş hücrelerden elde edilen dokulardan hücre yüzey antikorları ile hücreler boyanmış ve flow sitometrik analiz ile hücre oranları belirlenmiştir. DAE beyinindeki lökositlerin izolasyonu için basit ve etkili bir yöntem uygulanmıştır.

İşlem basamaklarımızda ki bir diğer önemli nokta beyin dokusunun verimli izolasyonudur. Mekanik parçalanma hücre süzgecinden yada jilet ile dokunun küçültülerek, proteazların etkinliğini artırmak için kritik öneme sahiptir. Doku homojenizasyonunda aşırı basıncı önlemek, otolize karşı oldukça önemlidir (Cardona, AE., vd.2006).

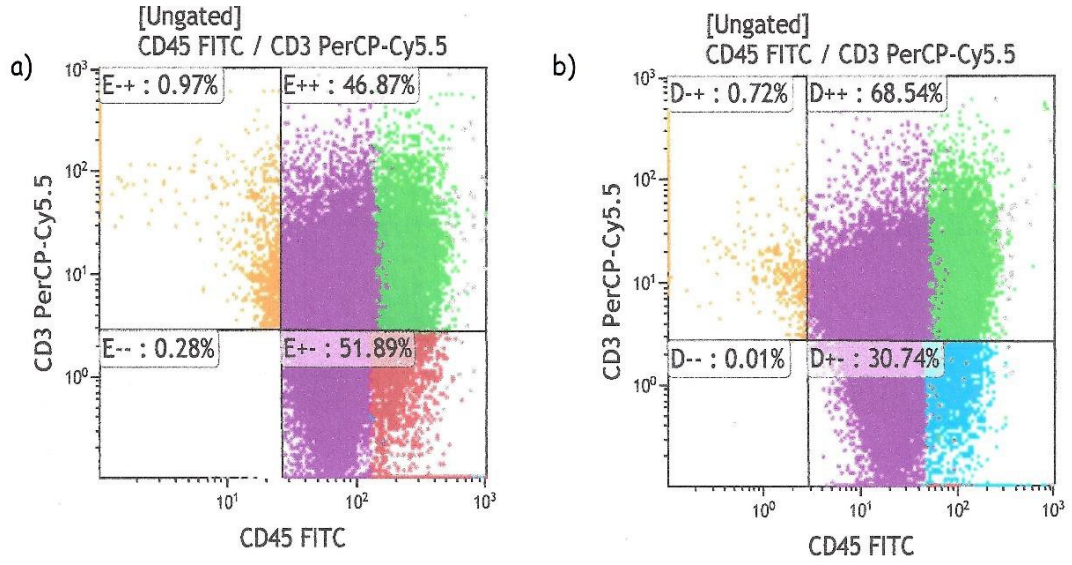
Hücrelerin izolasyonu için literatürdeki prosedür kısmen değiştirilerek ve optimize edilerek bu çalışmada kullanılmıştır (Pösel,C.,vd. 2016). Oluşturulan protokolün en büyük avantajlarından biri de tek katmanlı yoğunluk gradiyentinin kullanılmasıdır. Bu zaman almayan ve aşırı hazırlık gerektirmeyen bir yöntemdir. Deneyimli olmayan araştırmacılar tarafından gerçekleştirildiğinde bile güvenilir sonuç verebilecek bir protokoldür. Tüpler içinde yoğunlukları birbirine yakın katmanlar arasında ki arayüzü bozmadan pipet ile rahatça ayrılmaktadır.

Hücresel bağışıklık elemanlarını analiz etmek için en güçlü yöntem çok renkli flow sitometridir. Sistem genetik manipülasyon ve etiketlemeye ihtiyaç duymadan immün hücre alt gruplarını tanımlanmasına ve miktarının belirlenmesine yardımcı olur (Möller, K., ve ark. 2012). Günümüzde, inflamasyon sırasında farklı monosit türevli hücre popülasyonlarının belirgin şekilde tanımlamak için çeşitli yüzey antikorlarının kombinasyonuna ihtiyaç vardır (Prinz, M.vd. 2011).

Monosit ve makrofajlar arasındaki fenotipik ve fonksiyonel heterojenliğin saptanması sayesinde, mononükleer fagositlerin rolü ve inflamasyonunun çözülmesi hakkında bilgi önemli ölçüde artmıştır. Farelerde, dolaşımdaki monositlerin lenfosit antijen 6 kompleksi kendi yüzey ekspresyonu için uygun iki farklı alt grup halinde sınıflandırılabilir (Geissmann, F., vd. 2008).

