

**T.C**  
**AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ TIP**  
**FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MULTIPLE SKLEROZ HASTALARININ (RELAPSİNG/  
REMİTTİNG) ATAK VE REMİSYON DÖNEMLERİNDE T  
HELPER HÜCRE YÜZEYİNDEKİ İNTEGRİNLERİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan**  
**Dr. Muammer ÜZÜM**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Tülay KÖKEN**

**2025 -AFYONKARAHİSAR**



**T.C.  
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**MULTIPLE SKLEROZ HASTALARININ  
(RELAPSİNG/REMİTTİNG) ATAK VE REMİSYON  
DÖNEMLERİNDE T HELPER HÜCRE YÜZEYİNDEKİ  
İNTEGRİNLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Muammer ÜZÜM  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Tülay KÖKEN**

**Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Birimi tarafından 24.TUS.004 proje ile desteklenmiştir.**

**AFYONKARAHİSAR-2025**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tez Hazırlayanın

Danışmanın

Adı Soyadı: Muammer ÜZÜM

Adı Soyadı: Prof. Dr. Tülay KÖKEN

İmza:

İmza:

## KABUL VE ONAY

T.C.

AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Başlığı:** Multiple Skleroz Hastalarının (Relapsing/Remitting) Atak ve Remisyon Dönemlerinde T Helper Hücre Yüzeyindeki İntegrinlerin Araştırılması

**Tez Hazırlayan** : Arş. Gör. Dr. Muammer ÜZÜM

**Tez Kabul Tarihi** : 29.12.2025

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Tülay KÖKEN

İş bu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI'NDA TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ:

Başkan

Prof. Dr. Tülay KÖKEN

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hayri DEMİRBAŞ

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Özge FENERCİOĞLU

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Necip BECİT

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince engin bilgi birikimi, değerli deneyimleri, yol göstericiliği ve her daim hissettirdiği akademik ve insani desteğiyle gelişimime büyük katkılar sunan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Tülay Köken'e;

Asistanlık eğitimim süresince büyük emekleri, değerli bilgi ve katkılarıyla mesleki gelişimime yön veren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ahmet Kahraman'a, Prof. Dr. Sefa Çelik'e, Prof. Dr. Halit Buğra Koca'ya, Prof. Dr. Müjgan Ercan Karadağ'a, Doç. Dr. Ayhan Vurmaz'a ve Dr. Öğr. Üyesi Özge Fenercioğlu'na;

Tezimde bana yol gösterip katkı sunan, zor durumda kaldığımda desteklerini esirgemeyen Nöroloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Hayri Demirbaş'a, Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Güzel'e ve başta Arş. Gör. Dr. Furkan İncebacak olmak üzere diğer Nöroloji asistanı arkadaşlarıma;

Flow Sitometri çalışmalarında bana her türlü sabrı gösterip yardımcı olan Serap Çağlı ve Keriman Özüğür'a ayrıca birlikte çalıştığım, beraber vakit geçirip dost edindiğim başta Ahmet Çelikkıran olmak üzere laboratuvar personeli arkadaşlarıma;

Dört yıl boyunca her zaman yanımda olan, sevinç ve sıkıntılarımı paylaştığım, arkadaşlığımızın ömür boyu süreceğine inandığım değerli dostum Uzm. Dr. Tarık Aydın'a ve diğer Tıbbi Biyokimya asistanı arkadaşlarıma;

Hayatımın her döneminde yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her adımda bana cesaret vererek bugünlere gelmemi sağlayan başta annem ve babam olmak üzere kıymetli aileme ve kız arkadaşım Şule Fidan'a kalpten ve içten sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Muammer ÜZÜM

Afyonkarahisar, Aralık 2025

**MULTIPLE SKLEROZ HASTALARININ (RELAPSİNG/ REMİTTİNG)  
ATAK VE REMİSYON DÖNEMLERİNDE T HELPER HÜCRE  
YÜZEYİNDEKİ İNTEGRİNLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Muammer ÜZÜM**

**Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya  
Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi  
Aralık 2025**

**Danışman: Prof. Dr. Tülay KÖKEN**

**ÖZET**

**Amaç:** Multiple Skleroz, merkezi sinir sisteminin kronik enflamatuvar demiyelinizan bir hastalığıdır. Hastalığın etyolojisi günümüzde hala netlik kazanmamıştır. Aşırı aktive T yardımcı lenfositlerin periferik kandan kan beyin bariyerini geçip merkezi sinir sisteminde enflamatuvar sitokinler salgılamasının hastalığın nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma, Multiple Skleroz (RR-MS) hastalarının atak döneminde T yardımcı lenfositlerin alt gruplarındaki değişiklikleri ortaya koyarak, bu dönemin periferik kan analizi ile ortaya konulup konulamayacağını araştırmak için planlanmıştır. Bunun için atak ve remisyon dönemindeki RR-MS hastalarının periferik kanında Treg, Th1, Th2, Th17, Th17.1 oranları ve bu hücrelerin kan beyin bariyerini aşır enflamasyonun oluşmasında rolü olduğu düşünülen hücre yüzey integrinlerinden  $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ M $\beta$ 2,  $\alpha$ 4 ve  $\beta$ 3 eksprese eden T yardımcı lenfositlerinin oranları belirlendi.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamız prospektif bir çalışma olarak tasarlanmış olup Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji Anabilimdalı'na başvuran atak döneminde 20 ve remisyon döneminde 20 RR-MS hastası çalışmaya katıldı. Ayrıca herhangi bir akut veya kronik bilinen bir hastalığı olmayan 20 sağlıklı birey de dahil edildi. Gönüllü olan her kişinin periferik venöz kanı alınıp T yardımcı lenfosit oranları ve integrin ekspresyon düzeyleri akım sitometri metodu ile belirlenerek kontrol, atak ve remisyon hasta gruplarında istatistiksel karşılaştırma yapıldı.

**Bulgular:** Üç grupta Ortalama  $\pm$  SS değerlerine sırasıyla bakıldığında total lenfosit düzeyi atak grubunda (%25,73  $\pm$  7,35) kontrol grubuna (%33,05  $\pm$  8,74) göre daha düşük bulundu (p=0.007). Th hücre düzeyi remisyon grubunda (%49,30  $\pm$  9,09) kontrol grubuna (%42,85  $\pm$  6,22) daha yüksek saptandı (p=0.038). Th17.1 hücre düzeyi atak grubunda (%17,47  $\pm$  3,06) kontrol grubuna göre (%14,16  $\pm$  3,24) daha yüksek olduğu tespit edildi (p=0.042). Ayrıca Th2/Th17 oranına bakıldığında atak grubunda (2,16  $\pm$  0,53) kontrol grubuna (3,41  $\pm$  1,02) daha düşük olduğu belirlendi. Th17.1 hücrelerinde  $\alpha$ M $\beta$ 2 ekspresyon düzeyi hem atak (%1,36  $\pm$  0,80) hem de remisyon grubunda (%1,47  $\pm$  1,15) kontrol grubuna (%2,55  $\pm$  1,50) göre daha düşük düzeydeydi (p<0.05). Th1 hücrelerinde  $\alpha$ 4 ekspresyon düzeyi atak grubunda (%77,56  $\pm$  8,68) kontrol grubuna (%83,48  $\pm$  4,78) göre daha düşük düzeydeydi (p=0.027).

**Sonuç:** Multiple Skleroz patogenezinde son yıllarda önemli rol oynadığı düşünölen Th17.1 hücresinin bu çalışmada periferik kanda atak grubunda yüksek düzeyde saptanması ve yine Th2/Th17.1 oranının atak grubunda düşük olması bu hücrenin atak döneminin bir pratik belirleyicisi olduğunu düşöndörmektedir. Periferik kanda T yardımcı lenfositlerinin integrin ekspresyon düzeylerinin atak dönemini belirlemeye uygun olmadığı göröőündeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Multiple skleroz, T yardımcı lenfosit, İntegrin, Akım sitometri, Kan beyin bariyeri.



**INVESTIGATION OF INTEGRINS EXPRESSED ON T HELPER CELL  
SURFACES DURING RELAPSING AND REMITTING PHASES IN  
PATIENTS WITH (RELAPSING/REMITTING) MULTIPLE SCLEROSIS**

**Muammer ÜZÜM**

**Afyonkarahisar University of Health Sciences Faculty of Medicine Department  
of Medical Biochemistry Thesis**

**December 2025**

**Supervisor: Prof. Dr. Tülay KÖKEN**

**ABSTRACT**

**Objective:** Multiple sclerosis is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system. The etiology of the disease still remains unclear. It is thought that one of the underlying mechanisms involves excessively activated T helper lymphocytes migrating from the peripheral blood across the blood–brain barrier and secreting inflammatory cytokines within the central nervous system. This study was designed to investigate whether the changes occurring in T helper lymphocyte subsets during the attack phase of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis (RR-MS) can be identified through peripheral blood analysis. For this purpose, the proportions of Treg, Th1, Th2, Th17, and Th17.1 cells, as well as the proportions of T helper lymphocytes expressing the cell-surface integrins  $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ M $\beta$ 2,  $\alpha$ 4, and  $\beta$ 3 which are considered to play a role in crossing the blood–brain barrier and initiating inflammation were determined in the peripheral blood of RR-MS patients during attack and remission phases.

**Materials and Methods:** Our study was designed as a prospective investigation, and it included 20 patients with relapsing–remitting multiple sclerosis (RR-MS) in the attack phase and 20 patients in the remission phase who presented to the Department of Neurology at Afyonkarahisar University of Health Sciences, Faculty of Medicine Hospital. In addition, 20 healthy individuals without any known acute or chronic disease were enrolled as controls. Peripheral venous blood samples were obtained from all participants, and T helper lymphocyte proportions and integrin expression levels were determined using flow cytometry. Statistical comparisons were then performed among the control, attack, and remission groups.

**Result:** When the mean  $\pm$  SD values were examined across the three groups, the total lymphocyte level was lower in the attack group ( $25.73\% \pm 7.35$ ) compared with the control group ( $33.05\% \pm 8.74$ ) ( $p = 0.007$ ). The Th cell level was higher in the remission group ( $49.30\% \pm 9.09$ ) than in the control group ( $42.85\% \pm 6.22$ ) ( $p = 0.038$ ). The Th17.1 cell level was found to be higher in the attack group ( $17.47\% \pm 3.06$ ) compared with the control group ( $14.16\% \pm 3.24$ ) ( $p = 0.042$ ). In addition, the Th2/Th17 ratio was lower in the attack group ( $2.16 \pm 0.53$ ) than in the control group ( $3.41 \pm 1.02$ ). The  $\alpha$ M $\beta$ 2 expression level on Th17.1 cells was lower in both the attack group ( $1.36\% \pm 0.80$ ) and the remission group ( $1.47\% \pm 1.15$ ) compared with the control group ( $2.55\% \pm 1.50$ ) ( $p < 0.05$ ). The  $\alpha$ 4 expression level on Th1 cells was also

lower in the attack group ( $77.56\% \pm 8.68$ ) than in the control group ( $83.48\% \pm 4.78$ ) ( $p = 0.027$ ).

**Conclusion:** The detection of elevated Th17.1 cell levels in the peripheral blood of the attack group in this study along with the observation that the Th2/Th17.1 ratio was lower in the attack group suggests that the Th17.1 subset may serve as a practical indicator of the attack phase in multiple sclerosis, a cell population increasingly recognized for its important role in MS pathogenesis. We concluded that integrin expression levels on peripheral T helper lymphocytes are not suitable markers for distinguishing the attack phase.

**Keywords:** Multiple sclerosis, T lymphocytes helper-inducer, Integrins, Flow cytometry, Blood brain barrier



# İÇİNDEKİLER

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| İÇ KAPAK.....                                                   | i   |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI .....                           | ii  |
| KABUL VE ONAY .....                                             | iii |
| TEŞEKKÜR.....                                                   | iv  |
| ÖZET.....                                                       | v   |
| ABSTRACT.....                                                   | vii |
| İÇİNDEKİLER .....                                               | ix  |
| KISALTMALAR DİZİNİ.....                                         | xi  |
| TABLolar DİZİNİ .....                                           | xiv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                            | xv  |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ .....                                           | 1   |
| 2.GENEL BİLGİLER .....                                          | 3   |
| 2.1. Multiple Skleroz.....                                      | 3   |
| 2.1.1 Multiple Skleroz Nedir? .....                             | 3   |
| 2.1.2 Multiple Skleroz Klinik Alt Tipleri.....                  | 4   |
| 2.1.3. Multiple Skleroz Tanısı.....                             | 5   |
| 2.1.3.1 McDonald Tanı Kriterleri .....                          | 6   |
| 2.1.4 Multiple Skleroz Tedavisi .....                           | 8   |
| 2.1.4.1 Hastalık Modifiye Edici Tedaviler.....                  | 9   |
| 2.1.5. Multiple Skleroz İmmünolojisi ve Patogenezi .....        | 11  |
| 2.1.5.1 Monosit-Makrofaj-Mikroglia Hücrelerinin MS'te Rolü..... | 11  |
| 2.1.5.2 CD8 <sup>+</sup> T Hücrelerinin MS'te Rolü .....        | 13  |
| 2.1.5.3 B Hücrelerinin MS'te Rolü .....                         | 14  |
| 2.1.5.4 CD4 <sup>+</sup> T Hücrelerinin MS'te Rolü .....        | 16  |
| 2.1.5.5. Treg Hücrelerinin MS'te Rolü .....                     | 19  |
| 2.2 İntegrinler.....                                            | 20  |
| 2.2.1 İntegrinlerin Yapısı ve Görevleri .....                   | 20  |
| 2.2.2 İntegrinlerin MS'te rolü .....                            | 23  |
| 2.2.3 $\alpha 4\beta 1$ İntegrin.....                           | 24  |
| 2.2.4 $\alpha L\beta 2$ İntegrin .....                          | 24  |
| 2.2.5 $\alpha M\beta 2$ İntegrin .....                          | 25  |
| 2.2.6 $\alpha V\beta 3$ İntegrin .....                          | 26  |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM .....                                         | 27  |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Hasta Seçimi ve Gönüllüler .....                                                                                  | 27 |
| 3.1.1 RRMS Atak Dönemi Hastası Seçimi .....                                                                           | 27 |
| 3.1.2 RRMS Remisyon Dönemi Hastası Seçimi.....                                                                        | 27 |
| 3.1.3 Sağlıklı Birey Seçimi .....                                                                                     | 28 |
| 3.1.4 RRMS Atak ve Remisyon Hastası Kabul Kriterleri .....                                                            | 28 |
| 3.1.5 RRMS Atak ve Remisyon Hastası Dışlama Kriterleri.....                                                           | 28 |
| 3.2 Çalışma Yöntemi.....                                                                                              | 29 |
| 3.2.1 Treg Hücre Analizi.....                                                                                         | 30 |
| 3.2.2 Th1, Th2, Th17, Th17.1 Hücreleri ve $\alpha$ M $\beta$ 2, $\alpha$ L $\beta$ 2 İntegrinlerin Belirlenmesi ..... | 32 |
| 3.2.3 Th1, Th2, Th17, Th17.1 Hücreleri ve $\alpha$ 4, $\beta$ 3 İntegrinlerin Belirlenmesi..                          | 35 |
| 3.3 İstatistiksel Analiz.....                                                                                         | 36 |
| 4.BULGULAR.....                                                                                                       | 39 |
| 4.1 Total Lenfosit Düzeyleri .....                                                                                    | 39 |
| 4.2 Th Hücre Düzeyleri.....                                                                                           | 39 |
| 4.3 Treg Hücre Düzeyleri.....                                                                                         | 40 |
| 4.4 Th1 Hücre Düzeyleri.....                                                                                          | 41 |
| 4.5 Th2 Hücre Düzeyleri.....                                                                                          | 42 |
| 4.6 Th17 Hücre Düzeyleri.....                                                                                         | 42 |
| 4.7 Th17.1 Hücre Düzeyleri.....                                                                                       | 43 |
| 4.8 TH2/TH17.1 Oranı.....                                                                                             | 44 |
| 4.9 $\alpha$ L $\beta$ 2 (LFA-1) İntegrin Düzeyleri .....                                                             | 45 |
| 4.10 $\alpha$ M $\beta$ 2 (MAC-1) İntegrin Düzeyleri .....                                                            | 46 |
| 4.11 $\alpha$ 4 İntegrin Düzeyleri .....                                                                              | 47 |
| 4.12 $\beta$ 3 İntegrin Düzeyleri .....                                                                               | 48 |
| 5.TARTIŞMA .....                                                                                                      | 49 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                                            | 60 |
| 7. KAYNAKLAR .....                                                                                                    | 61 |
| EK-1 .....                                                                                                            | 71 |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|                                |                                             |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>ACTH</b>                    | : Adrenokortikotropik Hormon                |
| <b>APC</b>                     | : Antijen Sunan Hücre                       |
| <b>AQP4</b>                    | : Akuaporin-4                               |
| <b>BOS</b>                     | : Beyin Omurilik Sıvısı                     |
| <b>CCR6</b>                    | : C-C Kemokin Reseptörü 6                   |
| <b>CTLA-4</b>                  | : Sitotoksik T Lenfosit Antijeni 4          |
| <b>CXCL1</b>                   | : C-X-C Motif Kemokin Ligand 1              |
| <b>CXCL6</b>                   | : C-X-C Motif Kemokin Ligand 6              |
| <b>CXCR3</b>                   | : C-X-C Kemokin Reseptör Tip 3              |
| <b>DC</b>                      | : Dendritik Hücreler                        |
| <b>Dk</b>                      | : Dakika                                    |
| <b>EAE</b>                     | : Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit          |
| <b>EBNA-1</b>                  | : Epstein-Barr Nükleer Antijen 1            |
| <b>EBV</b>                     | : Epstein-Barr Virüs                        |
| <b>ECM</b>                     | : Hücre Dışı Matriks                        |
| <b>EDSS</b>                    | : Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği      |
| <b>FAK</b>                     | : Fokal Adezyon Kinaz                       |
| <b>FDA</b>                     | : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi             |
| <b>FOXP3</b>                   | : Forkhead kutusu P3                        |
| <b>G-CSF</b>                   | : Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör          |
| <b>GlialCAM</b>                | : Glial Hücre Adezyon Molekülü              |
| <b>GM-CSF</b>                  | : Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör |
| <b>HLA</b>                     | : İnsan Lökosit Antijeni                    |
| <b>ICAM-1</b>                  | : Hücreler Arası Adhezyon Molekülü-1        |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | : İnterferon Gama                           |
| <b>IgG</b>                     | : İmmüoglobulin G                           |
| <b>IL</b>                      | : İnterlökin                                |
| <b>IVIG</b>                    | : İntravenöz İmmüoglobulin                  |
| <b>IVMP</b>                    | : İntravenöz Metilprednizolon               |
| <b>JCV</b>                     | : John Cunningham virüsü                    |
| <b>KBB</b>                     | : Kan Beyin Bariyeri                        |
| <b>KİS</b>                     | : Klinik İzole Sendrom                      |
| <b>LFA-1</b>                   | : Lenfosit Fonksiyon ile İlişkili Antijen-1 |
| <b>MAC-1</b>                   | : Makrofaj-1 Antijeni                       |
| <b>MAGNIMS</b>                 | : Magnetic Resonance Imaging in MS          |
| <b>MAPK</b>                    | : Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz     |
| <b>MBP</b>                     | : Myelin Bazik Protein                      |
| <b>MCP-1</b>                   | : Monosit Kemoatraktan Protein-1            |

|                                                |                                                     |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>MHC- II</b>                                 | : Majör Doku Uyumluluk Kompleksi- II                |
| <b>MIDAS</b>                                   | : Metal İyonuna Bağımlı Adezyon Bölgesi             |
| <b>MIP-2</b>                                   | : Makrofaj İnflamatuvar Protein-2                   |
| <b>MOG</b>                                     | : Miyelin Oligodendrosit Glikoproteini              |
| <b>MOGAD</b>                                   | : Anti-MOG Antikor İlişkili Hastalık                |
| <b>MRG</b>                                     | : Manyetik Rezonans Görüntüleme                     |
| <b>MS</b>                                      | : Multiple Skleroz                                  |
| <b>MSS</b>                                     | : Merkezi Sinir Sistemi                             |
| <b>NMO</b>                                     | : Nöromiyelitis Optika                              |
| <b>NMOSD</b>                                   | : Nöromiyelitis Optika Spektrum Bozukluğu           |
| <b>NRF-2</b>                                   | : Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör-2   |
| <b>OKB</b>                                     | : Oligoklonal Bant                                  |
| <b>Ör</b>                                      | : Örnek                                             |
| <b>PD-1</b>                                    | : Programlanmış Hücre Ölüm-1                        |
| <b>PD-L1</b>                                   | : Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı-1                |
| <b>PML</b>                                     | : Progresif Multifokal Lökensefalopati              |
| <b>PMS</b>                                     | : Progresif Multiple Skleroz                        |
| <b>PPMS</b>                                    | : Primer Progresif Multiple Skleroz                 |
| <b>RGD</b>                                     | : Arginin–Glisin–Aspartat                           |
| <b>ROR<math>\gamma</math>t</b>                 | : Retinoik Asit İlişkili Orphan Reseptör Gama T     |
| <b>Rpm</b>                                     | : Revolutions Per Minute                            |
| <b>RPMS</b>                                    | : Ataklarla İlerleyen Multiple Skleroz              |
| <b>RRMS</b>                                    | : Relapsing-Remitting Multiple Skleroz              |
| <b>S1PR</b>                                    | : Sfingozin-1-Fosfat Reseptör                       |
| <b>SEP</b>                                     | : Somatosensoriyel Uyandırılmış Potansiyel          |
| <b>Sn</b>                                      | : Saniye                                            |
| <b>SPMS</b>                                    | : Sekonder Progresif Multiple Skleroz               |
| <b>STAT3</b>                                   | : Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 |
| <b>Th</b>                                      | : T Yardımcı                                        |
| <b>Th1</b>                                     | : T Yardımcı Hücre 1                                |
| <b>Th17.1</b>                                  | : T Yardımcı Hücre 17.1                             |
| <b>Th17</b>                                    | : T Yardımcı Hücre 17                               |
| <b>Th2</b>                                     | : T Yardımcı Hücre 2                                |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>                 | : Tümör Nekrozis Faktör Alfa                        |
| <b>Treg</b>                                    | : Düzenleyici T Hücre                               |
| <b>VCAM-1</b>                                  | : Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü-1                |
| <b>VEP</b>                                     | : Görsel Uyandırılmış Potansiyel                    |
| <b>VLA-4</b>                                   | : Very Late Antigen 4                               |
| <b><math>\alpha</math></b>                     | : Alfa                                              |
| <b><math>\alpha</math>4<math>\beta</math>1</b> | : Alfa 4 Beta 1                                     |

|                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| $\alpha\text{L}\beta 2$ | : Alfa L Beta 2 |
| $\alpha\text{M}\beta 2$ | : Alfa M Beta 2 |
| $\alpha\text{V}\beta 3$ | : Alfa V Beta 3 |
| $\beta$                 | : Beta          |
| $\mu\text{L}$           | : Mikrolitre    |



## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1:</b> 2017 Revize McDonald kriterleri. ....                                                        | 8  |
| <b>Tablo 3.1:</b> Demografik verilerin özellikleri .....                                                       | 28 |
| <b>Tablo 3.2:</b> Çalışma için gerekli cihaz ve sarf malzemeler. ....                                          | 30 |
| <b>Tablo 4.1:</b> Total lenfosit yüzdesinin analiz sonuçları. ....                                             | 39 |
| <b>Tablo 4.2:</b> Lenfosit popülasyonunda Th hücrelerin yüzdesi. ....                                          | 40 |
| <b>Tablo 4.3:</b> Th hücre popülasyonunda Treg hücrelerinin yüzdesi. ....                                      | 40 |
| <b>Tablo 4.4:</b> Th hücre popülasyonunda Th1 hücrelerinin yüzdesi. ....                                       | 41 |
| <b>Tablo 4.5:</b> Th hücre popülasyonunda Th2 hücrelerinin yüzdesi. ....                                       | 42 |
| <b>Tablo 4.6:</b> Th hücre popülasyonunda Th17 hücrelerinin yüzdesi. ....                                      | 43 |
| <b>Tablo 4.7:</b> Th hücre popülasyonunda Th17.1 hücrelerinin yüzdesi. ....                                    | 43 |
| <b>Tablo 4.8:</b> Th hücre popülasyonu ve içerisindeki Treg, Th1, Th2, Th17, Th17.1 hücrelerinin yüzdesi ..... | 44 |
| <b>Tablo 4.9:</b> Th2/Th17.1 oranı sonuçları.....                                                              | 44 |
| <b>Tablo 4.10:</b> Gruplarda Th hücrelerinde $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin ekspresyon yüzdesi. ....            | 45 |
| <b>Tablo 4.11:</b> Gruplarda Th hücrelerinde $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin ekspresyon yüzdesi. ....            | 46 |
| <b>Tablo 4.12:</b> Gruplarda Th hücrelerinde $\alpha$ 4 integrin ekspresyonunun yüzdesi. ....                  | 47 |
| <b>Tablo 4.13:</b> Gruplarda Th hücrelerinde $\beta$ 3 integrin ekspresyonunun yüzdesi. ....                   | 48 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1:</b> Dünya genelinde MS prevalansı.....                                                     | 4  |
| <b>Şekil 2.2:</b> MS klinik alt tiplerinin progresyonu .....                                             | 5  |
| <b>Şekil 2.3:</b> Nöro enflamasyonda rol oynayan hücresel bileşenler ve sitokinler.....                  | 12 |
| <b>Şekil 2.4:</b> İntegrinlerin yapısı .....                                                             | 22 |
| <b>Şekil 2.5:</b> VLA-4 ve LFA-1'in KBB'ye lenfosit migrasyonundaki görsel temsili....                   | 25 |
| <b>Şekil 3.1:</b> Treg hücrelerinin düzeyinin belirlenmesi. ....                                         | 32 |
| <b>Şekil 3.2:</b> Th1, Th2, Th17, Th17.1 lenfosit popülasyonlarının düzeyinin belirlenmesi.<br>.....     | 33 |
| <b>Şekil 3.3:</b> Th lenfosit alt gruplarında CD11a eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi..... | 34 |
| <b>Şekil 3.4:</b> Th lenfosit alt gruplarında CD11b eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi..... | 35 |
| <b>Şekil 3.5:</b> Th lenfosit alt gruplarında CD49d eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi..... | 37 |
| <b>Şekil 3.6:</b> Th lenfosit alt gruplarında CD61 eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi.....  | 38 |
| <b>Şekil 4.1:</b> Gruplar arası total lenfosit yüzdesi karşılaştırılması .....                           | 39 |
| <b>Şekil 4.2:</b> Grupların lenfosit popülasyonunda Th hücre yüzdelerinin karşılaştırma grafiği.....     | 40 |
| <b>Şekil 4.3:</b> Grupların Th hücre popülasyonunda Treg yüzdelerinin karşılaştırma grafiği.<br>.....    | 41 |
| <b>Şekil 4.4:</b> Grupların Th hücre popülasyonunda Th1 yüzdelerinin karşılaştırma grafiği.<br>.....     | 41 |
| <b>Şekil 4.5:</b> Grupların Th hücre popülasyonunda Th2 yüzdelerinin karşılaştırma grafiği.<br>.....     | 42 |
| <b>Şekil 4.6:</b> Grupların Th hücre popülasyonunda Th17 yüzdelerinin karşılaştırma grafiği.....         | 43 |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.7:</b> Grupların Th hücre popülasyonunda Th17.1 yüzdelерinin karşılaştırma grafiğı .....                       | 44 |
| <b>Şekil 4.8:</b> Gruplar arası Th hücre alt gruplarında $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin yüzdesinin karşılaştırılması ..... | 45 |
| <b>Şekil 4.9:</b> Gruplar arası Th hücrelerinde $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin yüzdesinin karşılaştırılması. ....          | 46 |
| <b>Şekil 4.10:</b> Gruplar arası Th hücrelerinde $\alpha$ 4 integrin yüzdesinin karşılaştırılması ..                      | 47 |
| <b>Şekil 4.11:</b> Gruplar arası Th hücrelerinde $\beta$ 3 integrin yüzdesinin karşılaştırılması. .                       | 48 |



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl Skleroz (MS) enflamasyon, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize santral sinir sisteminin otoimmün bir hastalığıdır. Kronik bir hastalık olup ataklar halinde veya ilerleyici olarak seyreder (1).

MS'in hayvan modeli olan Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE) ile yapılan çalışmalarda, MS'in genetik duyarlı bireylerde gelişen, CD4<sup>+</sup> T hücre aracılı otoimmün bir hastalık olduğunu gösterilmiştir. MS'de oluşan enflamasyondan yalnızca bir T hücre grubu sorumlu olmayıp, farklı bağışıklık hücre popülasyonlarını içeren daha karmaşık bir patogeneze söz konusudur (2).

T hücrelerinin yüzeyinde bulunan integrinler, bu hücrelerin kan-beyin bariyerini (KBB) aşmalarında aracı olan moleküllerdir. İntegrinler, bir alfa ( $\alpha$ ) ve bir beta ( $\beta$ ) alt biriminden oluşan transmembran yerleşimli heterodimer yapıda olan adezyon molekülleridir (3).

EAE çalışmalarında alfa-4 beta-1 ( $\alpha 4\beta 1$ ) integrinin enflamasyona uğramış merkezi sinir sisteminde (MSS) lökosit adezyonundaki rolü kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (4). İlk çalışmalar, MSS'de enflamasyonlu bölgede endotele lökosit adezyonunun  $\alpha 4\beta 1$ -vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) etkileşimi aracılığıyla gerçekleştiğini göstermiştir.  $\alpha 4\beta 1$  integrinin blokajı, sıçanlarda ve farelerde hastalık gelişimini tutarlı bir şekilde önlemiştir (5,6). Bu çalışmalardan elde edilen veriler,  $\alpha 4$ 'e karşı monoklonal bir antikör olan ve MS hastalarının tedavisi için onaylanan natalizumab'ın geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır (7).

Lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen-1 (LFA-1) diğer adıyla alfa-L beta-2 ( $\alpha L\beta 2$ ) integrin, tüm lökositlerin yüzeyinde bulunan bir diğer heterodimerik integrindir. Enflamasyonlu bölgeye lökosit toplanmasının yanı sıra T hücresi aktivasyonu ve immünolojik sinaps oluşumu gibi diğer immünolojik süreçlerde de rol oynar (8). Yapılan çalışmalar, LFA-1-hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) blokajının gelecekte MS tedavisinde kullanılabileceğini öngörmektedir (9).

MAC-1 adıyla da bilinen alfa-M beta-2 ( $\alpha M\beta 2$ ) integrin, lökosit yüzeyinde eksprese edilen ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kritik rol

oyunayan bir adezyon molekülüdür. Lenfosit yüzeyinde az da olsa bulunması bu integrinin terapötik bir hedef olarak kullanılabilirliğinin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir (10).

Alfa V beta 3 ( $\alpha V\beta 3$ ) integrin MS dahil olmak üzere otoimmün hastalıklarla yakından ilişkili bulunmuştur (11). T yardımcı hücre 17 (Th17) alt grubunda daha fazla eksprese edildiği ve bu integrinin baskılandığı farelerde EAE şiddetinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca  $\beta 3$  integrin eksikliği olan Th17 hücrelerinin EAE sırasında MSS’de artmadığı tespit edilmiştir (12).

Bu çalışma, Multiple Skleroz (RR-MS) hastalarının atak döneminde T yardımcı (Th) hücre alt gruplarındaki değişiklikleri ortaya koyarak, bu dönemin periferik kan analizi ile ortaya konulup konulamayacağını araştırmak için planlanmıştır. Bunun için atak ve remisyon dönemindeki RR-MS hastalarının periferik kanında T yardımcı hücre 1 (Th1), T yardımcı hücre 2 (Th2), Th17, T yardımcı hücre 17.1 (Th17.1), düzenleyici T hücre (Treg) oranları ve bu hücrelerin KBB’yi aşır enflamasyonun oluşmasında rolü olduğu düşünülen hücre yüzey integrinlerinden,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha 4$  ve  $\beta 3$  eksprese eden Th hücre oranları akım sitometri metodu ile belirlendi. Bu çalışmanın sonuçlarının Th hücrelerinin MSS’deki otoimmün enflamatuvar hastalığın patogenezinin spesifik katkısından sorumlu moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunacağını ve bu bozukluklar için yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Multiple Skleroz

#### 2.1.1 Multiple Skleroz Nedir?

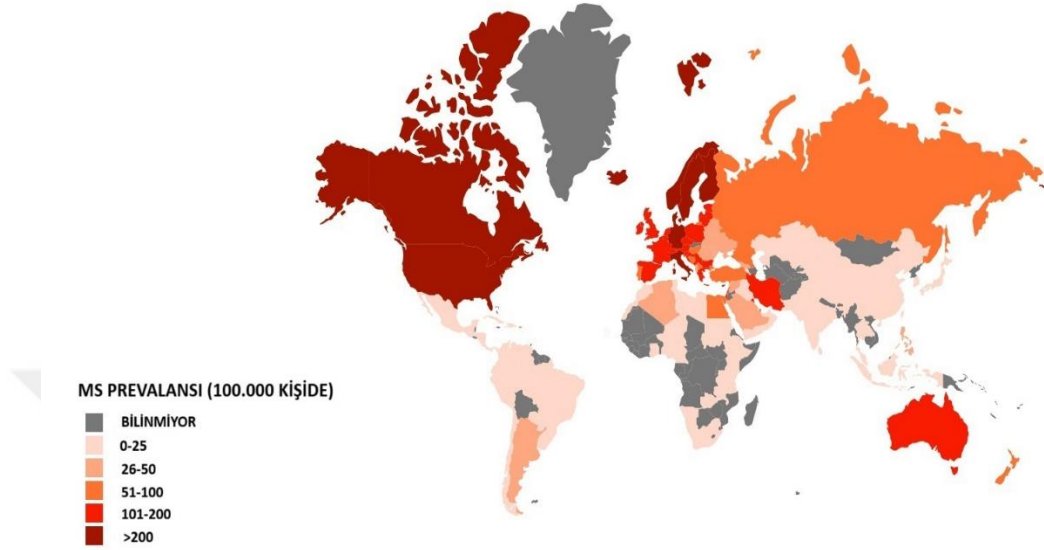
MS, ilk defa 1868 yılında Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanmıştır. Bu hastalık, MSS'yi etkileyen demiyelinizasyon, akson hasarı ve enflamasyonla karakterize otoimmün, kronik bir hastalıktır. Akson ve sinir hücreleri daha az etkilenirken, miyelin kılıflar ve oligodendrositler daha çok etkilenen yapılardır (1).

MS; motor, duyuşsal, otonom, bilişsel bozukluklar göstererek hastalarda önemli derecede fonksiyon kaybına neden olabilmektedir. Hastalık başlangıcındaki belirtiler genel olarak bir veya daha fazla ekstremitede güçsüzlük, görme bulanıklığı, his kaybı, çift görme, baş dönmesi, idrar kaçırma gibi mesane problemleri olarak sıralanabilir (1,2). MS genellikle yaşam süresini kısaltmaz; ancak genç erişkinleri sosyoekonomik açıdan, travmadan sonra en çok etkileyen en önemli nedenlerden biridir (2).

Hastalık, Avrupa kıtasında genellikle 20 ila 40 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır. Kadınlarda, erkeklere göre yaklaşık üç kat fazla görülmektedir. Hastaların %10'unda ilk klinik belirtiler 18 yaşından önce ortaya çıkarken, son dönemde yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre 50 yaşından sonra görülme sıklığında artış olduğu gözlenmiştir. Kuzey Avrupa'da, Ekvator'a yakın bölgelerdeki ülkelere göre hastalık prevalansı ve insidansında artış saptanmıştır (Şekil 2.1) (13,14). MS'in küresel ortalama prevalansı 100.000 kişide 33 olup, ülkeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa en yüksek prevalansa sahip bölgelerken (sırasıyla 100.000 kişide 140 ve 108), Asya ve Sahra Altı Afrika ülkeleri ise en düşük prevalansa sahip bölgelerdir (sırasıyla 100.000 kişide 2,2 ve 2,1) (15).

MS üzerine yapılan çalışmalar, hastalığın etiyolojisi hakkında çevresel ve genetik risk faktörlerini ortaya koymuştur. Düşük D vitamini düzeyi, *Epstein-Barr* virüsü (EBV) antikor seropozitifliği ve sigara içiminin artmış MS riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Obezitenin hem pediatrik hem de erişkin başlangıçlı MS riskini artırdığı ve kadınlarda erkeklere kıyasla daha etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca, insan lökosit antijeni (HLA) kompleksi alt birimi olan HLA-DRB1'in MS riskini artırdığı

HLA-A\*02'nin ise MS riski ile ters ilişkili olduğu ifade edilmiştir. HLA kompleksi dışında, bağışıklık fonksiyonlarıyla ilgili genlere yakın olan birçok normal varyant tek nükleotid polimorfizmi de farklı derecelerde MS riski ile ilişkilendirilmiştir (16).



**Şekil 2.1:** Dünya genelinde MS prevalansı(14).

**Kaynak:** Atlas of MS, MS International Federation. Türkçeye çevrilerek düzenlenmiştir.

### 2.1.2 Multiple Skleroz Klinik Alt Tipleri

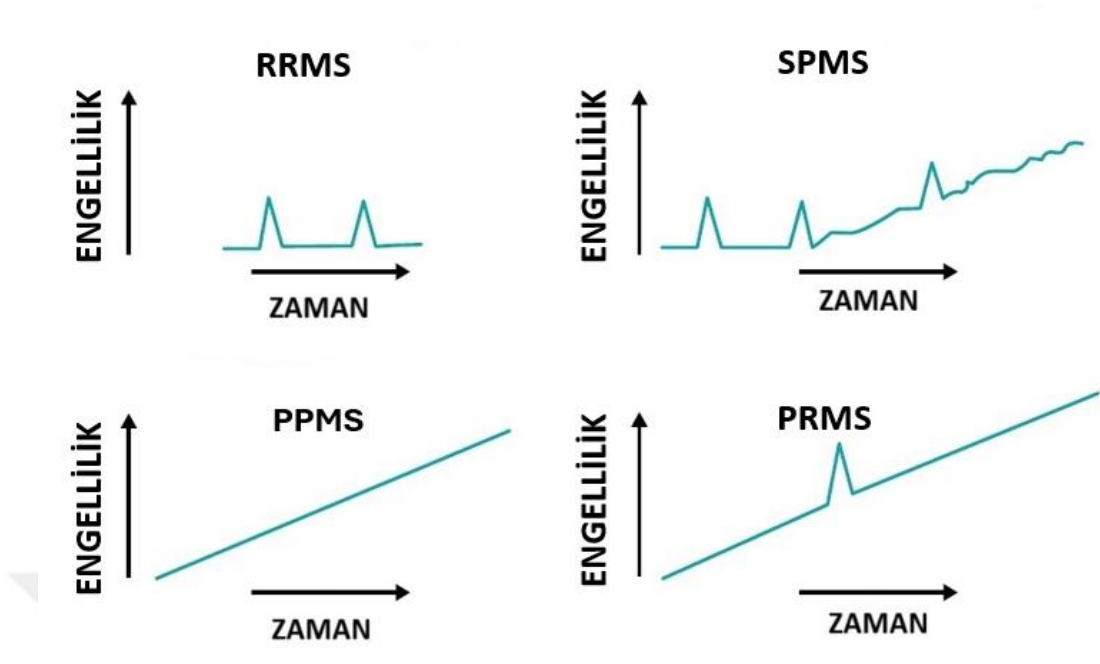
MS'in farklı klinik ve patolojik alt tipleri tanımlanmıştır. Hastaların yaklaşık %80-85'inde ataklar ve bunları takip eden tam veya kısmi remisyonlar görülürken, %10-15'inde herhangi bir nöks olmadan yavaş ilerleyici bir seyir vardır (Şekil 2.2) (17,18).

Lublin ve arkadaşları, 1996 yılında MS'i; RRMS, Relapsing-Progresif Multiple Skleroz (RPMS), Sekonder Progresif Multiple Skleroz (SPMS) ve Primer Progresif Multiple Skleroz (PPMS) olarak gruplandırmıştır. 2013 yılında tekrar gruplandırma yapıp aktif ve inaktif formlar eklenmiştir. Bunlar sırasıyla;

-Klinik İzole Sendrom (KİS),

-RRMS: Aktif ve inaktif RRMS,

-Progresif MS (PMS): Aktif, progresif; aktif, non-progresif; inaktif, progresif; inaktif, non-progresif alt tipleri eklenmiştir (1,19).