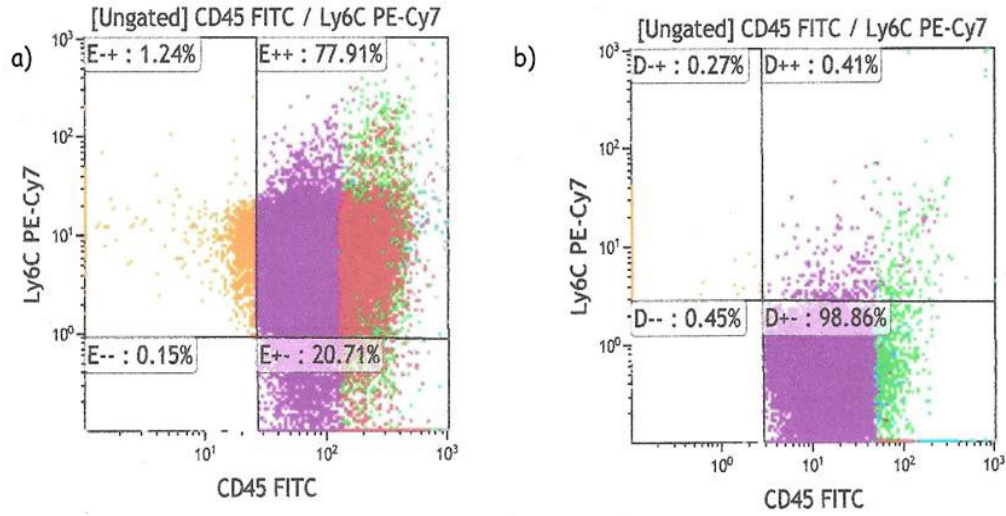
Beyne sızan lökositler CD45^{parlak} pozitif hücreler olarak tanımlandı. CD45^{parlak} popülasyonunda polimorfonükleer nötrofiller (PMN) Ly6G ekspresyonu ile tanımlanırken, T lenfositleri CD45^{parlak} kapılamasından CD3 + hücreleri olarak tasvir edildi. CD45^{parlak} pozitif hücreleri daha sonra Ly-6G ve CD3 negatif alanda CD11b + ayırt edildi. CD11b fraksiyonu ayrıca parlak pozitif alana düşen Ly-6C ile monositleri, düşük pozitiflik alana düşen Ly-6C'ler ile makrofajlar, dendritik hücreler (DC) ve enflamatuvar monositleri kapsayan popülasyon belirlenmiştir.

DAE beyin hücrelerinde CD45^{parlak} pozitif hücrelerden kapılama ile elde edilen CD3 +'lık değerler, şekil 4.1' de gösterildiği gibi kontrol grubu beyin hücrelerine göre kısmi düşüklüğü anlamlı saptanmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.1: a) DAE grubu $CD45^{\text{parlak}}-CD3+$ ortalama değeri, b) Kontrol grubu $CD45^{\text{parlak}}-CD3+$ ortalama değeri

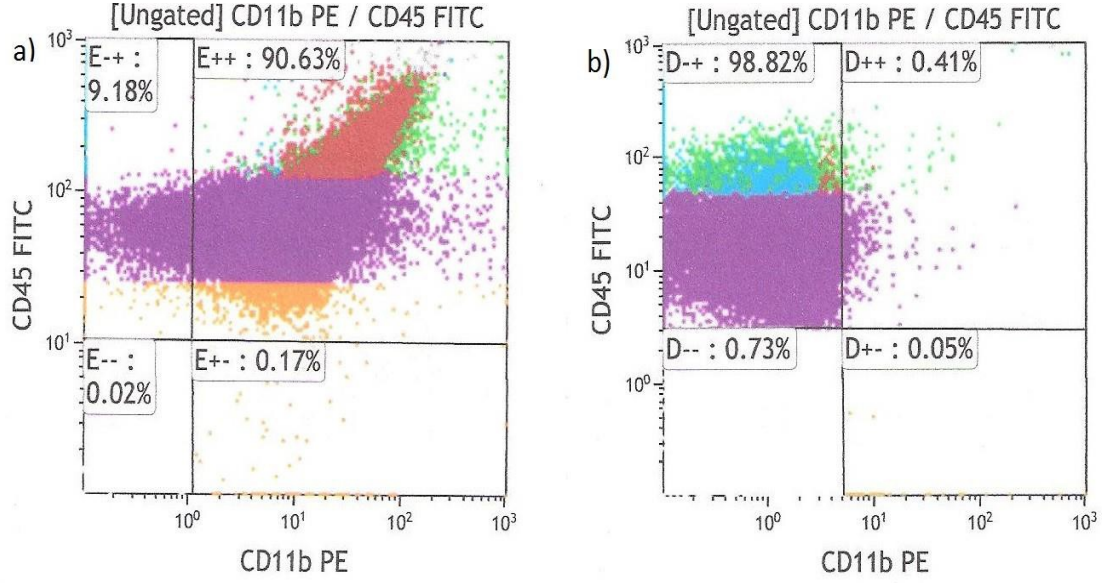
Ancak bu durum MS patogenezi ile uyuşmayan bir durumdur. Çünkü MS ve DAE modelinde $CD3+$ hücrelerin (Yani T hücrelerinin) arttığı bildirilmektedir (Arnet, 2016). Ancak bu tanımlamalar daha çok periferik kan örneklerini kapsamaktadır ve beyin örneklerinde T hücre popülasyonlarının geçişlerinde çoklu mekanizmalar olduğu ve bu nedenle farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Kyran vd., 2018). Bu nedenle de doğrudan T hücre tanımlamaları kullanılmamaktadır. Bizim çalışmamızda bu anlamlı azalışın bir başka nedeni kullanılan antikorların farklı kontaminantları tanınması da olabilir. Bunun belirlenmesi için yapılması gereken çalışmalar bu tez kapsamında olmadığı için ve bütçe yetersizliklerinden bu testler gerçekleştirilememiştir. MS ve DEA progresyonunda anlamlı olarak arttığı bildirilen $CD45^{\text{parlak}}$ popülasyondaki $CD11b+$ hücrelerin artışı bu çalışmamızda da DAE popülasyonunda Ly-6C+ kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik göstermiştir ($p<0.05$) (Pösel,C., vd. 2016).