Şekil 2.2: MS klinik alt tiplerinin progresyonu (18).

### 2.1.3. Multiple Skleroz Tanısı

MS tanısı; atakların klinik özelliklerine, tıbbi öyküye ve muayene bulgularına dayanır. MS için tek bir tanısal laboratuvar testi yoktur. Tanı, klinik bulgular ile yapılan tetkiklerden elde edilen verilere dayanılarak konulur (18).

Tanı koyabilmek için 1950'lerden bu yana tanıda duyarlılığı ve özgüllüğü artırmak amacıyla çeşitli kriterler geliştirilmiştir. Yaş aralığı, atak sayısı, atak süresi ve muayene bulguları gibi ilk kapsamlı klinik kriterler 1965 yılında Schumacher ve ark. tarafından önerilmiştir(20). 1983 yılında, Poser ve ark. bu kriterlere paraklinik testleri dahil etmiştir. Tanıyı “klinik olarak kesin veya olası MS” ya da “laboratuvarla desteklenen kesin veya olası MS” olarak tanımlayarak tanının güvenilirliğini artırmıştır (21).

MSS'de lezyonların mekansal yayılım ve zamansal yayılım olarak gösterilmesi, manyetik rezonans görüntülemeye (MRG) önce tamamen klinik bulgulara dayanıyordu. MRG'nin tanıda kullanılmaya başlamasıyla birlikte, lezyonların görüntülenmesi MS tanısında en önemli kriterlerden biri haline gelmiştir. Tanının erken konulup tedaviye hızlı başlanması, hastalığın ilerlemesinin önüne

geçilmesini sağlamıştır. Tanıya giden yolda MRG görüntülemeleri ilk kez 2001 yılında McDonald kriterlerine eklenmiş ve zamanla güncellenmiştir (15).

MS tanısında beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesinin önemi, McDonald kriterlerinin her revizyonunda 2010 yılına kadar giderek azalmış olsa da hâlâ önemli bir tanı testi olarak kalmıştır. Oligoklonal bantların (OKB) yalnızca BOS'a özgü olduğunu doğrulamak için eş zamanda alınan BOS ve serum örneklerinin analiz edilmesi gerekir (22).

MS'de BOS analizine ilişkin ilk Avrupa konsensusu doğrultusunda, OKB'nin beş izoelektrik odaklama paterninin ayırt edilmesi önerilmektedir (23). Bunlar:

- Tip 1: BOS'ta OKB bulunmaması.
- Tip 2: Yalnızca BOS ile sınırlı OKB'ler (lokal sentez).
- Tip 3: BOS ile sınırlı OKB'lere ek olarak BOS ve serumda aynı OKB'lerin bulunması (lokal ve sistemik sentez).
- Tip 4: BOS ve serumda özdeş OKB'lerin bulunması (sistemik sentez, lokal sentez yok).
- Tip 5: BOS ve serumda monoklonal bantların bulunması (paraproteinemi, lokal sentez yok).

Rutin biyokimyasal kan tetkikleri, BOS analizi, MRG görüntülemelerine ek olarak görsel uyandırılmış potansiyel (VEP) ve somatosensoriyel uyandırılmış potansiyel (SEP) MS tanısında yardımcı elektrofizyolojik yöntemler olarak kullanılmaktadır (19).

### **2.1.3.1 McDonald Tanı Kriterleri**

McDonald tanı kriterleri, MS tanısında kullanılan klinik, radyolojik ve laboratuvar kriterleri olarak hasta tanısında kullanılmaktadır. İlk olarak 2001 yılında belirlenmiş, daha sonra 2005, 2010 ve 2017'de tekrar düzenlenmiştir. Radyolojik kriterler ilk kez 2001 yılında kullanılmaya başlanmış, zamansal yayılımın tanımı değiştirilmiş ve böylece yeni bir atak beklemeden mekansal yayılım kriterleri karşılanıyorsa "kesin MS" tanısı konulması mümkün olmuştur. Ayrıca, VEP bulguları ve BOS'ta OKB pozitifliği ve yükselmiş IgG (immünoglobulin G) indeksi de kriterlere dahil edilmiştir. Bu sayede, ilk atakta kesin MS tanısı koymak mümkün hale gelmiştir.

2001 kriterlerinde MS tanısı “kesin MS”, “olası MS” ve “MS dışı” olarak sınıflandırılmıştır (19,24).

2005 yılında yapılan revizyonda, yanlış anlaşılmalara önüne geçmek amacıyla sadeleştirilmeye gidilmiş, MRG ve BOS kriterleri değiştirilmiştir. İlk kez PPMS için kriterler eklenmiştir. 2001 ve 2005 kriterleri karşılaştırıldığında, tanısal duyarlılık benzer kalmıştır (%91’e karşı %88), ancak özgüllük %50’den %60’a yükselmiştir (19,25).

2010 yılında, OKB pozitifliği ve VEP testi kriterlerden çıkarılmış, mekansal yayılım kriterleri ise basitleştirilmiştir. Yeni kriterler, çok geniş kapsamlı olmaları nedeniyle eleştirilmiştir. Ayrıca, BOS analizinin kriterlerden çıkarılması, atipik vakalarda tanı koymayı zorlaştırdığı öne sürülmüştür (19,26).

2015 yılında MRG özellikleri, Magnetic Resonance Imaging in MS (MAGNIMS) çalışma grubu tarafından tanımlanmıştır. Minimum kesit kalınlığı, sekansların teknik özellikleri, gadolinyum kontrastının miktarı ve uygulanmasından sonra yeniden tarama zamanlaması net bir şekilde tanımlanmıştır. Ayrıca, erken evrelerde takip MRG’leri için gerekli zamanlama da bu panel tarafından netleştirilmiştir (19,27).

Paraklinik incelemeler arasında, MRG yüksek duyarlılığı (%95’e kadar) ile en önemli tanısal araçtır. Ancak zamanla negatif prediktif değerinin %65’e kadar yükselmesi yüksek oranda yanlış pozitif tanısal sonuçlara neden olmuştur. Nöromiyelitis Optika (NMO), sistemik bağ dokusu hastalıkları, vaskülitler ve hatta sağlıklı, asemptomatik bireyler yanlış MS tanısı aldığı için, 2017 yılında McDonald kriterleri yeniden düzenlenmiştir (Tablo 2.1) (19,28).

**Tablo 2.1:** 2017 Revize McDonald kriterleri (28).

| Atak sayısı      | Objektif klinik bulgu ile saptanan lezyon sayısı                                | MS tanısı için gerekli ek veri                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| >2               | >2                                                                              | Yok <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                        |
| >2               | 1+ öyküde başka bir alandaki lezyona ait atak <sup>b</sup>                      | Yok <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                        |
| >2               | 1                                                                               | MSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG <sup>c</sup> ile mekânda yayılımın gösterilmesi                                                                                                                           |
| 1                | >2                                                                              | MSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG <sup>c</sup> ile mekânda yayılımın gösterilmesi ve ek bir klinik atak veya MRG <sup>d</sup> ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB <sup>e</sup> varlığı |
| Sinsi progresyon | 1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak) | Aşağıdakilerin 2'si;<br>-MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda $\geq 1$ lezyon<br>-Spinal kordda $\geq 2$ lezyon<br>-BOS-spesifik OKB varlığı                                               |

a: Mekanda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek yoktur. Ancak beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Tanıyı destekleyecek yetersiz klinik ve MRG bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak spinal kord MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılamadıysa ya da negatifse MS tanısı koymadan önce dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.

b: Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güveniliridir. Öyküdeki atağa ait dökümanate edilmiş objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü enflamatuvar demiyelinizan olaya ait tipik semptom ve klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır.

c: MRG'de mekanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve spinal kord) 4 alanın  $\geq 2$ 'sinde  $\geq 1$  lezyon olması

d: MRG'de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG'de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG'sinde ilk MRG (çekildiği zamandan bağımsız olarak) referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyonun ya da kontrast tutan lezyonun olması

e: BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda onun yerine geçer.

#### 2.1.4 Multiple Skleroz Tedavisi

MS tedavisi üç farklı yaklaşımdan oluşur. Atak tedavisi, MS'in klinik bulgularıyla gelen hastada, atağın neden olduğu nöroenflamasyonu azaltıp hasarı önlemek amacıyla uygulanır. İkinci olarak semptomatik tedavi, hastaların günlük yaşam kalitesini artırarak fonksiyonel bozukluğa neden olan belirtileri azaltmayı amaçlamaktadır. Üçüncü olarak hastalık modifiye edici tedaviler, çeşitli immün

mekanizmaları düzenleyerek hastalığın ileri yönde gitmesini engellemeyi hedeflemektedir. Bu ilaçların kullanımının hastalık aktivitesini ve atak oranlarını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca RRMS' in SPMS'e dönüşüm süresini uzattığı kanıtlanmıştır (29).

#### **2.1.4.1 Hastalık Modifiye Edici Tedaviler**

Hastalığın uzun süreli yönetiminde, hastalığın seyrinin ilerlemesinin önüne geçmek amacıyla, birkaç basamakta uygulanan tedavilerdir. Her basamakta belirli ilaç tedavileri uygulanır. Bu tedaviler genellikle bağışıklık fonksiyonunu ve enflamatuvar yanıtları baskılayarak veya düzenleyerek fayda sağlarlar. Birinci basamak tedavide interferon-beta, teriflunomid ve dimetil fumarat bulunmaktadır (30).

İnterferon-beta fibroblastlar tarafından üretilen bir polipeptittir. İnterferon-1 $\alpha$  ve İnterferon-1 $\beta$  olmak üzere iki tipi vardır. T hücre çoğalmasını engellemesi, KBB'den enflamatuvar hücrelerin geçişini azaltması ve sitokin yanıtını anti-enflamatuvar yöne kaydırması gibi nedenlerle RR-MS hastalarında kullanılmaktadır (1,31).

Glatiramer asetat 40-100 amino asitten oluşan sentetik bir polipeptittir. Glatiramer asetatın MS'teki rolü tam olarak aydınlatılamamış olsa da T hücre popülasyonunu Th2 yönüne kaydırıp MSS'de anti-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını sağlayarak MS'te koruyucu bir rol üstlendiği düşünülmektedir (32).

Teriflunomid, pirimidin sentezi için gerekli olan dihidroorotat dehidrogenaz enzimini geri dönüşümlü bir şekilde inhibe eden immün sistem düzenleyici bir ajandır. MS'teki etkisini, enflamatuvar lenfosit sayısını azaltarak gösterdiği öngörülmektedir (33). Yapılan bir çalışmada KİS'li hastalarda ikinci bir atağa kadar geçen süreyi uzattığı ve MRG görüntülerinde lezyonları azalttığı gösterilmiştir (34).

Dimetil fumarat, fumarik asitten türetilmiş bir moleküldür. Yapılan çalışmalarda diğer birinci basamak ilaçlarda olduğu gibi, bağışıklık yanıtını Th2 yönüne kaydırarak anti-enflamatuvar etkinliği artırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda antioksidan özellik gösteren nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör-2 (NRF-2) transkripsiyon faktörünü de aktive ettiği belirlenmiştir (35). Yapılan bir çalışmada atak

sayısını, MRG görüntülerinde kontrast tutan lezyon sayısını ve hastalığın ilerlemesini azalttığı gösterilmiştir (36).

MS hastalarında ilk olarak birinci basamak tedavi yöntemleri uygulanır. Ancak bazı hastalarda bu tedavilere rağmen atak sayısında azalma olmaması, hastalık aktivitesinin ilerlemesi durumunda ikinci basamak tedavilere geçilir. Fingolimod, natalizumab, alemtuzumab, okrelizumab ve kladribin bu ilaçlara örnek olarak verilebilir (30).

Fingolimod, sfingozin-1-fosfat reseptörü (S1PR) modülatörüdür. S1PR ile etkileşime geçtiğinde lenfositler de dahil olmak üzere hücreler, reseptörlerini hücre içine alır. Sonuç olarak, otoreaktif lenfositlerin lenf düğümlerinden MSS'e geçişi engellenir. Böylece MS'te rol oynayan enflamatuvar lenfositlerin etkisi azaltılmış olur (37).

Natalizumab,  $\alpha$ 4-integrine karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur. Lenfosit yüzeyindeki bu integrini bloke eder ve lenfositlerin KBB'de endotelyuma yapışıp MSS'e geçişini engeller. Yapılan bir çalışmada plaseboya karşı yıllık atak oranını %68, engelliliği %54 azalttığı ve MRG'deki lezyonları da %90 dan fazla azalttığı görülmüştür (38). Natalizumab tedavisi MSS'de immün sistemi baskıladığından, latent durumda olan *John Cunningham* virüsü (JCV) aktive olup oligodendrositleri enfekte ederek Progresif Multifokal Lökensefalopati'ye (PML) neden olabilir. Bu nedenle tedaviye başlanmadan önce hastalar JCV enfeksiyonuna ilişkin serolojik taramadan geçirilir (39).

Son yıllarda MS patogenezinde B lenfositlerin de rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu hücreleri hedef alan ilaç kullanımının MS hastalarındaki etkinliği üzerine araştırmalar yapılmıştır. Okrelizumab da bu ilaçlardan biri olup anti-CD20 monoklonal antikordur. CD20, B hücrelerinin çoğunun yüzeyinde eksprese edilir (40).

Alemtuzumab, T ve B hücrelerinde bulunan CD52 yüzey molekülünü hedefleyen bir monoklonal antikordur. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 2014 yılında onay verdiği bu ilaç, otuzdan fazla ülkede RRMS tedavisinde kullanılmıştır.

Ancak ikincil otoimmün hastalıklara neden olduğu düşünüldüğü için kullanımıyla ilgili endişeler ortaya çıkmıştır (41).

Kladribin, bir pürin analogudur. Özellikle B lenfositleri seçici olarak hedefleyerek tükenmelerine yol açmaktadır. Kladribin, pro-apoptotik etkilerinin yanında MSS'e hücre göçünü azaltıcı etkileri bulunmaktadır. RRMS tedavisinde güvenilir bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir (42).

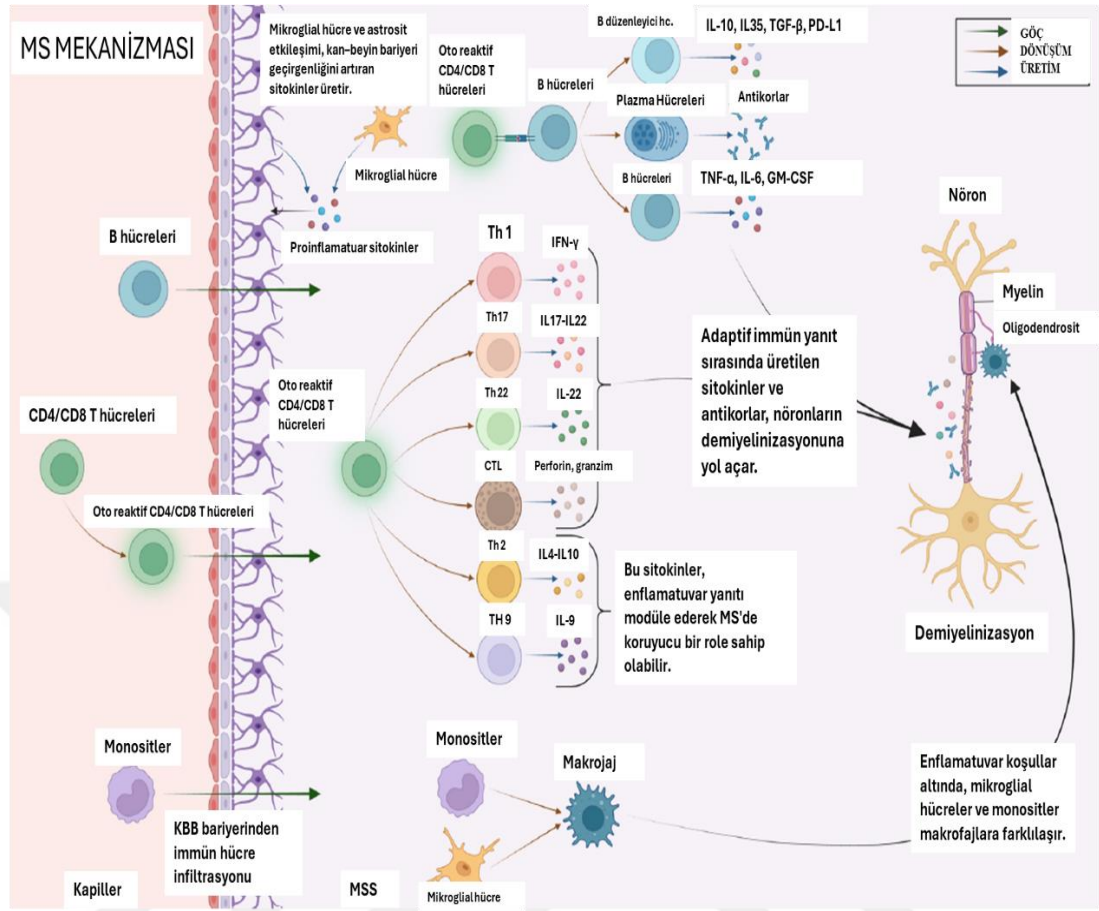
Hastalık modifiye edici tedaviler, RRMS hastalarında belirgin derecede etkinlik gösterirken PPMS ve SPMS hastalarında ilerlemeyi yavaşlattığına dair kesin kanıtlar sunulamamıştır (30).

### **2.1.5. Multiple Skleroz İmmünolojisi ve Patogenezi**

MS'e neyin sebep olabileceği ile ilgili bugüne kadar birçok fikir öne atılmıştır. Otoreaktif bağışıklık hücreleri bugüne kadar yapılan çalışmalarda önemli bir yer tutmuştur. Nöroenflamasyonun karmaşık süreci, immün sistemin çeşitli bileşenlerini içermektedir. MSS'de nöroenflamasyon ve nöroimmün aktivasyona dahil olan hücresel bileşenler beyin mikrogliyal hücreleri, ependimal hücreler, makrofajlar, astrositler ve mast hücreleri sayılabilir. MSS'nin yaklaşık %10'unu oluşturan mikrogliyal hücreler, nöronal hasara ilk yanıt veren hücrelerdir. MS lezyonlarındaki enflamatuvar infiltratlar esas olarak T hücreleri, B hücreleri ve aktive olmuş makrofaj/mikroglialardan oluşmaktadır (43,44) (Şekil 2.3).

#### **2.1.5.1 Monosit-Makrofaj-Mikroglia Hücrelerinin MS'te Rolü**

Patogeneizde otoreaktif T ve B lenfositlerinin üzerinde durulmasına karşın, monosit, makrofaj/mikroglia gibi miyeloid hücrelerin de MS patogenezinde rol oynadığı ortaya konulmuştur. Bu durum, RRMS lezyonlarında makrofajların fazla sayıda, hastalığın ilerleyici evrelerinde ise mikrogliaların baskın şekilde bulunmasıyla doğrulanmıştır (45).



Şekil 2.3: Nöro enflamasyonda rol oynayan hücresel bileşenler ve sitokinler (44).

Monositlerin sitokin üretimini inceleyen çalışmalar, interlökin-6 (IL-6), interlökin-12 (IL-12), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-10 (IL-10) salgılayan monositlerin varlığını ortaya koymuş ve tedavi edilmemiş MS hastalarında proinflatuar IL-6 ve in IL-12 salgılayan monositlerin sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu veriler, proinflatuar monositlerin MS patolojisine önemli katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (46).

Mikroglia hücreleri, miyelin ve akson uçlarını fagositte ettikten sonra kostimülatör moleküllerin ekspresyonu artmakta ve proinflatuar sitokinlerin yanında glutamat ve reaktif oksijen türleri gibi nörotoksik molekülleri salgılayarak nöroenflamasyon ve demiyelinizasyona yol açmaktadır. Majör Doku Uyumluluk Kompleksi II (MHC-II) ile bunları MSS'e infiltre olan T hücrelerine sunarak bu hücrelerin yeniden aktivasyonuna sebep olmaktadır (47).

Proinflamatuvar makrofajlar, Treg hücrelerinin çoğalmasını kısıtlamaktadır. Böylece anti-enflamatuvar yolağı baskılayıp patogenezin ilerlemesine neden olduğu tespit edilmiştir (48).