Şekil 4.2: a) DAE grubu CD45^{parlak}-Ly6C⁺ ortalama değeri, b) Kontrol grubu CD45^{parlak}-Ly6C⁺ ortalama değeri

Şekil 4.2’ de gösterilen Ly6C pozitif popülasyonları beyne geçen makrofaj ve monosit popülasyonlarını göstermektedir ki DAE grubunda kontrole göre aşırı bir artış gözlenmiştir. Bu da makrofajların MS enflamasyonunda önemli bir aracı olduklarını göstermektedir. CD11b⁺-Ly6C⁺ hücreleri, T hücresi tepkilerini baskılayan ve demiyelinizan hastalığın ilerlemesini etkileyen miyeloid türevli hücreler olduğu literatürde de belirtilmiştir (Olson ve Glazer, 2010). Bizim de çalışmalarımızda DEA modelinde CD11b⁺-Ly6C⁺ hücreleri kontrole oranla çok aşırı düzeylerde artış etmesi benzer etkileri gösterdiğini önermektedir.

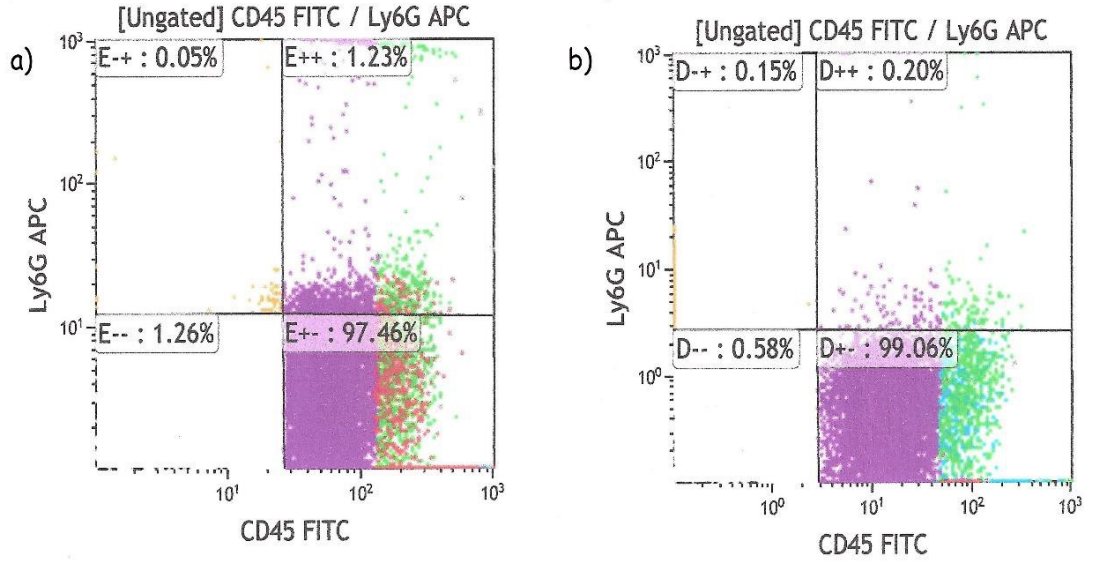
Bu çalışmamızda da şekil 4.3’ de gösterildiği gibi kontrol denek beyinlerinde %1’in altında olan CD45^{parlak}-CD11b⁺ hücre oranı DAE hasta deneklerde %90’ın üzerinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar da çalışmamızda elde edilen verilerin doğruluğunu göstermektedir.



Şekil 4.3: a) DAE grubu CD45^{parlak}-CD11b+ ortalama değeri, b) Kontrol grubu CD45^{parlak}-CD11b+ ortalama değeri

CD11b, CR3 heterodimeri oluşturmak için CD18 ile çiftleşen bir integrin aile üyesidir. CD11b, monositler, nötrofiller, doğal öldürücü hücreler, granülositler ve makrofajlar gibi birçok lökositlerde ifade edilir. Fonksiyonel olarak, CD11b enflamatuvar cevaba aracılık etmek için lökosit adhezyonunu ve göçünü düzenler (Kawai vd., 2005). Çeşitli adezyon reaksiyonlarında rol oynamanın yanı sıra, CD11b kompleman kaplı partikül tutulumuna aracılık eden kompleman C3bi için de bir reseptördür. CD11b antikorları kullanılarak yapılan araştırma, CD11b'nin, hücre aracılı sitotoksiste, kemotaksis ve fagositozda olası rolleri olan, fibrinojen gama zinciri, faktör X ve ICAM1 için bir reseptör olarak tanımlamıştır. Bizim de çalışmalarımızda DEA modelinde bu hücrelerin artışını tespit etmemiz beyin dokusuna lökosit adhezyonu ve göçünün arttığını ve hastalık patogenezinde yer aldığını göstermektedir.

Çalışmamız da Ly-6G nötrofillerin yüzde artışını göstermektedir. Şekil 4.4' de gösterildiği gibi Ly6G markerlarının hastalık oluşturan bireylerde kısmi değişiminin olduğunu, immünolojik olarak katkısının sınırlı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.4: a) DAE grubu CD45^{parlak}-Ly6G⁺ ortalama değeri, b) Kontrol grubu CD45^{parlak}- Ly6G⁺ ortalama değeri

Araştırması yayınlanan bir çalışmada, bizim protokolümüze benzer bir şekilde 6-8 haftalık C57BL/6 erkek farelerde MOG₃₅₋₅₅ peptidi ile DAE oluşturularak, nörolojik bozulmanın erken dönemi, pik yaptığı dönem, kronik dönem ve düzelme döneminde fareler incelenmiştir. Lökositler içinde nötrofiller değerlendirildiğinde hastalığın erken döneminde artış göstermekte, pik yaptığı dönemde devam etmekte kronik ve düzelme aşamasında düşüş olmasına karşın normale göre yüksekliğini sürdürmektedir. Nötrofillerin diğer hücrelere göre oranı %5.5, hastalık başlangıcında %17, pik döneminde %22 ve gözlemde %7.3 olarak ölçülmektedir (Wu F., vd. 2010).

Özetle, bu protokol MSS'ye sızan lökositler ve immün alt grupları için beyinin izolasyonu sayesinde kolay ve güvenilir bir sonuç sağlar. Gelecekte ki uygulamalar için modelin moleküler mekanizmasını anlamada ve klinik bulguları daha detaylı tespit etmede de önemli katkı sağlayacaktır.

5. SONUÇLAR

1. Deneysel alerjik ensefalomyelit modeli belirtilen protokol ile oluşturulmuştur.
2. Nörolojik takip ile belirtilen skorlamada en yüksek skoru alan farelerin 3,5 olduğu belirlenmiştir, hasta olan farelerin sağlıklılar ile karşılaştırıldığında nörolojik kötüleşmenin kaydı gözlemlenmiştir.
3. İmmünolojik değerlendirmede lökosit kapılaması yapılmış ve mikrogliya hücrelerinin ayrımı sağlanmıştır.
4. DAE’de immünopatogenezinin yüksek oranda monosit etkisi gözlemlenmiştir
5. Makrofajlar açısından pozitifliğin DAE’de artış sağladığı, dentrik hücreler ve inflamatuvar monositler açısından etkisinin pozitif olarak seçici şekilde göstermiştir.
6. DEA oluşturulmuş fare beyin dokularında kullanılan kapılama stratejisiyle belirlenecek CD11b+Ly6C+ hücrelerin hastalığın progresyonunu belirlemek için kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada oluşturulan protokol ve kapılama ile DAE/MS progresyonunun tanımlanabileceği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., “*Cells and Tissues of the Immun System*”, In Abbas, A.K., Lichtman, A.H., “*Cellular and Molecular Immunology*”, 5th ed. W.B.Saunders Company: 16-41, (2003).