#### **2.1.5.2 CD8<sup>+</sup> T Hücrelerinin MS'te Rolü**

MS patogenezinde periferik immün etkileşimlerde CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin merkezi rolü iyi tanımlanmış olsa da CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin beyin lezyonlarında baskın T hücre popülasyonu olduğu uzun süredir bilinmektedir. Özellikle parankimde CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin CD4<sup>+</sup> T hücrelerinden daha yoğun olduğuna ilişkin ilk gözlemler 1980'li yıllarda bildirilmiştir (49). MS hastalarından alınan plaklarda doku analizi yapılmış, 70 kortikal plağın 54'ünde CD8<sup>+</sup> T hücresi saptanmış ve bu plakların hastalığın erken evresindeki bilişsel bozukluklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (50).

Yapılan bir akım sitometri çalışmasında, MS hastalarında antijene özgü CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin proliferatif yanıtları değerlendirilmiştir. RRMS hastalarının sağlıklı gönüllülere veya PPMS hastalarına kıyasla MSS peptitlerine karşı CD4<sup>+</sup> T hücrelerine göre daha yüksek düzeyde CD8<sup>+</sup> T hücre yanıtı gösterdikleri tespit edilmiştir (51). Başka bir çalışmada, apoptoza özgü epitopları tanıyan CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin MS hastalarının periferik kanında belirgin biçimde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, apoptoza özgü epitoplarla uyarıldıklarında interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ve/veya interleukin-17 (IL-17) üretebildikleri rapor edilmiştir. Bu hücreler aynı zamanda BOS'ta da tespit edilmiştir (52). Dejenerasyona uğramış miyelin bazık proteinleri (MBP) ile inkübe edilen ışınlanmış periferik kan mononükleer hücreleriyle temas ettirilen CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin proliferatif yanıtı bir çalışmada incelenmiş ve MBP'yi tanıyan otreaktif CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin kan dolaşımındaki oranının MS hastalarında anlamlı düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir (53).

Tüm bu çalışmalara rağmen CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin glia hücrelerinden, oligodendrositlerden veya nöronlardan kaynaklanan antijenleri tanımadığı yani, antijen özgüllüğünün net olmadığı da öne sürülmüştür (54). Ancak, Epstein-Barr nükleer antijen-1 (EBNA-1) ve glial hücre adezyon molekülüne (GlialCAM) karşı çapraz reaktif antikörleri tanımlayan bir çalışmada, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ve granzim B eksprese eden efektör CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin, özellikle hastalarda GlialCAM'e yanıt verdiği gösterilmiştir. Dikkat çekici olarak, bir T hücresi

popülasyonunun EBV ile enfekte B hücreleri tarafından da aktive edilebildiği ve enfekte B hücrelerinin veya monositlerin EBV kaynaklı peptitleri sunarak MS lezyonları içinde CD8<sup>+</sup> T hücrelerini doğrudan aktive edilebileceği de öne sürülmüştür (55).

CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin MS'te enflamatuvar rolünün yanında anti-enflamatuvar rolünün de olabileceği varsayılmaktadır. CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin hastalık indüksiyonu öncesinde elimine edildiği hayvan modeli çalışmasında EAE'nin daha şiddetli seyrettiği; bu hücrelerin, CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin ve proenflamatuvar antijen sunan hücreler (APC) üzerinde baskılayıcı etki göstererek otoimmün yanıtlar üzerinde düzenleyici bir rol üstlendiği öne sürülmüştür. Bu immün düzenleyici etkilerin, MS atakları sırasında belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir. Buna karşın, glatiramer asetat ile tedavi edilenlerde söz konusu baskılayıcı fonksiyonların yeniden kazanıldığı gösterilmiştir (55).

#### **2.1.5.3 B Hücrelerinin MS'te Rolü**

MS'te oluşan doku hasarı ve B hücre antikör yanıtları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışmalar, perivasküler MS lezyonlarının incelenmesinden elde edilmiştir. Bu çalışmalarda fagositik hücreler içinde miyelin parçalarına bağlı antikörler olduğu saptanmıştır (56).

MS'de B hücrelerinin MSS üzerindeki hasar oluşturuvcu etkilerinin hem antikora bağlı hem de antikordan bağımsız mekanizmalarla ortaya çıktığı ileri sürülmüştür. Plazmoblastlar ve plazma hücreleri tarafından antikör üretilmesinin yanı sıra, B hücrelerinin hastalık patogenezinde rol oynadığı işlevler arasında şunlar gösterilmiştir:

- T hücrelerine antijen sunarak, beyne göç eden T hücrelerinin özellikle bellek B hücreleri aracılığıyla kendi kendine çoğalmasını tetiklemek,
- Enflamatuvar süreci devam ettiren sitokin ve kemokinleri salgılamak,
- Oligodendrositler ve nöronlara zarar veren çözünür toksik maddeleri üretmek,

- Meninks dokusunda ektopik lenfoid yapıların oluşumuna katkı sağlamak ve EBV enfeksiyonu için bir konak hücre rezervuarı oluşturmak.

Bu işlevlerin hem MS ataklarına hem de hastalığın ilerleyici seyri üzerine etkili olabileceği öne sürülmüştür (57).

B hücrelerinin, T hücrelerini hem CD80 hem de CD86 yoluyla aktive ettiği gösterilmiştir. MS'te, aktif hastalığı olan bireylerde dolaşımdaki CD80<sup>+</sup> B hücre sıklığı anormal derecede artmış olarak bulunmuştur (58). Uyarıcı işlevinin yanı sıra, B hücrelerinin efektör T hücre yanıtlarını baskılamada rol oynayan inhibitör molekülleri de eksprese ettiği tespit edilmiştir. Örneğin, B hücreleri tarafından eksprese edilen programlanmış hücre ölümü ligandı-1 (PD-L1), programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1) reseptörü aracılığıyla T hücresi yanıtlarını baskılayarak EAE'ye karşı koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir (59).

MS hastalarında özellikle bellek B hücreleri, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, TNF, lenfotoksin alfa, IL-6 ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı Faktör (GM-CSF) gibi sitokinleri yüksek düzeyde üretebildikleri gösterilmiştir (60). Bu sitokinlerden özellikle IL-6, Th17 hücre yanıtlarının oluşumunda önemli bir rol oynamakta olup hem MS hem de EAE'de patojenik etkiye sahiptir. B hücre kaynaklı IL-6'nın uzaklaştırılması, Th17 yanıtlarını ve EAE şiddetini azaltmıştır (61). BOS'ta anormal immünoglobulin sentez oranları ve karakteristik OKB varlığı, MS'in ayırt edici biyobelirteçleri arasında yer almaktadır. MS hastalarının büyük çoğunluğunda IgG bantları tespit edilmiştir. IgM bantları ise olguların yaklaşık %30 ila 40'ında görülmüş ve bu durum, daha agresif bir hastalık seyriyle ilişkilendirilmiştir (60).

Son yıllarda, yoğun çabaya rağmen MS'te spesifik antijen varlığı netleştirilememiştir. Miyelin oligodendrosit glikoproteini (MOG) ve akuaporin-4 (AQP4) gibi antijenlere karşı gelişen antikorlar, daha önce MS başlığı altında değerlendirilen alt grup hastalıkların sınıflandırılmasında kullanılmıştır. AQP4, NMO patogeneğinde kilit rol oynayan bir belirteç olarak kabul edilmiştir. MOG, MSS'de miyelin kılıflarının en dış tabakasında ve oligodendrositlerin ekstrasellüler yüzeyinde eksprese edilir. Tipik MS vakalarının büyük çoğunluğu anti-MOG negatiftir. Anti-MOG antikorlarının varlığı, Anti-MOG Antikor İlişkili Hastalık (MOGAD) tanısında hem biyobelirteç hem de ayırıcı kriter olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle MOGAD,

artık MS veya klasik anti-AQP4<sup>+</sup> Nöromyelitis Optika Spektrum Bozukluğu (NMOSD) alt tipi değil, ayrı bir nöroenflamatuvar demiyelinizan hastalık olarak kabul edilmektedir (57).

#### **2.1.5.4 CD4<sup>+</sup> T Hücrelerinin MS'te Rolü**

İmmün sistemin her hücresi, MS'te enflamatuvar yanıtı tetikleyebilse de asıl rolü oynayanın otoreaktif CD4<sup>+</sup> T hücreleri olduğu ortaya konmuştur (2). Periferik lenf düğümlerinde aktive olan bu hücreler MSS'e göç edip burada tekrar aktive olur. Sitokin ve kemokin salgılayarak MS'e özgü lezyonların oluşmasına neden olur (62).

Farklı Th hücre alt grupları, bir veya daha fazla soy tanımlayıcı sitokin salgılayarak, anahtar transkripsiyon faktörleri ve homing reseptörleri eksprese ederek naif CD4<sup>+</sup> T hücrelerinden farklılaşır. Naif CD4<sup>+</sup> T hücreleri, periferik lenf düğümlerinde, patojenden türeyen peptitleri MHC- II sınıfı molekülleriyle ilişkili olarak sunan olgun dendritik hücreler (DC) aracılığıyla aktive olur. Kostimülatör moleküller T hücre proliferasyonunu kolaylaştırırken, polarizan sitokinlerin varlığı da CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin farklı Th alt gruplarına (Th1, Th2, Th17, Th17.1, Th22, Th9) farklılaşmasını sağlar (63).

Th1 hücreleri, yüzeyde C-X-C kemokin reseptör tip 3 (CXCR3-CD183) ve IL-12R  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 zincirlerinin, sitoplazmada ana transkripsiyon faktörü T-bet ekspresyonu aracılığıyla tanımlanabilmektedir. IL-12 ve IFN- $\gamma$ , T-bet ekspresyonunun indüklenmesinde birlikte rol almakta ve böylece Th1 yönünde farklılaşmasını artırmaktadır (64).

MS patogenezinde IFN- $\gamma$  üreten Th1 hücreleri hem insanların hem de EAE modeli hayvanların MSS'inde en yaygın Th1 hücre alt grubu olarak tanımlanmıştır. EAE çalışmalarında ve MS hastalarının aktif lezyonlarında bol miktarda IFN- $\gamma$  saptanmıştır. Ayrıca, Th1 hücrelerinin adaptif transferi, alıcı farelerde EAE'nin oluşması için tek başına yeterli olmuştur. Bu bulgular ve MS hastalarına IFN- $\gamma$  uygulanmasının hastalığı kötüleştirdiğine ilişkin ilk gözlemler hem EAE'de hem de MS patogenezinde IL-12/IFN- $\gamma$  eksenini ve Th1 hücrelerinin önemli rolünü desteklemektedir (65).

Yapılan çalışmalar, mikrogliaların Th1 hücrelerinin başlıca hedefi olduğunu göstermektedir. Th1 hücrelerinin, yerleşik mikrogliaları aktive eden ve onların enflamatuvar ve nörotoksik M1-benzeri fenotipe farklılaşmasını başlatan çeşitli efektör moleküller ürettikleri gösterilmiştir (66).

Bununla birlikte, IL-12p35 alt birimi, IL-12R $\beta$ 2 zinciri ya da IFN- $\gamma$ 'dan yoksun farelerin EAE'ye yatkın olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, hastalığın erken evrelerinde IL-12 uygulanmasının, IFN- $\gamma$  bağımlı bir şekilde EAE'yi baskıladığı gösterilmiştir. Bu durum, Th1 hücrelerinin EAE'de ve MS'teki başlıca patojenik hücre alt grubu olduğu görüşünün önemini azaltmıştır (67). IL-23'ün IL-12 ile p40 alt birimini paylaştığının ve IL-23R reseptörünün IL-12R $\beta$ 1 zincirini içerdiğinin keşfi, bu çelişkili sonuçları açıklamış ve IL-23'ün, IL-17 üreten bir Th hücre alt grubu olan Th17 hücrelerinin çoğalmasını uyararak EAE'yi kolaylaştırmadaki rolünü ortaya koymuştur (65).

Th17 hücreleri, retinoik asit ilişkili orphan reseptör gama T (ROR $\gamma$ t) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT3) ekspresyonu ile karakterize olup IL-17, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23 ve TNF- $\alpha$  dahil olmak üzere proenflamatuvar sitokinler salgılayan bir T yardımcı hücresi alt grubudur. Ayrıca, Th17 hücrelerinin C-C kemokin reseptörü 6 (CCR6-CD196) ve CD6 gibi molekülleri yüksek düzeyde eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu moleküller, T hücrelerinin MSS'e göçünü artırmakta, EAE ve muhtemelen MS'in gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (68).

Th17 aracılı ensefalopatojenitenin başlıca sorumlusu IL-17A sitokindir. IL-17; IL-8, C-X-C motifli kemokin ligand 1 (CXCL1), C-X-C motifli kemokin ligand 6 (CXCL6), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, makrofaj inflamatuvar proteini-2 (MIP-2), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) gibi çeşitli enflamatuvar mediatörlerin salgılanmasını artırmaktadır. IL-17, nötrofil göçünü artırır ve enflamatuvar sitokinlerin güçlü bir uyarıcısıdır (69).

MS hastalarının hem plaklarında hem de BOS'unda yüksek düzeyde IL-17 saptanmıştır. IL-17 düzeyinin aktif plak sayısı ile korele olduğu bildirilmiştir. Aktif hastalığı bulunan MS hastalarının dolaşımdaki lökositlerinde IL-17 düzeyleri, sağlıklı bireyler veya inaktif hastalık dönemindekilere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca IL-17 ekspresyon düzeyinin MS şiddeti ile korelasyon gösterdiği de ortaya

konmuştur. Tüm bunlar, IL-17 salgılayan Th17 hücrelerinin patogeneizde önemli rol oynadığını düşündürmüştür (68,70).

RRMS hastalarında IL-17A'nın IL-6 ile birlikte, KBB bütünlüğünü bozarak enflamatuvar hücrelerin MSS'e geçişini kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Th17 hücrelerinin atak döneminde MSS'e göçünün arttığı gösterilmiştir (71).

Th17.1 hücreleri, hem IFN- $\gamma$  hem de IL-17 üreten yeni bir T yardımcı hücre alt grubu olarak yakın zamanda tanımlanmıştır. Bu interlökinleri üretmesi nedeniyle "Th1 benzeri Th17" hücreleri olarak da ifade edilmektedir. T-bet ile CXCR3'ü; ROR $\gamma$ t ile CCR6'yı birlikte koeksprese eder ve klasik Th17 hücrelerine kıyasla daha az miktarda IL-17A, ancak daha fazla IFN- $\gamma$  üretirler (72,73).

Nöroenflamasyona katılan bu hücreler hem EAE'de hem de MS hastalarında KBB'yi geçme ve MSS'de birikme kapasitesine sahip olup, MS hastalarının beyin dokularında gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin RRMS hastalarında atak döneminde artış gösterdiği saptanmış ve miyeline özgül Th17.1 hücreleri, MS hastalarının hem periferik kanında hem de BOS'unda yüksek düzeyde bulunmuştur. Ayrıca, IFN- $\gamma$ , GM-CSF ve very late antigen- 4 (VLA-4) düzeyleri yüksek, IL-17 düzeyi düşük olan Th17.1 hücreleri, RRMS hastalarında hastalık aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (65).

Yine bir çalışmada, VLA-4 integrinini en yüksek düzeyde eksprese eden alt grubun Th17.1 hücreleri olduğu tespit edilmiştir. Natalizumab tedavisi sonrası bu hücrelerin MSS'e geçememesi sonucunda kanda daha fazla birikmesi terapötik hedefin bu hücreler olabileceğini ve KİS'ten RRMS'e geçiş ile hastalık aktivitesinin sürdürülmesinde merkezi bir rol üstlendiklerini göstermiştir (74).

Th2 hücrelerinin IL-4, IL-5, IL-10 gibi sitokinler salgılaması, MS'te inflamasyonun azalması ve semptomların düzelmesi ile ilişkilendirilmiştir. Th2 ve Th1'den salgılanan sitokinlerin birbirlerini karşılıklı olarak inhibe edebildiği ve hastalığın ilerleyişinin, her iki sitokin tipinin dengesine bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Th1 sitokinlerinin Th2 yönünde indüklenmesinin, otoimmünitenin baskılanmasını sağlayarak klinik seyir üzerinde yararlı bir etki oluşturabileceği savunulmuştur (75).

Yapılan bir çalışmada MS hastalarında antikor ve kompleman birikimi ile karakterize “Pattern II” lezyonları incelenmiş ve Th2 hücrelerinin masum olmayabileceği, B hücrelerini aşırı aktive edip otoantikor üretimini teşvik edebileceği öne sürülmüştür (76).

Th22, IL-22 salgılayan CD4<sup>+</sup> T hücre alt grubu hücrelerindendir. IL-22’nin MS’teki rolüne ilişkin yapılan çalışmada, IL-22 üretiminin sağlıklı popülasyona göre fazla olduğu, IL-17 ile birlikte hareket ederek KBB’nin bütünlüğünü bozduğu gösterilmiştir (77).

Yine Th9, IL-9 salgılayan CD4<sup>+</sup> T hücre alt grubundandır. EAE çalışmalarında IL-9’un etkisinin hem enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar rolü olabileceğine ilişkin çelişkili bulgular bildirilmiştir (65). Ruocco ve ark. RRMS hastalarında IL-9 düzeyinin enflamatuvar aktivite ve nörodejenerasyon ile ters korelasyon gösterdiğini gözlemlemişlerdir (78). Yine daha önce yapılan bir çalışmada da MS hastalarında IL-9 düzeylerinin klinik alevlenmeler sırasında düşük olduğu, prednizolon tedavisinden sonra ise yükseldiği gösterilmiştir. Bu da MS hastalarında IL-9’un koruyucu bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir (79).

#### **2.1.5.5. Treg Hücrelerinin MS’te Rolü**

Otoimmünitenin oluşumu, Th hücrelerini denetim altında tutarak immün yanıtları düzenleyen belirli T hücreleri tarafından kontrol edilmektedir. İlk olarak 1995 yılında Sakaguchi ve ark. tarafından izole edilen Treg hücreleri, efektör enflamatuvar T hücrelerini baskılama ve öz toleransı sürdürme kapasitesine sahip CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> (Forkhead kutusu P3) T hücre alt grubu olarak tanımlanmıştır (80).

Treg’ler, aktive olmuş otoreaktif efektör CD4<sup>+</sup> T hücreleriyle kümeler halinde bir araya gelerek yakın temas yoluyla onları kontrol altına alırlar. Bu süreçte yüksek düzeyde CD25 eksprese etmeleri sayesinde IL-2’yi bağlayarak otoreaktif efektör T hücreleri için gereken temel sitokinden mahrum bırakır ve böylece apoptozu indükleyerek gelişmekte olan otoimmüniteyi baskırlar (81).

Ayrıca enflamatuvar T hücrelerinin aktivasyonunu baskılamak için özellikle sitotoksik T lenfosit antijeni-4 (CTLA-4) molekülünü kullanır. CTLA-4, CD80 ve CD86 ligandlarını bağlayarak bunların otoreaktif efektör T hücrelerindeki CD28’e

bağlanmasına engel olur ve bu ligandlara CD28'den daha yüksek afinite göstermesi sayesinde DC ile etkileşimde üstünlük sağlayarak bu hücrelerin aktive olmasını engellerler (82).

MS'te Treg hücrelerine ilişkin ilk çalışmalar, EAE modelinde yapılmış ve bu hücrelerin ablasyonunun hastalığı ağırlaştırdığı, adaptif transferin ise hastalığı baskıladığı gösterilmiştir (83,84). Daha sonraki birçok çalışma, MS hastalarında Treg hücrelerini incelemiş ve dolaşımdaki CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hücrelerin ölçümlerine dayalı olarak Treg hücre frekansının normal veya azalmış olduğunu ortaya koymuştur (85–88).

CD39 ekspresyonu, hafıza fenotipine sahip Treg hücrelerini tanımlar ve bu hücreler daha stabil olup artmış fonksiyonel aktivite gösterir. CD39<sup>+</sup> Treg hücreleri, Th17 hücrelerinden IL-17 üretimini etkili bir şekilde baskılayabilirken, CD39<sup>-</sup> Treg hücrelerinde bu özellik bulunmamaktadır. Dolayısıyla MS hastalarında CD39<sup>+</sup> Treg hücrelerinin azalması, bu hastalıkta Th17 aracılı enflamasyonun yetersiz kontrolüne katkıda bulunduğu düşünülmektedir (89).

## **2.2 İntegrinler**

### **2.2.1 İntegrinlerin Yapısı ve Görevleri**

İntegrinler, esas olarak hücre dışı matriks (ECM) ligandlarını ve hücre yüzeyi ligandlarını tanıyan, hücre adezyon reseptörlerinin süper ailesidir. Bunlar transmembran  $\alpha\beta$  heterodimerlerdir ve insanlarda en az on sekiz  $\alpha$  ve sekiz  $\beta$  alt birimi keşfedilmiştir. Yirmi dört  $\alpha\beta$  heterodimeri kombinasyonel olarak oluşmaktadır. İntegrin alt birimleri, ligand bağlanmasına katkı sağlayan geniş hücre dışı alanlara (yaklaşık 800 amino asit), tek bir transmembran alanına (yaklaşık 20 amino asit) ve kısa sitoplazmik kuyruklara (13–70 amino asit,  $\beta 4$  hariç) sahiptir. Bu üç alanın tümü, heterodimerlerin belirli ECM bileşenleri veya ligandlara özgü afinite göstermesini sağlamaktadır (3).

İntegrinler, ECM ile etkileşime girerek hücre adezyonunu, sinyal iletimini ve enflamatuvar yanıtları düzenler. Nöronal gelişim, sinaptik plastisite ve KBB'nin korunmasında vazgeçilmez roller üstlenir. Düzenlenemeyen integrin sinyallemesinin çeşitli nörolojik bozuklukların patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiş olup,

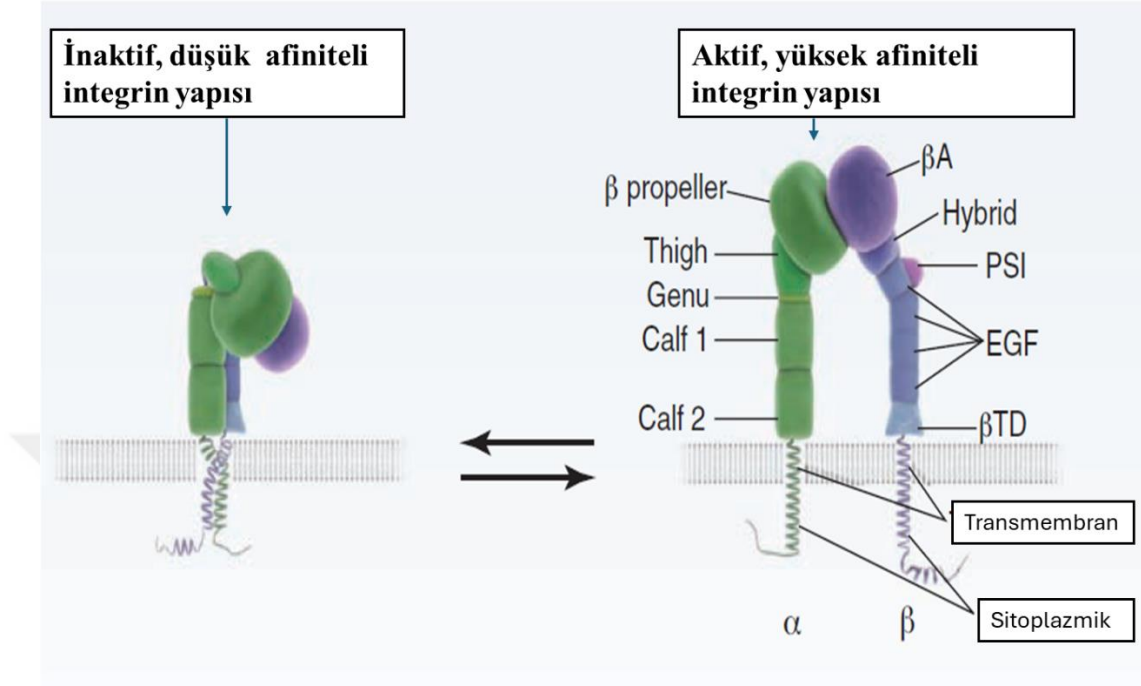
integrin antagonisti veya agonisti gibi integrin hedefli girişimlerin yeni tedavi stratejileri olabileceği öne sürülmüştür (90).

İntegrinlerin keşfi 1980'lerin başlarına dayanmakta olup, 1987 yılında Richard O. Hynes ve Erkki Ruoslahti, bu transmembran reseptör proteinlerini birbirinden bağımsız fakat neredeyse eşzamanlı olarak tanımlamışlardır. Hynes, hücreler arası etkileşimlerin ECM ile entegrasyonundaki rolünü vurgulamak için “integrin” terimini ortaya koymuştur (90,91). Ruoslahti ve Pierschbacher ise fibronektin-hücre etkileşimleri üzerine yaptıkları çalışmalar aracılığıyla integrinlerin hücre adezyonundaki kritik rolünü ortaya çıkarmışlardır (92). Aynı yıl, bilim insanları integrinlerin  $\beta$  alt birimlerini başarıyla klonlamış ve iki alt birimden oluşan heterodimerik reseptörler olduğunu keşfetmişlerdir. Bu buluş, integrinlerin yapısı ve işlevine yönelik ileri araştırmalar için temel oluşturmuştur (93,94).

Araştırmacılar 2002'de, integrinlerin enflamasyondaki kritik rolünü tanımlamış ve beyaz kan hücrelerinin yüzey ligandlarıyla etkileşimleri aracılığıyla lökosit migrasyonunu enflamasyon bölgelerine aracılık ettiklerini göstermişlerdir. Bu bulgu, anti-enflamatuvar ilaçların geliştirilmesi için yeni bir yol açmıştır (95).

Heterodimerin hücre dışı alanı, iki uzun bacak üzerinde yerleşmiş bir ligand bağlayıcı baş bölgesinden oluşur.  $\alpha$  integrin alt birimleri, baş kısmını oluşturan yedi kanatlı bir  $\beta$ -propeller alanı, bir *thigh* alanı ve *calf-1* ve *calf-2* alanlarını içerir.  $\alpha$  alt birimlerinin yarısı, bir von Willebrand faktör A alanı olarak da adlandırılan bir I alanı içerir; bu alan bulunduğunda, neredeyse her zaman ligand bağlanma bölgesini oluşturur. I alanı, integrinler tarafından ligand bağlanması için gerekli olan, iki değerlikli katyonların bağlandığı korunmuş bir metal iyonuna bağımlı adezyon bölgesi (MIDAS) taşır.  $\beta$  alt birimi ise,  $\alpha$  alt biriminin I alanına benzer özellikler taşıyan  $\beta$ I alanına bağlanan bir hibrit alan, bir plexin/semaforin/integrin alanı, dört epidermal büyüme faktörü benzeri alan ve membrana yakın bir  $\beta$  kuyruk alanından oluşur. I alanı bulunmayan integrinlerde ligandlar,  $\alpha\beta$  alt birim arayüzündeki bir yarığa bağlanır; burada  $\beta$  alt birimindeki metal içeren MIDAS ve  $\alpha$  alt biriminin propeller alanı ile etkileşim kurarlar. Bu modüler yapı, integrinlerin olağanüstü çok işlevliliğini desteklemenin yanı sıra, genellikle “dışarıdan içe” ve “içeriden dışa” sinyal

mekanizmaları olarak tanımlanan çift yönlü sinyal iletim kapasitelerinin de temelini oluşturmaktadır (Şekil 2.4) (96).



Şekil 2.4: İntegrinlerin yapısı (96).

İntegrinler, birincil ECM ligandlarına veya hücre yüzeyindeki spesifik karşı reseptörlerine göre sınıflandırılmaktadır. Kollajen bağlayan integrinler (ör.  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  ve  $\alpha 11\beta 1$ ), hücrelerin (ör. astrositler, perisitler ve endotelial hücreler) kollajen matrikse tutunmasını sağlayarak bazal membran bütünlüğüne ve vasküler stabiliteye katkıda bulunmakta; ayrıca MSS’de hücre migrasyonu ve yapısal bütünlüğü desteklemektedir (97).

Arginin–Glisin–Aspartat (RGD) dizisini tanıyan integrinler ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$  ve  $\alpha IIb\beta 3$ ) anjiyogenez, yara iyileşmesi ve vasküler geçirgenliğin başlıca düzenleyicileridir. Bu grupta özellikle  $\alpha V$  integrinleri, KBB bütünlüğünün korunmasında ve enflamasyona hücrel yanıtın aracılığında temel rol oynamaktadır (98).

Laminin bağlayan integrinler ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  ve  $\alpha 6\beta 4$ ), nöronal uzantı gelişimi, sinaps oluşumu ve glial limitansın yapısını etkilemekte; ayrıca radyal glial hücreler için iskele oluşturmakta ve nöral öncül hücrelerin göçüne katkıda bulunmaktadır (99).

Lökositte özgü integrinler ( $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ M $\beta$ 2,  $\alpha$ X $\beta$ 2 ve  $\alpha$ D $\beta$ 2) esas olarak lökositlerde eksprese edilmekte olup immün hücre adezyonunu, göçünü ve aktivasyonunu düzenlemektedir. MSS’de bozulmuş lökosit integrin aktivitesi patolojik enflamasyonu tetikleyebilmektedir (100).

“İçeriden dışa” sinyalleme, hücre içi sinyallerin integrinlerde konformasyonel değişiklikleri tetikleyerek onların ECM ligandlarına afinitesini artırdığı karmaşık bir hücre içi mekanizmayı temsil eder. G proteinine kenetli reseptörlerin aktivasyonu, sitokin reseptör sinyali veya lokalize ikinci haberciler tarafından uyarıldıktan sonra, talin ve kindlin gibi temel sitoplazmik proteinler integrinlerin  $\beta$ -alt birimi sitoplazmik kuyruğuna bağlanır. Bu etkileşim,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt biriminin transmembran ve sitoplazmik bölgeleri arasındaki tuz köprüsünü bozarak hücre dışı bölgesinde konformasyonel değişimi tetikleyerek integrinlere ligand bağlanması için afiniteyi artırır (101).

“Dışarıdan içe” sinyalleme, integrinlerin yüksek afinite konformasyonuna geçip laminin, kollajen ve fibronektin gibi hücre dışı ligandlara bağlanmasıyla başlar. Bu bağlanma, reseptörlerin hücre zarında kümelenmesine ve fokal adezyon kinaz (FAK) ve Src ailesi kinazlarının aktivasyonuna yol açar. Ardından FAK–Src eksenini paksillin ve p130Cas gibi iskelet proteinlerini fosforile ederek sitoskeletal organizasyonu ve hücre göçünü düzenlerken, PI3K/Akt yolu nöronal sağkalımı destekler ve nöronal uzantı gelişimini teşvik eder. Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolu proliferasyon, farklılaşma ve onarımla ilişkili gen ekspresyonunu modüle ederken, Rho GTPazları (RhoA, Rac1, Cdc42) aktin polimerizasyonunu ve fokal adezyon döngüsünü kontrol ederek hücre polaritesi, morfolojisi ve hareketliliğini düzenler. Ayrıca ILK/PINCH/Parvin kompleksi aktin iskeletini, proliferasyon ve nöronal migrasyonu koordine eder. Bu bütünlük mekanizmaları sayesinde dışarıdan içe sinyalleme, nöronlarda sinaptik plastisiteyi, glial hücrelerde inflamatuvar ve nöroprotektif yanıtları, endotelial hücrelerde ise KBB bütünlüğü ve anjiyogenezi düzenleyerek MSS’nin fizyolojik işlevlerinin korunmasında ve hasara yanıtında kritik rol oynar (90).

### 2.2.2 İntegrinlerin MS’te rolü

MS’teki esas suçlunun, periferden MSS’e geçen aşırı aktive T hücreleri olduğu ifade edilmiştir. MSS’de tekrar aktive olan bu hücrelerin, inflamasyonu modüle eden

sitokinler ve kemokinler salgılayarak makrofajları, dendritik hücreleri, astrositleri ve mikrogliaları aktive ettiği; bunun da nöron, miyelin ve oligodendrosit hasarına yol açarak nörodejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir. T hücrelerinin MSS'e göçü, MS gelişiminde kilit bir aşama olarak kabul edilmektedir (102).

KBB esas olarak beyin mikrodamarlarının endotelial hücreleri, astrositler ve perisitlerden ve diğer bazı bileşenlerden oluşmaktadır. Endotelial hücre tabakası, özel sıkı bağlantılar olan tight junction yapıları barındırır ve KBB'nin düşük paraselüler geçirgenliği ile yüksek elektriksel direnç sağlar. İntegrinler bu noktada devreye girerek lökosit ile endotelial yüzey arasında yüksek afiniteli adezyon görevi sağlarlar. Proenflamatuvar sitokinlerle aktive olduktan sonra endotelial hücreleri ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerini eksprese etmektedir (103).

### **2.2.3 $\alpha 4\beta 1$ İntegrin**

VLA-4 olarak da bilinen  $\alpha 4\beta 1$  integrinleri,  $\alpha 4$  (CD49d) ve  $\beta 1$  (CD29) olmak üzere iki alt birimden oluşur. Endotelial karşı reseptörü VCAM-1'e bağlanarak lökositlerin MSS'e girişine olanak tanırken, çözünebilir VCAM-1 ise  $\alpha 4\beta 1$  integrinleri ile etkileşerek endotelial bariyer fonksiyonunu bozar (9,102) (Şekil 2.5).

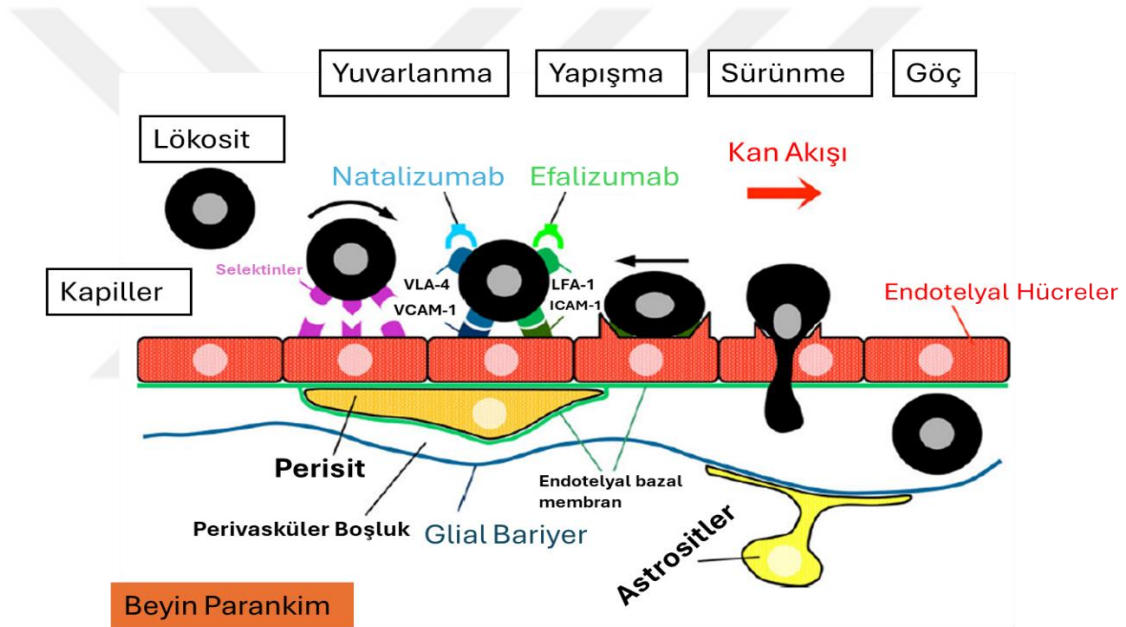
$\alpha 4$  integrinlerinin lökositlerin beyne göçündeki kritik rolleri nedeniyle,  $\alpha 4\beta 1$  integrinlerinin uzun süreli inhibisyonu MSS enflamasyonunu baskılayabilir, spontan remiyelinizasyonu artırabilir ve nihayetinde EAE'deki patolojik anormallikleri tersine çevirebilmektedir (5,6).  $\alpha 4$ 'e karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikor olan ve MS hastalarının tedavisi için onaylanan natalizumab rutin klinik kullanımda tedavi edici ajan olarak hala kullanılmaktadır (7).

### **2.2.4 $\alpha L\beta 2$ İntegrin**

Lökositlerin enflamasyon bölgelerine göçünde rol oynayan bir diğer integrin  $\alpha L\beta 2$ , diğer adıyla LFA-1'dir.  $\alpha L$  (CD11a) ve  $\beta 2$  (CD18) olmak üzere iki alt birimden oluşur. LFA-1, dolaşımdaki lökositlerin damar duvarı üzerinde yuvarlanmasına katılmakla birlikte, esas olarak lenfoid organların damar yatağı ve enflamasyon bölgelerinde ICAM-1 ligandlarıyla etkileşime girerek lökositlerin sıkı tutunmasını sağlar. LFA-1/ICAM-1 etkileşiminin ayrıca lenf düğümlerinde antijen tanıma

sırasında T hücrelerinin sıkı tutunmasında rol oynadığını ve T hücrelerinin ameboid göçünü modüle ederek antijen taramasını kolaylaştırdığını ortaya koymuştur (8,104).

Efalizumab, LFA-1'in  $\alpha$ L integrin alt birimini hedefleyen insanlaştırılmış rekombinant bir monoklonal antikordur. Şiddetli ve tedaviye dirençli psöriazis hastalarında da kullanılmıştır. Efalizumab ilk olarak Ekim 2003'te ABD'de onaylanmış, ancak Nisan 2009'da dört PML vakasının bildirilmesi üzerine piyasadan çekilmiştir. PML gelişimine ilişkin kaygı göz önünde bulundurulması gereken bir husus olmakla birlikte, LFA-1/ICAM-1 blokajının terapötik mekanizması iyi tanımlandığından, efalizumab gelecekte MS tedavisi için geliştirilebilecek umut verici bir ilaç olarak değerlendirilebilir (9) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: VLA-4 ve LFA-1'in KBB'ye lenfosit migrasyonundaki görsel temsili (9).

### 2.2.5 $\alpha$ M $\beta$ 2 İntegrin

$\alpha$ M $\beta$ 2, diğer adıyla MAC-1 integrini lökositlerin yüzeyinde eksprese edilir ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kritik rol oynar.  $\alpha$ M (CD11b) ve  $\beta$ 2 (CD18) olmak üzere iki alt birimden oluşur. Vasküler hasar bölgelerinde lökositlerin toplanmasına, sıkı adezyonuna ve transendotelial göçüne katkıda bulunur ve doku enflamasyonunu kolaylaştırır. Biyokimyasal hücre temelli çalışmalar,  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrinin plazma proteini fibrinojenin, kompleman protein fragmanı iC3b'nin, trombosit yüzey reseptörü glikoprotein Ib ve ICAM-1 dâhil olmak üzere çok çeşitli ligandlarla etkileşimlerini karakterize etmiştir (10).

MS de dâhil olmak üzere MSS’de demiyelinizan hastalıkların gelişiminde  $\alpha M\beta 2$ ’nin rolü tam olarak anlaşılmamıştır. EAE çalışmalarında çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Antijenle yeniden uyarılmış T hücrelerinin  $\alpha M\beta 2$  eksik farelere adaptif transferi, anlamlı şekilde hafifletilmiş EAE’ye yol açarken;  $\alpha M\beta 2$  eksik antijenle yeniden uyarılmış T hücrelerinin kontrol farelerine transferi EAE gelişimini indükleyememiştir (105).

### 2.2.6 $\alpha V\beta 3$ İntegrin

$\alpha V$  integrinleri endotel hücreleri, fibroblastlar ve astrositlerde eksprese edilir. Anjiogenez, yara iyileşmesi, vasküler geçirgenliğin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Endotelyal hücrelerde ekspresyonu KBB’nin korunmasında kritik bir rol oynar (90).

$\alpha V\beta 3$  integrinin T lenfositler üzerindeki rolü son yıllarda giderek daha iyi anlaşılmıştır. EAE modellerinde özellikle Th17 hücrelerinin IL-23’e bağımlı olarak  $\alpha V\beta 3$ ’ü yüksek düzeyde eksprese ettiği ve bu reseptörün hastalık patogenezinde kritik olduğu gösterilmiştir.  $\alpha V\beta 3$  inhibisyonu Th17 hücrelerinin enflamatuvar etkilerini ve hastalık indüksiyonunu anlamlı ölçüde azaltır (12).