Ackerman, K.D., R. Heyman, B.S. Rabin, B.P. Anderson, P.R. Houck, E. Frank, and A., Baum, “Stressful life events precede exacerbations of multiple sclerosis”, *Psychosom Med*, 64 (6): p. 916-20, (2002).

Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis, *Neurology*, 46 (4): p. 907-11, (1996).

Alice Longabardi Givan, *Flow Cytometry First Principles*, Wiley-Liss, Inc., N.Y., s1-41, (1992).

Allegretta, M., Nicklas, J.A., Sriram, S., Albertini, R.J., “T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis”, *Science*; 247 (4943): 718-21, (1990).

Altıntaş, A., “Multipl sklerozun immünopatogenezi ve patolojisi”, *Türkiye Klinikleri J.Neurol-Special Topics*, 2 (2): p. 1-8, (2009).

Arneth, B., “Activated CD4+ and CD8+ T Cell Proportions in Multiple Sclerosis Patients”, *Inflammation*; 39 (6): 2040-2044, (2016).

Ascherio, A., Munger, K., “Epidemiology of Multiple Sclerosis: From risk factors to prevention”, *Seminers in Neurology*; 28 (1): 17-28, (2008).

Ascherio, A., and K.L., Munger, “Environmental risk factors for multiple sclerosis”, Part I: the role of infection, *Ann Neurol*, 61 (4): p. 288-99, (2007).

Barnett, M.H., Henderson, A.P., Prineas, J.W., “The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion.” *Mult Scler*, 12: 121-132, (2006).

Berard, J.L., Wolak, K., Fournier, S., David, S., “Characterization of relapsing–remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice”, *Glia*; 58 (4): 434-45, (2010).

Baxter, A.G., “The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Nat Rev Immunol*, 7: 904–912, (2007).

Biermann, H., Pietz, B., Dreier, R., Schmid, K.W., Sorg, C., Sunderkötter, C., “Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors”, *J.Leukoc Biol*; 65 (2): 217-31, (1999).

Brunner, R., Jensen-Jarolim, E., Pali-Schöll, I., “The ABC of clinical and experimental adjuvants-A brief overview”, *Immunol Lett*; 128 (1): 29-35, (2010).

Cardona, A. E., Huang, D., Sasse, M. E., Ransohoff, R. M., “Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry”, *Nature protocols*, 1, (4), 1947-1951, (2006).

Compston, A. and A. Coles, Multiple sclerosis, *Lancet*, 359 (9313): p. 1221-31, (2002).

Compston, A. and A. Coles, Multiple sclerosis, *Lancet*, 372 (9648): p. 1502-17, (2008).

Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K. and Gran, B., “Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)”, *Br. J. Pharmacol*, 164 (4): 1079–1106, doi: 10.1111/j.14765381.2011.01302, (2011).

Cook, S.D., “Does epstein-barr virus cause multiple sclerosis?”, *Rev Neurol Dis*, 1 (3): p. 115-23, (2004).

Cusick, M.F., Libbey, J.E., Fujinami, R.S., “Multiple sclerosis: autoimmunity and viruses”, *Current opinion in rheumatology*, 25 (4): 496-501, doi: 10.1097/BOR.0b013e328362004d, (2013).

Cho, E.Y., Bae, Y., Lee, D.S., Park, S.H., “T-T interaction during thymic selection, Cellular and Molecular Biology”, 47: 135-143, (2001).

Dendrou, C.A., Fugger, L., Friese, M.A., “Immunopathology of multiple sclerosis”, *Nature Review Immunology*, 15: 545-558, (2015).

Dobson, R., Giovannoni, G., “Multiple Sclerosis: Visual Guide for Clinicians”, <http://www.neuronlines.com/tr/neuropedia/neurokutuphane/detay/multiple-sclerosis-visual-guide-for-clinicians>.

Encephalomyelitis, *Nat Rev Immunol*, 7 (11): 904-12, (2007).

Endothelial Cells, *J. Neurosci Res*; 86 (12): 2624-40, (2008).

Eraksoy. M., Akman Demir, G., “Merkez sinir sisteminin miyelin hastalıkları”, A. Emre ÖGE (editör), İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, Nöroloji, İstanbul: Nobel Kitabevi, 505-535.

Feinstein, A., “The clinical neuropsychiatry of multiple sclerosis”, *CNS Spectr*, 10 (5): p. 362, (2005).

Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., Mills, K.H., “T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Clin Exp Immunol*, 162: 1–11, (2010).

Fletcher, J.M., S.J.Lalor, C.M., Sweeney, N., Tubridy and K.H., Mills, “T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Clin Exp Immunol*, 162 (1): p. 1-11, (2010).

Freund, J., McDermott, K., “Sensitisation to horse serum by means of adjuvants”, *Proc Soc Exp Biol*; 49: 548-53, (1942).

Gale, C.R., “Martyn CN.Migrant studies in multiple sclerosis”, *Prog Neurobiol*, 56; 47: 425-48, (1995).

Gandhi, R., A. Laroni, and H.L., Weiner, “Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis”, *J.Neuroimmunol*, 221 (1-2): p. 7-14, (2010).

Geissmann, F., *et al.*, “Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses”, *Immunology and cell biology*, 86, (5), 398-408, (2008).

Giunti, D., Borsellino, G., Benelli, R., Marchese, M., Capello, E., Valle, M.T., Pedemonte, E., Noonan, D., Albin, A., Bernardi, G., Mancardi, G.L., Battistini, L., Uccelli, A., “Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS”, *Journal of Leukocyte Biology*, 73 (5): 584-590 doi:10.1189/jlb.1202598, (2003).

Gold, R., Linington, C., Lassmann, H., “Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research”, *Brain*, 129: 1953–1971, (2006).

Goverman, J.M., “Immune tolerance in multiple sclerosis”, *Immunol Rev*, 241 (1): p. 228-40, (2011).

Granchi, D., Cenni, E., Verri, E., Ciapetti, G., Gamberini, S., “Flowcytometric analysis of leukocyte activation induced by polyethyleneterephthalate with and without pyrolytic carbon coating”, *J Biomed Mater Res*, 39, 549–553, (1998).

Gumley, T.P., McKenzie, I.F., Sandrin, M.S., “Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules”, *Immunol Cell Biol*; 73 (4) 277-96, (1995).

Hafler, D.A., J.M., Slavik, D.E., Anderson, K.C., O'Connor, P., De Jager, and C. Baecher-Allan, Multiple sclerosis. *Immunol Rev*, 204: p. 208-31, (2005).

Hauser, S.L., Goodin, D.S., “Multiple Sclerosis And Other Demyelinating Diseases”, In: Harrison’s Principles of Internal Medicine, (Eds.), DI Kasper, E., Braunwald, As Fauci, S.I., Hauser, D.I., Longo, J.I., Jameson, 16th Ed., *Mcgraw -Hill Comp.*, NewYork: 2461-2470, (2005).

Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B., Hartung, H.P., “Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis”, *Nat Clin Pract Neurol*, 2: 201–211, (2006).

Heneka, M.T., Kummer, M.P. and Latz, E., “Innate immune activation in neurodegenerative disease”, *Nat. Rev. Immunol*, 14: 463–477, (2014).

Hohlfeld, R., Londei, M., Massacesi, L., Salvetti, M., “T-cell autoimmunity in multiple sclerosis”, *Immunol Today*; 16 (6), 259-61, (1995).

Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., “Cellular mechanisms of IL 17 induced blood brain barrier disruption”, *The Faseb Journal*, 24: 1023-1034, (2010).

Kawai, K., Tsuno, N.H., Matsushashi, M., Kitayama, J., Osada, T., , Yamada, J., Tsuchiya, T., Yoneyama, S., Watanabe, T., Takahashi, K., Nagawa, H., “CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells” *J.Allergy Clin Immunol*, 116 (1): 192-197, (2005)

Kipps, T.J., “Flow Cytometry, Williams Hematology”, (ed: Beutler, E, Lichtman, M.A., Coller, B.S.)’de, *McGraw-Hill Inc USA*; s.L56-L63, (1995).

Kuerten, S., Kostova-Bales, D.A., Frenzel, L.P., Tigno, J.T., Tary-Lehman, M., Angelov, D.N., Lehman, P.V., “MP4- and MOG: 35-55- induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal kord and cerebellum”, *J. Neuroimmunol*; 189: 31-40, (2007).

Kyran, E.L., Robinson, C., Kocovski, P., Li, Z.J., Dang, P.T., Hale, M.W., Orian, J.M., “Multiple pathological mechanisms contribute to hippocampal damage in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis”, *NEUROREPORT*, Volume: 29 Issue: 1 Pages: 19-24.

Li, N., Hallden, G., Hjemdahl, P., “A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte CD11b expression using fluorescence signal triggering”, *Eur. J. Haematol.*, 65: 57-65, (2000).