Bu çalışma, Multiple Skleroz (RR-MS) hastalarının atak döneminde Th hücre alt gruplarındaki değişiklikleri ortaya koyarak, bu dönemin periferik kan analizi ile ortaya konulup konulamayacağını araştırmak için planlanmıştır. Bunun için atak ve remisyon dönemindeki RR-MS hastalarının perifer kanında Th1, Th2, Th17, Th17.1, Treg oranları ve bu hücrelerin KBB’yi aşp enflamasyonun oluşmasında rolü olduğu düşünülen hücre yüzey integrinlerinden,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$  ve  $\alpha 4$ ,  $\beta 3$  eksprese eden Th hücre oranları akım sitometri metodu ile belirlendi. Bu çalışmanın sonuçlarının Th hücrelerinin MSS’deki otoimmün enflamatuvar hastalığın patogenezinde spesifik katkısından sorumlu moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunacağını ve bu bozukluklar için yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma için, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Rektörlüğü Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 07.05.2024 tarihli ve 2024/06-28 sayılı kararına istinaden onay alındı (EK-1).

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 24.TUS.004 proje numarası ile destek alındı.

Çalışmaya katılmak isteyen hasta ve sağlıklı gönüllüler “Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu” imzalamış ve kendi rızalarıyla çalışmaya katılmaya gönüllü olmuşlardır.

#### **3.1 Hasta Seçimi ve Gönüllüler**

##### **3.1.1 RRMS Atak Dönemi Hastası Seçimi**

01.02.2025-01.09.2025 tarihleri arasında Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Nöroloji Polikliniğine başvuran ya da servise yatışı yapılan hastalar bu çalışmaya dahil edildi.

Atak hastası seçimi için, 2017 McDonald Kriterlerini karşılayan ön planda RRMS düşünülen yeni tanıli hastalar ve daha önce RRMS tanısı almış hastaneye atak bulgularıyla başvuran toplamda 20 hasta Nöroloji Hekimi tarafından değerlendirilerek çalışmaya dahil edildi.

##### **3.1.2 RRMS Remisyon Dönemi Hastası Seçimi**

01.02.2025-01.09.2025 tarihleri arasında Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Nöroloji Polikliniğine başvuran remisyon dönemindeki RRMS hastaları bu çalışmaya dahil edildi.

Remisyon hastası seçimi için, daha önce 2017 McDonald Kriterlerini karşılayıp RRMS tanısı almış, remisyon döneminde poliklinik kontrolüne gelen 20 hasta Nöroloji Hekimi tarafından değerlendirilerek çalışmaya dahil edildi.

### 3.1.3 Sağlıklı Birey Seçimi

Herhangi bir kronik hastalığı, sürekli kullandığı bir ilacı olmayan, ayrıca kan alımı zamanı akut enfeksiyonu bulunmayan, çalışmaya katılmaya gönüllü olan, cinsiyet fark etmeksizin 18-65 yaş arası 20 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi.

### 3.1.4 RRMS Atak ve Remisyon Hastası Kabul Kriterleri

- RRMS tanısı almış olmak.
- 18-65 yaş aralığında olmak.
- MS harici başka kronik hastalığı olmamak.
- Başvuru anında, son 1 yıl içinde immünsüpresif ya da immünmodülatör ilaç kullanmamış olmak.
- Nöroloji Hekimi tarafından, klinik ve görüntüleme bulgularına dayanarak atak veya remisyon dönemi hastası olarak değerlendirilmek.

### 3.1.5 RRMS Atak ve Remisyon Hastası Dışlama Kriterleri

- PPMS ve SPMS tanısı almış olmak.
- Başvuru anında başka bir hastalığa ait akut enflamasyon bulguları taşımak.
- Remisyon hastası olup son 6 ay içinde atak geçirmiş olmak.

**Tablo 3.1:** Demografik verilerin özellikleri

|                | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Gönüllü Sayısı | 20                             | 20                          | 20                              |
| Yaş            | 27,70 $\pm$ 8,18               | 31,40 $\pm$ 11,13           | 40,15 $\pm$ 10,12               |
| Kadın/ Erkek   | 14/6                           | 16/4                        | 13/7                            |

Remisyon grubunun yaş ortalaması diğer iki gruba göre yüksekti ( $p<0.05$ ). Cinsiyet yönünden bakıldığında üç grup arasında bir fark yoktur. ( $p>0.05$ ).

### 3.2 Çalışma Yöntemi

Akım Sitometri, florokrom ile işaretlenmiş antikorların hücre yüzeyindeki veya hücre içindeki özgül antijenlere bağlanması sonucu oluşan floresan sinyallerin, akışkan sistem içerisinde lazer ışığı ile uyarılarak tespit edilmesine dayanan çok parametrelili bir analiz yöntemidir.

Akım sitometri analizinde hasta kanından elde edilen örnek, uygun polipropilen veya polistiren tüplere belirli miktarda alınır. Hedef antijenlere özgül florokrom ile işaretli antikorlar bu tüplere eklenir ve belirli süre inkübasyona bırakılır. Hücre yüzey antijenlerinin boyanmasında antikorlar doğrudan hücre yüzeyine bağlanırken, hücre içi antijenlerin incelenmesi için hücreler boyama öncesinde fiks ve permeabilize edilir. İnkübasyon ve yıkama adımlarının ardından tüplerde hazırlanan örnekler akım sitometri cihazına yüklenir. Lazer uyarımıyla elde edilen floresan sinyaller analiz edilir.

Bu çalışmada Flow Sitometri yöntemi kullanılarak aşağıdaki hücre ve integrinlerin yüzdesi belirlendi:

- Total lenfosit yüzdesi
- Total lenfosit içerisinde  $CD4^+$  T lenfosit (Th) yüzdesi
- Th lenfositleri içerisinde alt grup hücreleri olan Treg, Th1, Th2, Th17, Th17.1 hücrelerinin yüzdesi
- Th1, Th2, Th17, Th17.1 hücrelerinin yüzeyinde bulunan  $\alpha 4$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\beta 3$  integrin yüzdeleri belirlendi.

Hastalardan çalışma için 5 ml periferik venöz kan ilk olarak EDTA'lı tüpe alındı. Hücre kaybı olmaması için alınan örnekler 24 saat içerisinde çalışıldı.

Bu çalışmada her gönüllü için 3 adet polipropilen tüp kullanıldı.

- 1.tüp: Treg hücre yüzdesini belirlemek amacıyla hücre içi boyama yaptığımız için bu tüpte sadece Treg hücre yüzdesini ölçüldü.

- 2.tüp: Total lenfosit yüzdesi, Th lenfosit yüzdesi, Th1, Th2, Th17, Th17.1 hücre yüzdeleri ve bu hücrelerin yüzeyindeki  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$  ve  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$  integrin yüzdelerini hücre yüzey boyaması yaparak ölçüldü.

- 3.tüp: Total lenfosit yüzdesi, Th lenfosit yüzdesi, Th1, Th2, Th17, Th17.1 hücre yüzdeleri ve bu hücrelerin yüzeyindeki  $\alpha\text{4}$  ve  $\beta\text{3}$  integrin yüzdelerini hücre yüzey boyaması yaparak ölçüldü.

**Tablo 3.2:** Çalışma için gerekli cihaz ve sarf malzemeler.

|                                     |                                                                |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Propilen Tüp                        | Labcon, Petaluma, California, USA                              |
| Vortex Cihazı                       | Velp Scientifica, Usmate Velate, İtalya                        |
| NF 800R Soğutmalı Santrifüj Cihazı  | Nuve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş, Ankara, Türkiye |
| Pastör Pipet                        | True Line, Çin                                                 |
| Navios EX Flow Sitometri Analizörü  | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Kaluza 2.1 Analiz Yazılımı          | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Fiksatif Reaktifi                   | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Permeabilizasyon reaktifi           | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Final Stok Tampon Solüsyonu         | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Distile Su                          | Povilon, Ankara, Türkiye                                       |
| CD3-PC5.5                           | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD4-EDC                             | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD25-PE                             | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Anti-FoxP3-AF647                    | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD183-AF-488 konjuge antikoru       | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD196-PC7 konjuge antikoru          | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD11a-PE konjuge antikoru           | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD11b-APC konjuge antikoru          | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD49d-APC konjuge antikoru          | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| CD6-PE konjuge antikoru             | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Phosphate Buffered Saline Solüsyonu | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |
| Optylise C Lizis Solüsyonu          | Beckman Coulter Company, Marsilya, Fransa                      |

### 3.2.1 Treg Hücre Analizi

1. Boş bir propilen tüpe 5  $\mu\text{L}$  fiksatif reaktifinden koyuldu. Hastadan aldığımız venöz kandan 50  $\mu\text{L}$  üzerine eklendi. Fiksatif reaktifi ile homojenize olması için 5-6 sn kadar vortex cihazında karıştırıldı. 15 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.

2. Başka bir boş propilen tüpe CD3-PC5.5, CD4-EDC, CD25-PE antikorlarından 5 µL, Anti-FoxP3-AF647 antikorundan 10 µL koyuldu. Üzerine permeabilizasyon tamponundan 300 µL eklendi. Vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn kadar karıştırıldı.

3. İnkübasyon bitince 2. kısımda oluşturulan tüpteki çözelti birinci tüpün üzerine eklendi. Vortex cihazında 5-6 sn kadar karıştırılıp homojenize edildi. Karanlıkta 1 saat inkübe edildi.

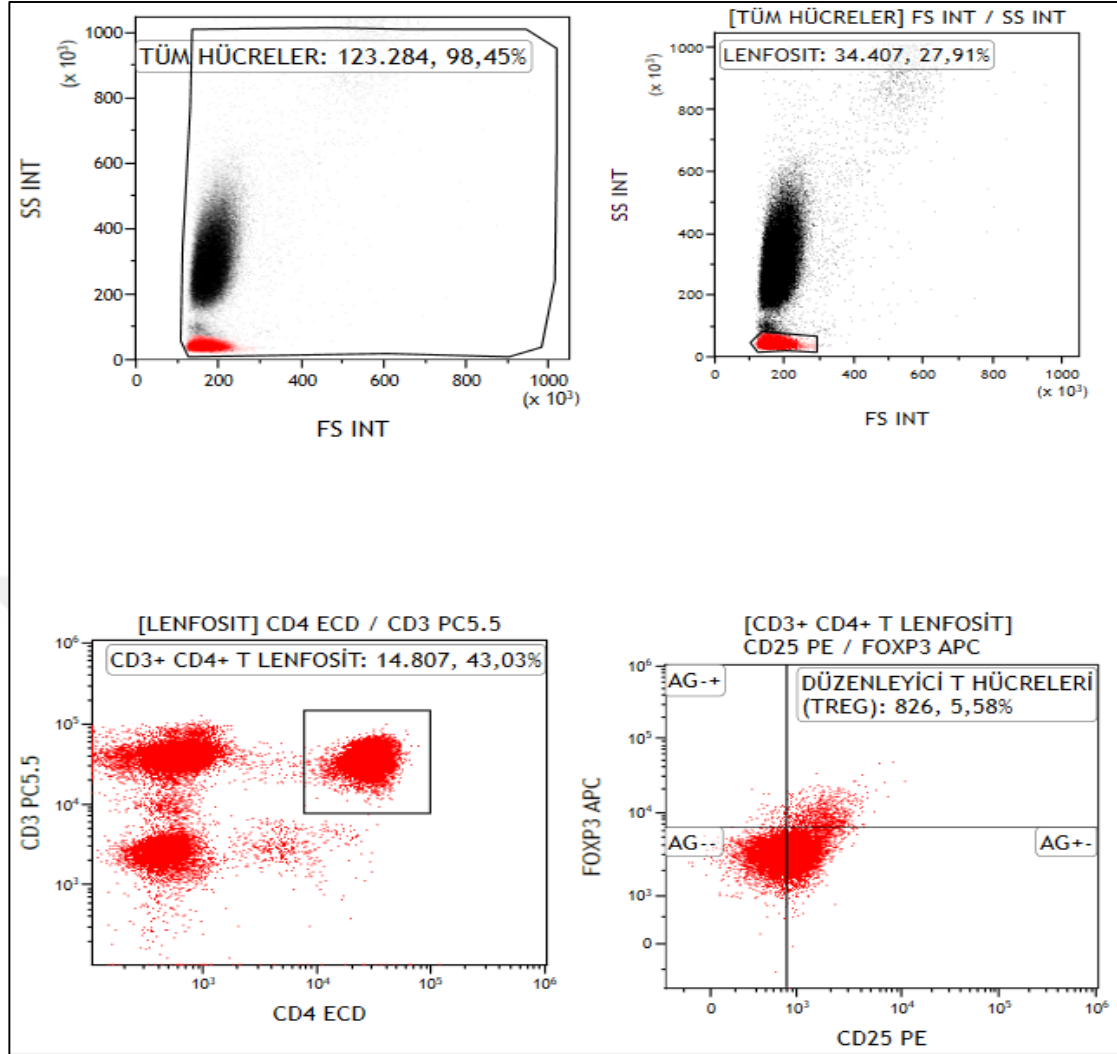
4. Yine başka bir boş propilen tüpe konsantre final stok tampon solüsyonundan 360 µL koyuldu. Üzerine distile su 3240 µL eklendi. Böylece tampon çözeltisi 1:10 oranında seyreltildi.

5. İnkübasyon bittikten sonra dördüncü kısımda oluşturulan seyreltilmiş tampon çözeltisinden 1500 µL üçüncü kısımda oluşturulan tüpün üzerine eklendi. Vortex cihazında 5-6 sn kadar karıştırılıp homojenize edildi. Santrifüj cihazında 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım pastör pipet yardımıyla alınıp atıldı. Aynı işlem ikinci kez tekrarlanarak iki defa yıkama yapılmış oldu. Tüpte geri kalan çökelti kısmının üzerine seyreltilmiş tampon çözeltisinden 500 µL eklendi ve vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn karıştırıldı.

6. Tüp daha sonra Navios EX Flow Sitometri analizörü kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi

7. Analiz için Kaluza 2.1 yazılımı kullanıldı.

8. Öncelikle FSC–SSC dot plot üzerinde hücresel artefaktlar ve debris dışarıda bırakılarak canlı hücre popülasyonu kaplandı. Bu popülasyon içerisinde lenfositler seçildi. Lenfosit kapısından elde edilen hücreler üzerinde CD3 ve CD4 çift pozitif ekspresyon gösteren hücreler kapılanarak Th lenfosit yüzdesi belirlendi. Son aşamada Th lenfositler arasında FOXP3 ve CD25 çift pozitif ekspresyon gösteren hücreler Treg alt grubu olarak belirlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Treg hücrelerinin düzeyinin belirlenmesi.

### 3.2.2 Th1, Th2, Th17, Th17.1 Hücreleri ve $\alpha$ M $\beta$ 2, $\alpha$ L $\beta$ 2 İntegrinlerin Belirlenmesi

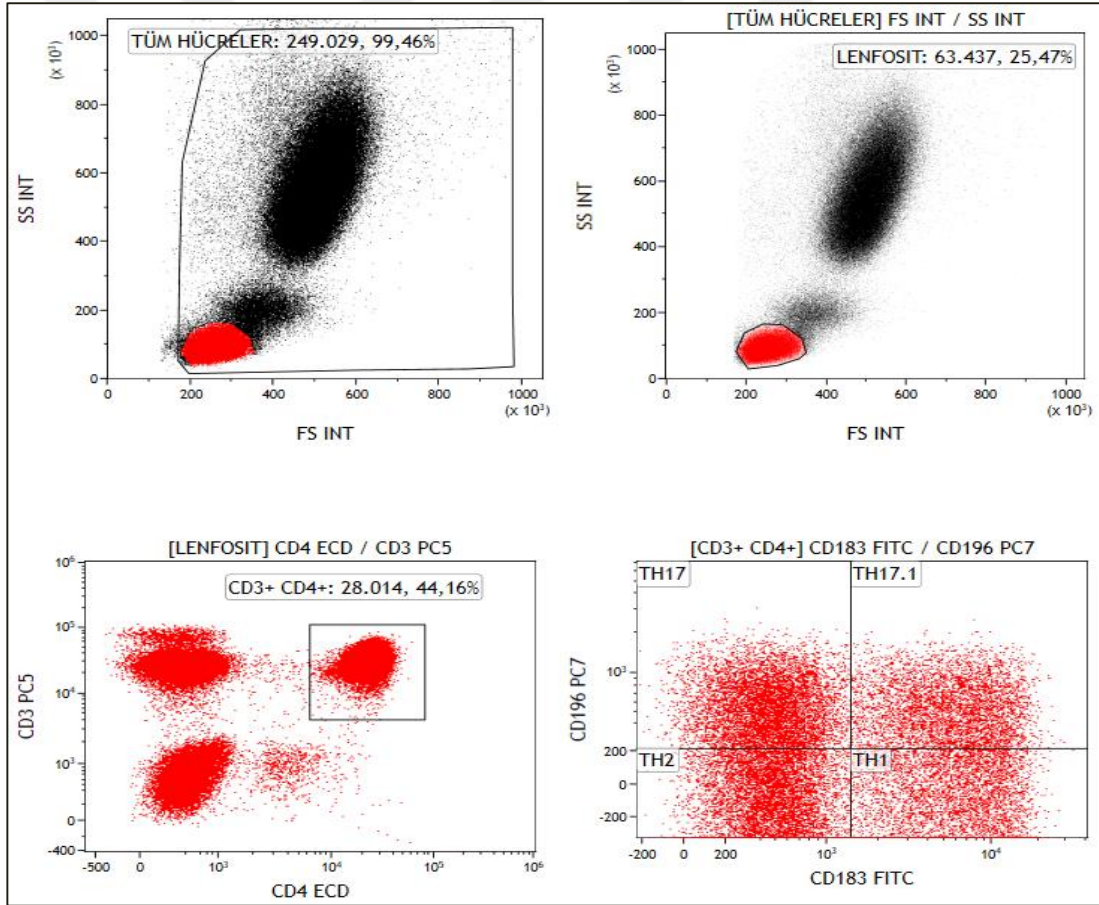
1. Boş bir propilen tüpe CD3-PC5.5, CD4-EDC, CD183-AF-488, CD196-PC7, CD11a-PE, CD11b-APC antikorlarından 5  $\mu$ L pipetlendi. Üzerine hastadan aldığımız venöz kandan 100  $\mu$ L eklendi. Vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn karıştırıldı. 15 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.

2. İnkübasyon bittikten sonra tüpe 500  $\mu$ L Optylse C Lysing Solüsyonundan eklendi. Vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn karıştırıldı. 10 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Böylece eritrositlerin parçalanması sağlanarak özgül floresan sinyal girişimi azaltıldı

3. İnkübasyon bittikten sonra tüpün üzerine Phosphate Buffered Saline solüsyonundan 500  $\mu$ L eklendi. Vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn karıştırıldı. 5 dk inkübasyona bırakıldı. Tüp daha sonra Navios EX Flow Sitometri analizörü kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi

4. Analiz için Kaluza 2.1 yazılımı kullanıldı.

5. Öncelikle FSC–SSC dot plot üzerinde hücresel artefaktlar ve debris dışarıda bırakılarak canlı hücre popülasyonu kaplandı. Bu popülasyon içerisinde lenfositler seçildi. Lenfosit kapısından elde edilen hücreler üzerinde CD3 ve CD4 ekspresyonu pozitif olan hücreler kapılanarak Th lenfositleri yüzde veri olarak belirlendi (Şekil 3.2).