Link, H. and Y.M., “Huang, Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid : an update on methodology and clinical usefulness”, *J.Neuroimmunol*, 180 (1-2) : p. 17-28, (2006).

Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H. et al. “Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis”, *Nat. Med.*, 8: 500-508, (2002).

Lu, C., Pelech, S., Zhang, H., Bond, J., Spach, K., Noubade, R., Blankenhorn, E.P., Teuscher, C., “Pertussis Toxin Induces Angiogenesis in Brain Microvascular endothelial cells”; 86(12): 2624-40, (2008).

Lublin, F.D. and S.C. Reingold, “Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey”, National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis, 46(4): 907-11, (1996).

Macey, M.G. (Ed.), “Flow Cytometry Humana Press”, Inc.: Chapter 2 , p51, (2007).

Macey, M.G. (Ed.), “Flow Cytometry 2007 Humana Press”, Inc.: Chapter 2, pp 46-50, Marrie, R.A., “Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology”, *Lancet Neurol*, 3 (12): p. 709-18, (2004).

McAlpine, D., Compston, A., “McAlpine's multiple sclerosis: Elsevier Health Sciences; (2005).

McFarland, H.F., Martin, R., “Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity”, *Nat Immunol*, 8: 913–919, (2007).

Melcon, M.O., Correale, J., Melcon, C.M., “Is it time for a new global classification of multiple sclerosis?”, *Journal of the Neurological Sciences*, 344, 171-181, (2014).

Mikita, J., Dubourdieu-Cassagno, N., Deloire, M.S., Vekris, A., Biran, M., Raffard, G., Brochet, B., Canron, M.H., Franconi, J.M., Boiziau, C., Petry, K.G., “Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration”, *Multiple Sclerosis*, 17: 2–15, (2011).

Miller, A.E., Lublin, F.D., Coyle, P.K., “*Epidemiology and genetics*”, In Miller, A.E., Lublin, F.D., Coyle, P.K., “*Multiplesclerosis in Clinical Practise*”, London-Newyork., MartinDunitz Publishing; 31-5, (2003).

Milo, R., Miller, A., “Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis”, *Autoimmun Rev*, 13: 518–524, (2014).

Milo, R., Kahana, E., “Multiplesclerosis: geoepidemiology, geneticsandthe 560 environment”, *Autoimmun Rev*; 9: A387-94, (2010).

Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Zettl, U.K., “Animal models of multiple sclerosis for the development and validationof novel therapies-potential and limitations”, *J. Neurol*; 255 Suppl 6: 7-14, (2008).

Möller, K., Stahl, T., Boltze, J., Wagner, D. C., “Isolation of inflammatory cells from rat brain tissue after stroke”, *Experimental & translational stroke medicine*, 4, (1), 20 (2012).

Mufazalov, I.A., and Waisman, A., “*Isolation of Central Nervous System (CNS) Infiltrating Cells*”, *Methods in Molecular Biology*, 1304: 73–79, (2015).

Muller, D.M., Pender, M.P., Greer, J.M., “A neuropathological analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant brain stem and cerebellar involvement and differences between active and passive induction”, *Acta Neuropathol*, 100: 174–182, (2000).

Murray, T.J., “Diagnosis and treatment of multiple sclerosis” *BMJ*, 332: 525-527, *J. Epidemiol.*, 162 (8): 774-8, (2006).

Ozgun-Acar, O., Celik-Turgut, G., Gazioglu, I., Kolak, U., et al., “Capparis ovata treatment suppresses inflammatory cytokine expression and ameliorates experimental allergic encephalomyelitis model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice”, *J. Neuroimmunol*, 298: 106-16, (2016).

Olson, J., Glazer, A., “CD11b+Ly6C+ cells, myeloid derived suppressor cells, affect T cell responses during demyelinating disease” *J. Immunol*, 184: 184 (1): 135-138, (2010).

Özgün, Ö., “Capparis ovata ekstresinin deneysel multipl skleroz hayvan modelinde etkisinin moleküler mekanizmalarının araştırılması”, *Fen Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale Üniversitesi*, (2012).

Piaton, G., Williams, A., Seilhean, D., Lubetzki, C., “Remyelination in multiple sclerosis”, *Prog Brain Res*, 175: 453-464, (2009).

Pierson, E., Simmons, S.B., Castelli, L., Goverman, J.M., “Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity”, *Immunol Rev*, 248 : 205-215, (2012).

Pittock, S.J. and M. Rodriguez, “Benign multiple sclerosis: a distinct clinical entity with therapeutic implications”, *Curr Top Microbiol Immunol*, 318: p. 1-17, (2008).

Pösel, C., Möller, K., Boltze, J., Wagner, D.C., Weise, G., “Isolation and Flow Cytometric Analysis of Immune Cells from the Ischemic Mouse Brain”, *J. Vis. Exp*, (108), e53658, doi: 10.3791/53658, (2016).

Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S. S., Ransohoff, R. M., “Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration”, *Nature neuroscience*, 14 (10), 1227-1235, (2011).

Pruitt, S.C., Mielnicki, L.M., Stewart, C., “Analysis of fluorescent protein expressing cells by flow cytometry”, *Methods Mol Biol*; 263: 239-258, (2004).

Schmitt, C., Strazielle, N. and Gherzi-Egea, J.F., “Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain.”, *Journal of Neuroinflammation*, 9: 187, DOI: 10.1186/1742-2094-9-187, (2012).

Schmitt, C., Strazielle, N., Gherzi-Egea, J-F., “Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain”, *Journal of Neuroinflammation*, 9: 187, doi: 10.1186/1742-2094-9-187, (2012).

Sewell, W.A., Cooley, M.A., Hegen, M., “CD 45 workshop panel report”., In: Kishimoto, T., Kikutani, H., eds., *Leukocyte Typing VI*, New York: Garland Publishing; p.499- 501, (1998).

Siva, A., Uygunoğlu, U., Tütüncü, M., Kapımda 100 Hasta Beklerken Multipl Skleroz. 1. Baskı., Sigma Publishing, İstanbul, (2014).

Sospedra, M., Martin, R., “Immunology of multiple sclerosis”, *Annu Rev Immunol*, 23 : 683-747, (2005).

Sriram, S., Steiner I., “Experimental Allergic Encephalomyelitis: A misleading Model of Multiple Sclerosis”, *Ann Neurol*; 58 (6): 939-45, (2005).

Sun, T., Flow Cytometry AND Immunohistochemistry FOR Hematologic Neoplasms, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, USA: Chapter2: p8, (2008).

Tavşanlı, M. and A. Altıntaş, “Multipl skleroz patogenezi ve yenilikler”, *Klinik Gelişim*, 23 (1): p. 61-64, (2010).

Tatsumi, Y., Kumanogoh, A., Saitoh, M., Mizushima, Y., Kimura, K., Suzuki, S., Yagi, H., Horiuchi, A., Ogata, M., Hamaoka, T., “Differentiation of thymocytes from CD3-CD4₊CD8⁻ through CD3-CD4-CD8⁺ into more mature stages induced by a thymic stromal cell clone”, *Proc Natl Acad Sci.*, 87: 2750-2754, (1990).

Visser, L., Poppema, S., “CD 45 workshop: Differential effects of CD 45 reagents on T- cell activation”, In: Kishimoto T, Kikutani H, eds., *Leukocyte Typing VI.*, New York: Garland Publishing; p.502-4, (1998).

Von Büdingen, H.C., Palanichamy, A., Lehmann-Horn, K., Michel, B.A., Zamvil, S.S., “Update on the Autoimmune Pathology of Multiple Sclerosis: B-Cells as Disease-Drivers and Therapeutic Targets”, *Eur Neurol*, 73: 238-246 (DOI:10.1159/000377675), (2015).

Warren, S., S. Greenhill, and K.G., Warren, “Emotional stress and the development of multiple sclerosis: case-control evidence of a relationship”, *J.Chronic Dis*, 35 (11): p. 821-31, (1982).

Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., Searson, P.C., “The blood- brain barrier: an engineering perspective”, *Front Neuro*, eng 6: 7, (2013).

Wu, F., Cao, W., Yang, Y., Liu, A., “Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice”, *Histochem Cell Biol*; 133 (3): 313-22, (2010).

Wu, M., Tsirka, S.E., “Endothelial NOS-deficient mice reveal dual roles for nitric oxide during experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Glia*, 57: 1204-1215, (2009).

Yong, V.W., “Prospects for neuroprotection in multiple sclerosis”, *Frontiers in Biosciences*, 9: 864872, (2004).

Zheng, X.P., Hu, X.Q., Zhou, G.Y., Lu, Z.Q., Qiu, W., Bao, J., Dai, Y.Q., “Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response”, *Journal of Neuroimmunology*, 194: 107-114, (2008).



5.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kemal Ertosun

Doğum Yeri ve Tarihi : Denizli/ 13.07.1989

Lisans Üniversite : PAÜ FenEdebiyat Fakültesi/ Biyoloji Bölümü

Elektronik posta : ertosunkemal@hotmail.com

İletişim Adresi : PAÜ Hastaneleri Merkez Laboratuvarı

Yayın Listesi :

Konferans listesi :