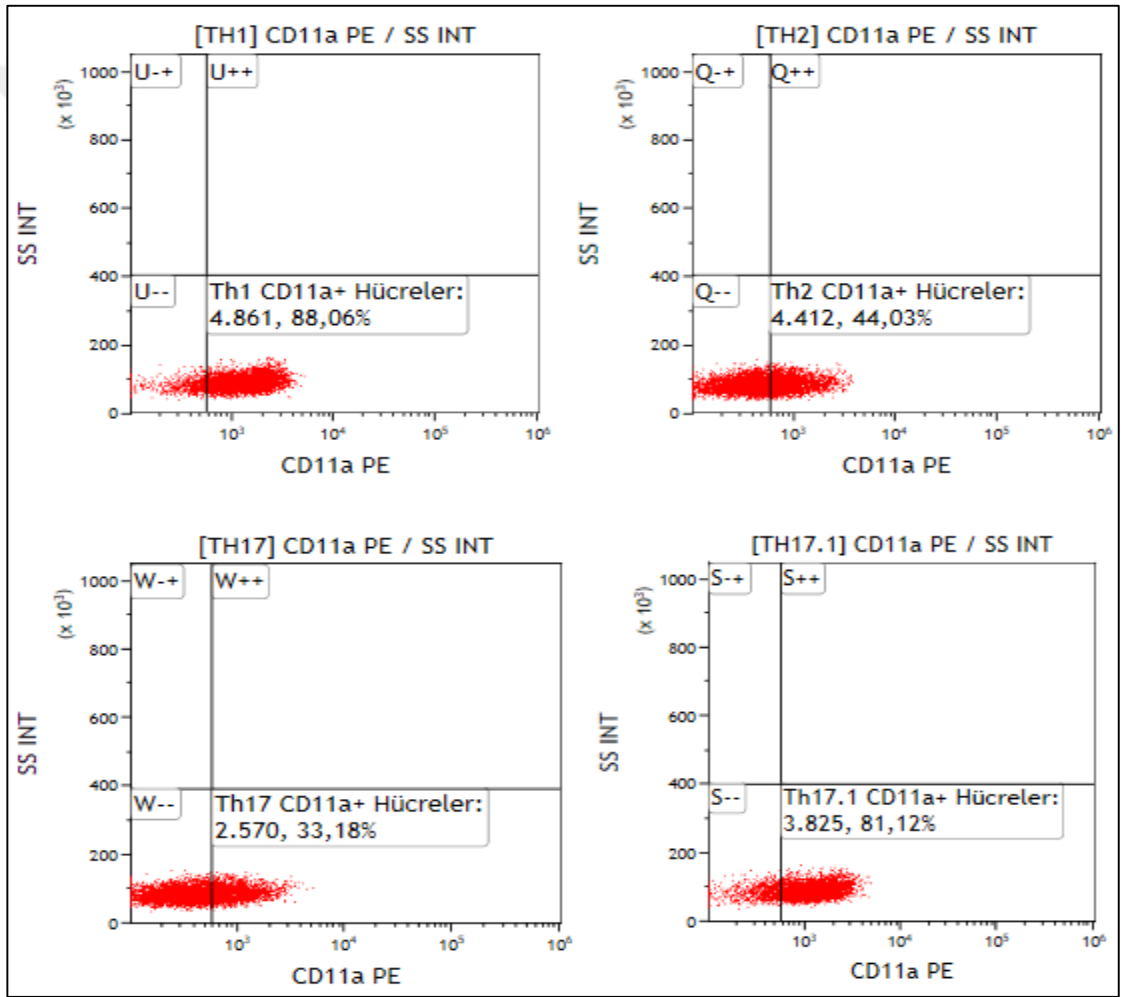
Şekil 3.2: Th1, Th2, Th17, Th17.1 lenfosit popülasyonlarının düzeyinin belirlenmesi.

6. Th lenfositler üzerine kapı açılarak CD183 ve CD196 ekspresyonlarına bakılarak Th alt grupları belirlendi. Buna göre:

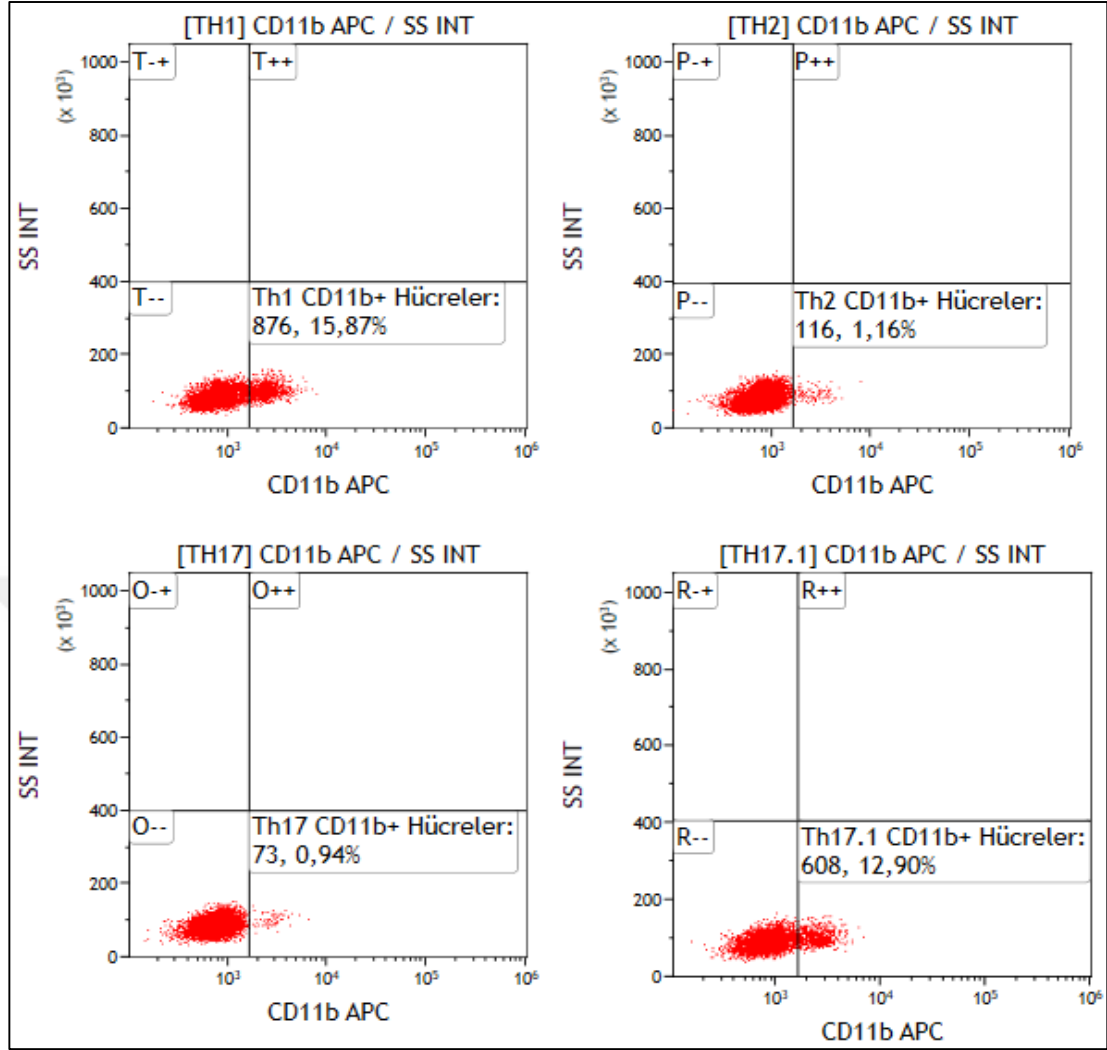
- CD183<sup>+</sup> - CD196<sup>-</sup> hücreler: Th1 lenfositler

- CD183<sup>-</sup> - CD196<sup>-</sup> hücreler: Th2 lenfositleri
- CD183<sup>-</sup> - CD196<sup>+</sup> hücreler: Th17 lenfositleri
- CD183<sup>+</sup> - CD196<sup>+</sup> hücreler: Th17.1 lenfositleri yüzde veri olarak tespit edildi (Şekil3.2).

7. Her bir Th lenfosit alt grubunda CD11a ekspresyon yüzdesine bakılarak  $\alpha$ L $\beta$ 2 ve CD11b ekspresyon yüzdesine bakılarak  $\alpha$ M $\beta$ 2 ifade gücü yüzde olarak belirlendi (Şekil 3.3), (Şekil 3.4).



Şekil 3.3: Th lenfosit alt gruplarında CD11a eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi.



Şekil 3.4: Th lenfosit alt gruplarında CD11b eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi.

### 3.2.3 Th1, Th2, Th17, Th17.1 Hücreleri ve $\alpha 4$ , $\beta 3$ İntegrinlerin Belirlenmesi

1. Boş bir propilen tüpe CD3-PC5.5, CD4-EDC, CD183-AF-488, CD196-PC7, CD61-PE, CD49d-APC antikorlarından 5  $\mu$ L pipetlendi. Üzerine hastadan aldığımız venöz kandan 100  $\mu$ L eklendi. Vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn karıştırıldı. 15 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.

2. İnkübasyon bittikten sonra tüpe 500  $\mu$ L Optylse C Lysing Solüsyonundan eklendi. Vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn karıştırıldı. 10 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Böylece eritrositlerin parçalanması sağlanarak özgül floresan sinyal girişimi azaltıldı

3. İnkübasyon bittikten sonra tüpün üzerine Phosphate Buffered Saline solüsyonundan 500 µL eklendi. Vortex cihazında homojenizasyon için 5-6 sn karıştırıldı. 5 dk inkübasyona bırakıldı. Tüp daha sonra Navios EX Flow Sitometri analizörü kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi

4. Analiz için Kaluza 2.1 yazılımı kullanıldı.

5. Öncelikle FSC–SSC dot plot üzerinde hücresel artefaktlar ve debris dışarıda bırakılarak canlı hücre popülasyonu kaplandı. Bu popülasyon içerisinde lenfositler seçildi. Lenfosit kapısından elde edilen hücreler üzerinde CD3 ve CD4 ekspresyonu pozitif olan hücreler kapılanarak Th lenfositleri yüzde veri olarak belirlendi (Şekil 3.2).

6. Th lenfositleri üzerine kapı açılarak CD183 ve CD196 ekspresyonlarına Th alt grup popülasyonları belirlendi. Buna göre:

- CD183<sup>+</sup> - CD196<sup>-</sup> hücreler: Th1 lenfositleri

- CD183<sup>-</sup> - CD196<sup>-</sup> hücreler: Th2 lenfositleri

- CD183<sup>-</sup> - CD196<sup>+</sup> hücreler: Th17 lenfositleri

-CD183<sup>+</sup> - CD196<sup>+</sup> hücreler: Th17.1 lenfositleri yüzde veri olarak tespit edildi (Şekil 3.2).

7. Th hücrelerinde CD49d ekspresyon yüzdesine bakılarak α4 integrin ve CD61 ekspresyon yüzdesine bakılarak β3 integrin ekspresyonu yüzde olarak belirlendi (Şekil 3.5, Şekil 3.6).

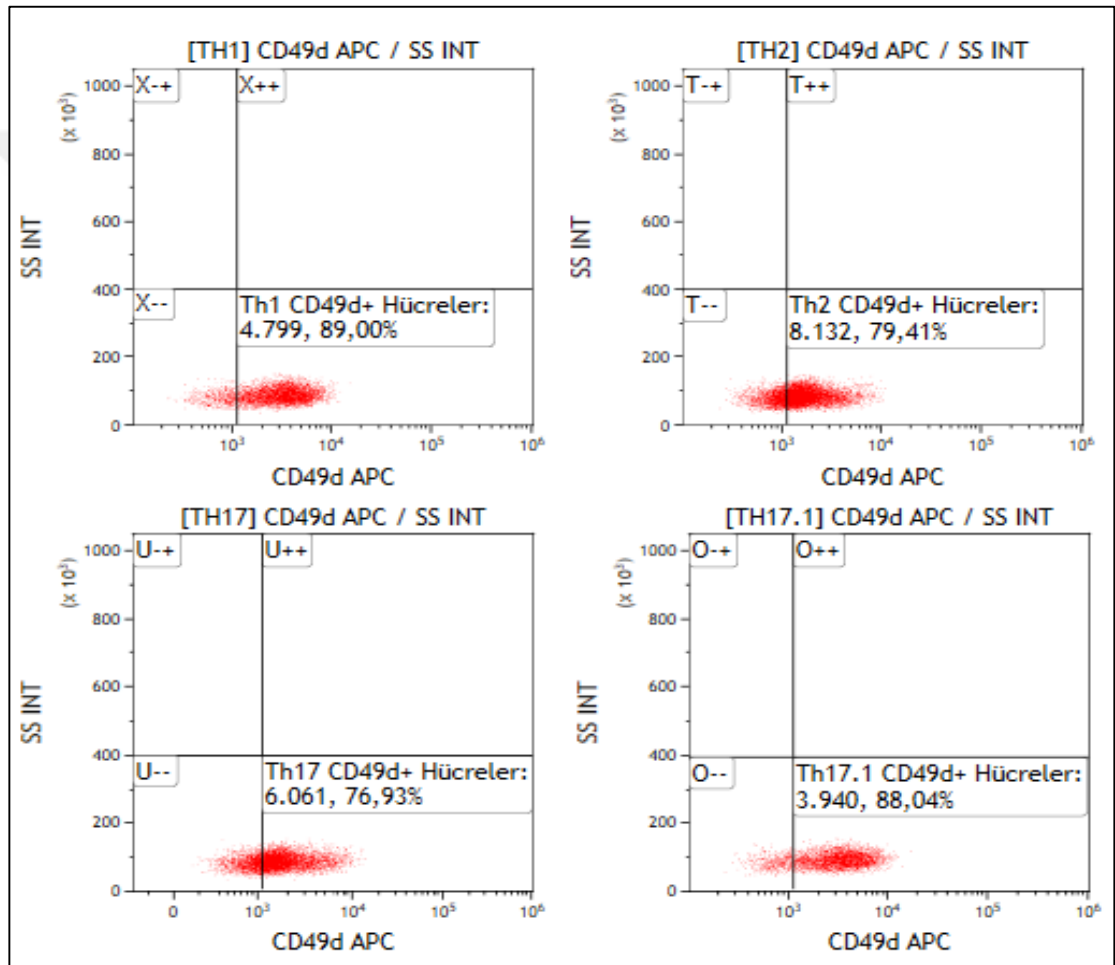
### 3.3 İstatistiksel Analiz

Veriler tanımlayıcı istatistikler (Aritmetik ortalama, standart sapma) ile değerlendirilecektir. Gruplar arası ortalama karşılaştırırken öncelikle normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirilecektir.

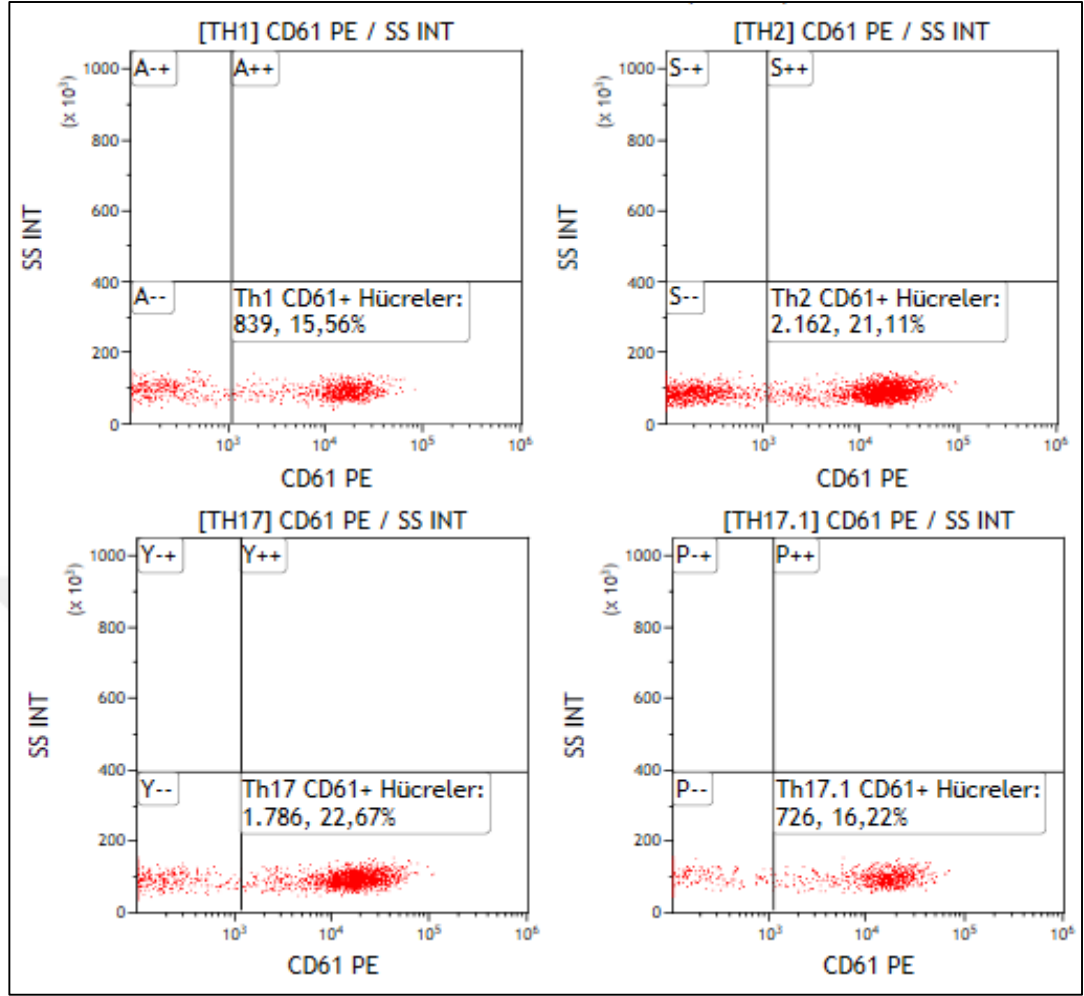
Üç bağımsız grubun ortalamasını karşılaştırırken parametrik koşulların sağlandığı durumlarda One Way ANOVA, parametrik koşulların sağlanmadığı durumlarda Kruskal Wallis testi kullanılacaktır. Değişkenler arasındaki ilişkiyi

belirlemek için ANOVA testinden sonra Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılacaktır. Homojenitenin sağlanmadığı koşullarda Welch ANOVA ve sonrasında Games-Howell testi uygulanacaktır. Kruskal Wallis testinden sonra Mann Withney U testi kullanılıp Bonferroni düzeltmesi yapılacaktır. Kategorik verilerin gruplar arası yüzde dağılımlarını karşılaştırırken Ki Kare testi kullanılacaktır.

İstatistiksel analizler SPSS programı ile yapılacaktır ve  $p < 0.05$  bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı şekilde sunulacaktır.



Şekil 3.5: Th lenfosit alt gruplarında CD49d eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi.



Şekil 3.6: Th lenfosit alt gruplarında CD61 eksprese eden hücrelerin düzeyinin belirlenmesi.

## 4.BULGULAR

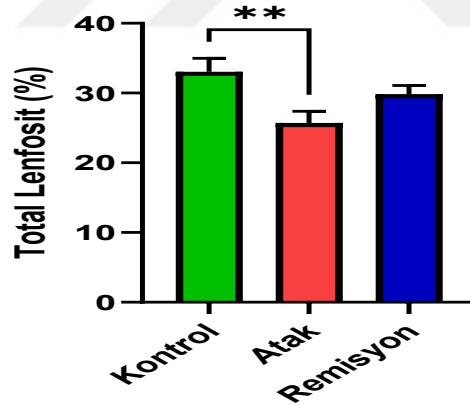
### 4.1 Total Lenfosit Düzeyleri

Kontrol, atak ve remisyon grubunda ilk olarak total lenfosit yüzdesi analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** Total lenfosit yüzdesinin analiz sonuçları.

| Parametre          | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Total Lenfosit (%) | 33,05 $\pm$ 8,74               | 25,73 $\pm$ 7,35            | 29,84 $\pm$ 5,63                |

Kontrol, atak ve remisyon gruplarında ölçülen total lenfosit yüzdesi değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Analiz sonuçlarına göre atak grubunda ortalama lenfosit yüzdesi, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,007$ ). Remisyon grubunda ise ortalama lenfosit yüzdesi ise her iki grup ortalaması arasında yer almakla birlikte, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermemiştir (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1:** Gruplar arası total lenfosit yüzdesi karşılaştırılması (\*\*:  $p=0,007$ ).

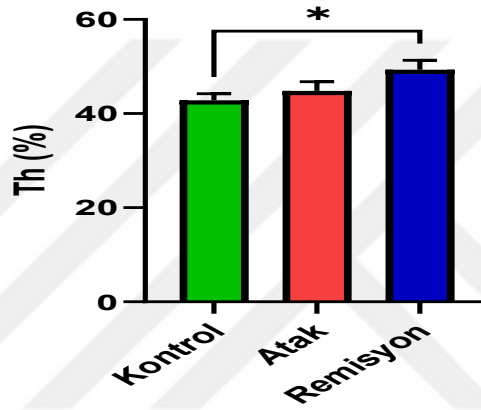
### 4.2 Th Hücre Düzeyleri

Kontrol, atak ve remisyon grubunda lenfosit popülasyonu içerisinde  $CD3^+$  ve  $CD4^+$  çift pozitif hücreler kapılanarak Th hücre yüzdesi belirlendi. Üç grupta karşılaştırma yapılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2:** Lenfosit popülasyonunda Th hücrelerin yüzdesi.

| Parametre | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Th (%)    | 42,85 $\pm$ 6,22               | 44,82 $\pm$ 8,63            | 49,30 $\pm$ 9,09                |

Kontrol, atak ve remisyon gruplarında Th hücre yüzdesi karşılaştırıldığında, remisyon grubunun ortalama Th hücre yüzdesi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p=0.038$ ). Atak grubunun ortalama yüzdesi ise her iki grup arasında yer almakla birlikte, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermemiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2:** Grupların lenfosit popülasyonunda Th hücre yüzdelерinin karşılaştırma grafiğı (\*: $p=0.038$ ).

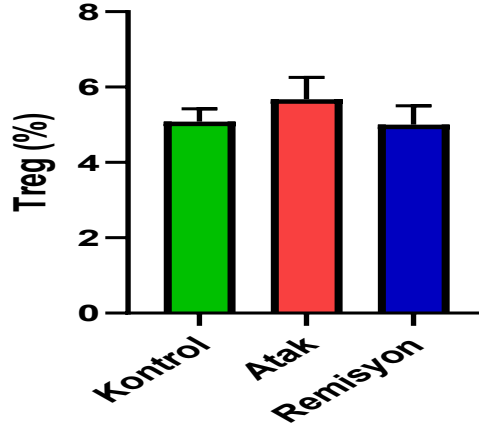
### 4.3 Treg Hücre Düzeyleri

Üç grupta Treg hücrelerini belirlemek için Th hücrelerinin içinde  $CD25^+$  ve  $FOXP3^+$  çift pozitif olan hücreler kaplandı. Hücre yüzdeleri belirlenerek sonuçlar elde edildi. (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3:** Th hücre popülasyonunda Treg hücrelerinin yüzdesi.

| Parametre | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Treg (%)  | 5,08 $\pm$ 1,52                | 5,68 $\pm$ 2,58             | 5,00 $\pm$ 2,26                 |

Kontrol, atak ve remisyon gruplarında Treg hücre yüzdesi karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Atak grubunda ortalama Treg hücre yüzdesi diğer gruplara kıyasla daha yüksek olmasına rağmen, bu farklılık anlamlı düzeyde değildi. Kontrol ve remisyon grupları benzer ortalama değerlere sahipti (Şekil 4.3)



Şekil 4.3: Grupların Th hücre popülasyonunda Treg yüzdelерinin karşılaştırma grafiğı.

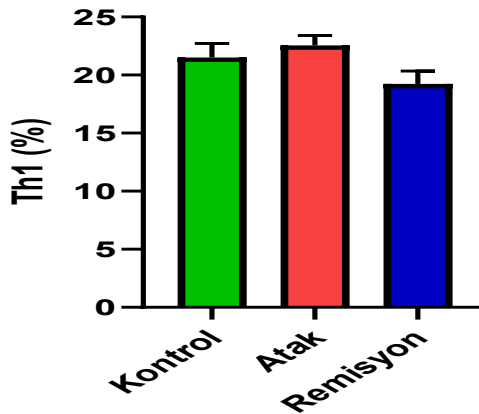
#### 4.4 Th1 Hücre Düzeyleri

Th hücrelerinin içinde CD183<sup>+</sup> ve CD196<sup>-</sup> ifade eden hücreler kapılanarak Th1 hücre yüzdesi belirlendi. Üç grupta karşılaştırma yapılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Th hücre popülasyonunda Th1 hücrelerinin yüzdesi.

| Parametre | Kontrol<br>(Ortalama ± SS) | Atak<br>(Ortalama ± SS) | Remisyon<br>(Ortalama ± SS) |
|-----------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Th1 (%)   | 21,51 ± 5,39               | 22,55 ± 3,83            | 19,23 ± 5,01                |

Th1 hücre yüzdesi; kontrol, atak ve remisyon gruplarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bununla birlikte, atak grubunda ortalama Th1 hücre yüzdesi diğer gruplara göre daha yüksek, remisyon grubunda ise en düşük düzeyde tespit edildi. Kontrol grubunun ortalaması ise diğer iki grup ortalaması arasındaydı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Grupların Th hücre popülasyonunda Th1 yüzdelерinin karşılaştırma grafiğı.

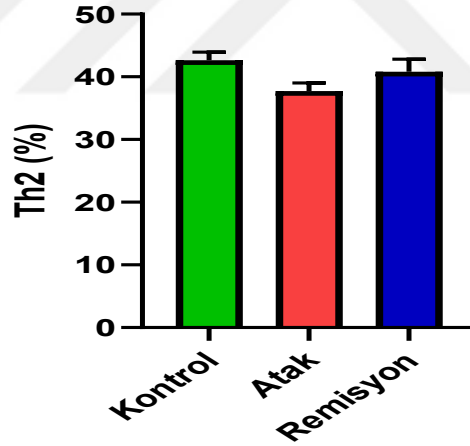
#### 4.5 Th2 Hücre Düzeyleri

Th hücrelerinin içinde CD183<sup>-</sup> ve CD196<sup>-</sup> ifade eden hücreler kapılanarak Th2 hücre yüzdesi belirlendi. Üç grupta karşılaştırma yapılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5:** Th hücre popülasyonunda Th2 hücrelerinin yüzdesi.

| Parametre | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Th2 (%)   | 42,65 $\pm$ 5,81               | 37,73 $\pm$ 5,89            | 40,80 $\pm$ 8,94                |

Th2 hücre yüzdesi kontrol, atak ve remisyon gruplarında karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak atak grubunun ortalama Th2 hücre yüzdesi, kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Atak ve kontrol grupları arasındaki fark, Bonferroni düzeltmesi uygulanmadan önce anlamlı iken ( $p=0,021$ ), düzeltme sonrası anlamlılığını kaybetti ( $p=0,063$ ). Remisyon grubunun ortalaması ise her iki grup arasındaydı (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5:** Grupların Th hücre popülasyonunda Th2 yüzdelерinin karşılaştırma grafiğı.

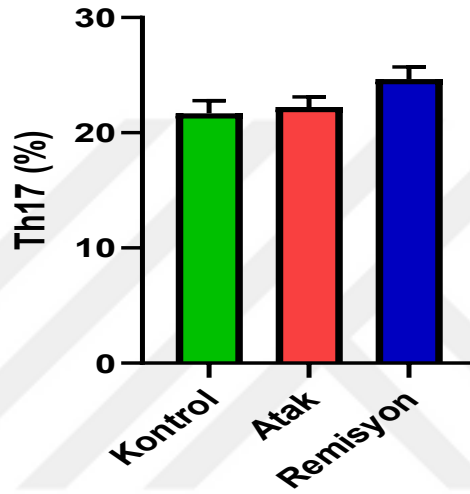
#### 4.6 Th17 Hücre Düzeyleri

Th hücrelerinin içinde CD183<sup>-</sup> ve CD196<sup>+</sup> ifade eden hücreler kapılanarak Th17 hücre yüzdesi belirlendi. Üç grupta karşılaştırma yapılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6:** Th hücre popülasyonunda Th17 hücrelerinin yüzdesi.

| Parametre | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Th17 (%)  | 21,68 $\pm$ 4,92               | 22,25 $\pm$ 3,82            | 24,66 $\pm$ 4,75                |

Th17 hücre yüzdesi; kontrol, atak ve remisyon grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Grupların ortalama Th17 düzeyleri remisyon grubunda yüksek iken, kontrol ve atak grubunda daha düşük ve birbirine yakın düzeydeydi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6:** Grupların Th hücre popülasyonunda Th17 yüzdelерinin karşılaştırma grafiğı.

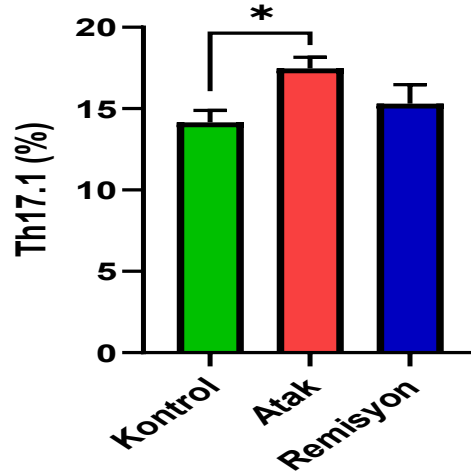
#### 4.7 Th17.1 Hücre Düzeyleri

Th hücrelerinin içinde CD183+ ve CD196+ ifade eden hücreler kapılanarak Th17.1 hücre yüzdesi elde edildi. Üç grupta karşılaştırma yapılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7:** Th hücre popülasyonunda Th17.1 hücrelerinin yüzdesi.

| Parametre  | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Th17.1 (%) | 14,16 $\pm$ 3,24               | 17,47 $\pm$ 3,06            | 15,30 $\pm$ 5,25                |

Th17.1 hücre yüzdesi kontrol, atak ve remisyon gruplarında karşılaştırıldığında, atak grubunun ortalama Th17.1 düzeyinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ( $p=0,042$ ). Remisyon grubunun ortalama yüzdesi iki grubun arasındaydı (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7:** Grupların Th hücre popülasyonunda Th17.1 yüzdelерinin karşılaştırma grafiğı (\*: p=0.042).

Üç grupta Th hücrelerinin periferik kandaki düzeyleri toplu olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8:** Th hücre popülasyonu ve içerisindeki Treg, Th1, Th2, Th17, Th17.1 hücrelerinin yüzdesi

| Parametre                | Kontrol<br>(Ortalama ± SS) | Atak<br>(Ortalama ± SS)   | Remisyon<br>(Ortalama ± SS) |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Tüm Lenfositlerde Th (%) | 42,85 ± 6,22               | 44,82 ± 8,63              | 49,30 ± 9,09 <sup>a</sup>   |
| Treg (%)                 | 5,08 ± 1,52                | 5,68 ± 2,58               | 5,00 ± 2,26                 |
| Th1 (%)                  | 21,51 ± 5,39               | 22,55 ± 3,83              | 19,23 ± 5,01                |
| Th2 (%)                  | 42,65 ± 5,81               | 37,73 ± 5,89              | 40,80 ± 8,94                |
| Th17 (%)                 | 21,68 ± 4,92               | 22,25 ± 3,82              | 24,66 ± 4,75                |
| Th17.1 (%)               | 14,16 ± 3,24               | 17,47 ± 3,06 <sup>a</sup> | 15,30 ± 5,25                |

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark vardır (p<0.05).

#### 4.8 TH2/TH17.1 Oranı

**Tablo 4.9:** Th2/Th17.1 oranı sonuçları.

| Parametre  | Kontrol<br>(Ortalama ± SS) | Atak<br>(Ortalama ± SS)  | Remisyon<br>(Ortalama ± SS) |
|------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Th2/Th17.1 | 3,41 ± 1,02                | 2,16 ± 0,53 <sup>a</sup> | 3,03 ± 1,51                 |

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark vardır (p=0.003).

Üç grupta Th2/Th17.1 oranı karşılaştırıldığında atak grubu kontrol grubuna göre istatistiksel anlam ifade edecek şekilde daha düşük bir orana sahip olduğu belirlendi (p=0.003). Remisyon grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı.

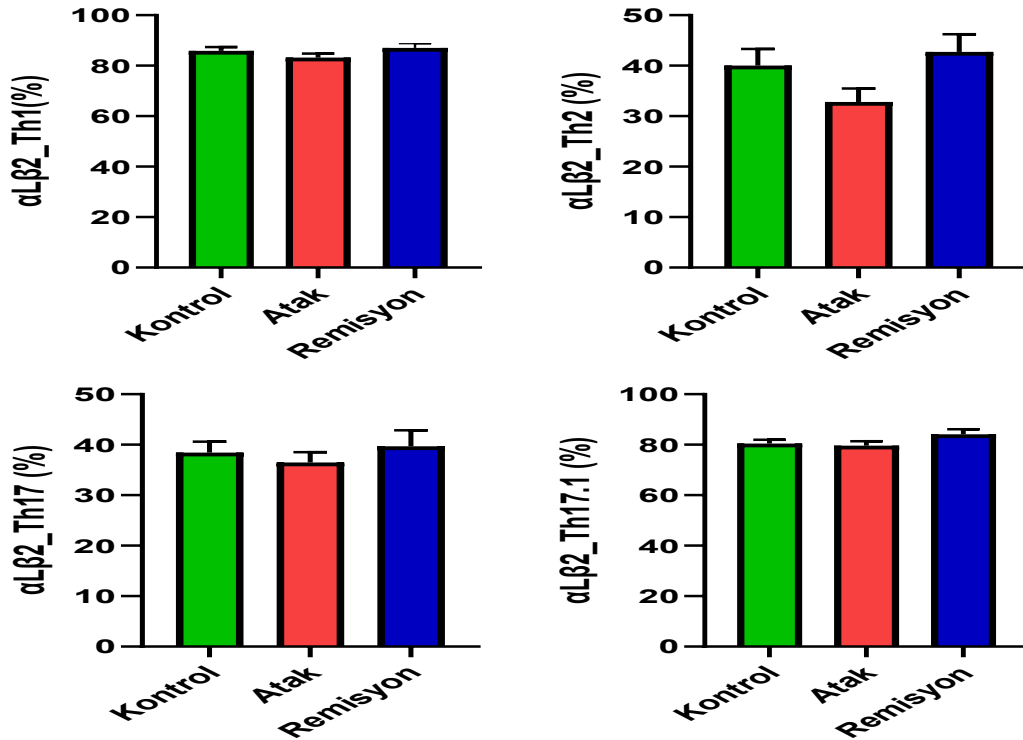
#### 4.9 $\alpha$ L $\beta$ 2 (LFA-1) İntegrin Düzeyleri

$\alpha$ L $\beta$ 2 integrin düzeyine, tüm gruplarda ve Th1, Th2, Th17 ve Th17.1 hücrelerinin yüzeyindeki ekspresyon seviyelerine bakılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.10).

**Tablo 4.10:** Gruplarda Th hücrelerinde  $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin ekspresyon yüzdesi.

| Parametre                       | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| $\alpha$ L $\beta$ 2_Th (%)     | 58,00 $\pm$ 13,62              | 61,39 $\pm$ 20,62           | 59,90 $\pm$ 19,94               |
| $\alpha$ L $\beta$ 2_Th1 (%)    | 85,86 $\pm$ 6,60               | 83,17 $\pm$ 7,08            | 87,00 $\pm$ 7,67                |
| $\alpha$ L $\beta$ 2_Th2 (%)    | 40,02 $\pm$ 14,79              | 32,79 $\pm$ 11,96           | 42,71 $\pm$ 15,78               |
| $\alpha$ L $\beta$ 2_Th17 (%)   | 38,44 $\pm$ 9,65               | 36,48 $\pm$ 9,03            | 39,68 $\pm$ 14,22               |
| $\alpha$ L $\beta$ 2_Th17.1 (%) | 80,45 $\pm$ 6,88               | 79,60 $\pm$ 7,94            | 84,15 $\pm$ 8,93                |

$\alpha$ L $\beta$ 2 integrin ekspresyonu, Th1 ve Th17.1 hücrelerinde, Th2 ve Th17 hücrelerine göre üç grupta da daha yüksekti. Tüm Th hücre alt gruplarında  $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin ekspresyonu remisyon grubunda en yüksek, atak grubunda da en düşük olarak bulundu. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında istatistiksel bir anlamlı fark saptanmadı (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8:** Gruplar arası Th hücre alt gruplarında  $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin yüzdesinin karşılaştırılması

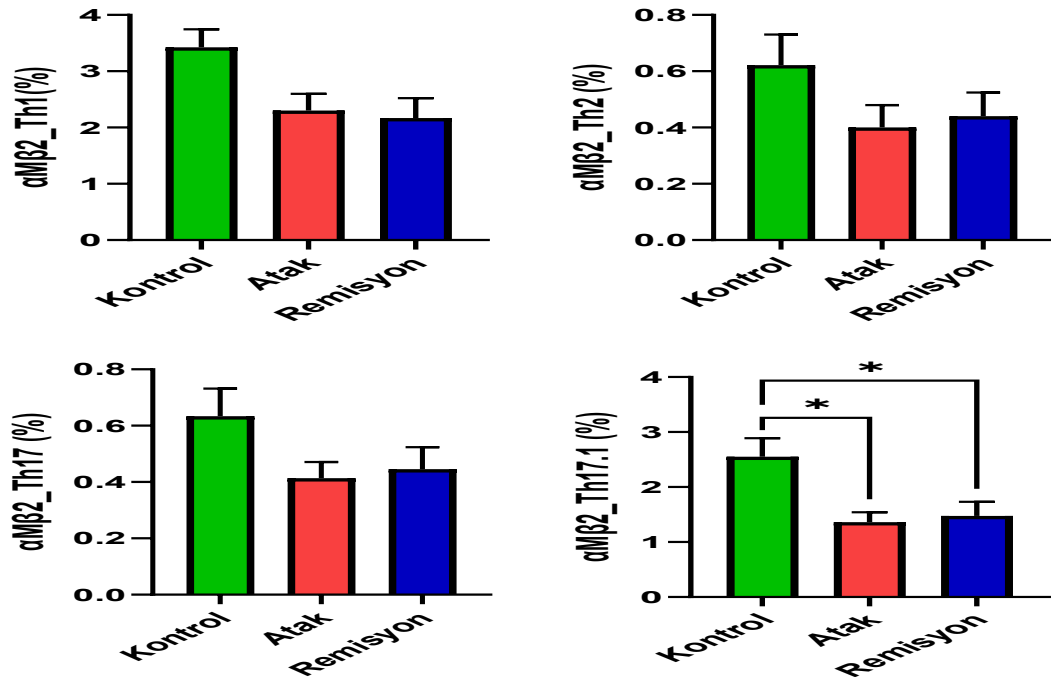
#### 4.10 $\alpha$ M $\beta$ 2 (MAC-1) İntegrin Düzeyleri

$\alpha$ M $\beta$ 2 integrin düzeyine, tüm gruplarda ve Th1, Th2, Th17 ve Th17.1 hücrelerinin yüzeyindeki ekspresyon seviyelerine bakılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.11).

**Tablo 4.11:** Gruplarda Th hücrelerinde  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin ekspresyon yüzdesi.

| Parametre                       | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| $\alpha$ M $\beta$ 2_Th (%)     | 2,16 $\pm$ 1,79                | 1,12 $\pm$ 0,93             | 1,25 $\pm$ 1,14                 |
| $\alpha$ M $\beta$ 2_Th1 (%)    | 3,42 $\pm$ 1,43                | 2,30 $\pm$ 1,32             | 2,17 $\pm$ 1,57                 |
| $\alpha$ M $\beta$ 2_Th2 (%)    | 0,62 $\pm$ 0,48                | 0,40 $\pm$ 0,35             | 0,44 $\pm$ 0,37                 |
| $\alpha$ M $\beta$ 2_Th17 (%)   | 0,63 $\pm$ 0,43                | 0,41 $\pm$ 0,25             | 0,44 $\pm$ 0,34                 |
| $\alpha$ M $\beta$ 2_Th17.1 (%) | 2,55 $\pm$ 1,50                | 1,36 $\pm$ 0,80             | 1,47 $\pm$ 1,15                 |

$\alpha$ M $\beta$ 2 integrin ekspresyonu, Th1 ve Th17.1 hücrelerinde, Th2 ve Th17 hücrelerine göre üç grupta da daha yüksekti. Th1 hücreleri hariç diğer Th hücre alt gruplarında  $\alpha$ M $\beta$ 2 ekspresyonu kontrol grubunda en yüksek, atak grubunda en düşük olarak bulundu. Th17.1 hücresine bakıldığında atak (p=0.012) ve remisyon (p=0.046) grubu kontrol grubuna göre anlamlı olacak derecede daha düşük  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin ekspresyonuna sahipti. Diğer Th hücre alt gruplarında, üç grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** Gruplar arası Th hücrelerinde  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin yüzdesinin karşılaştırılması (\*: p<0.05).

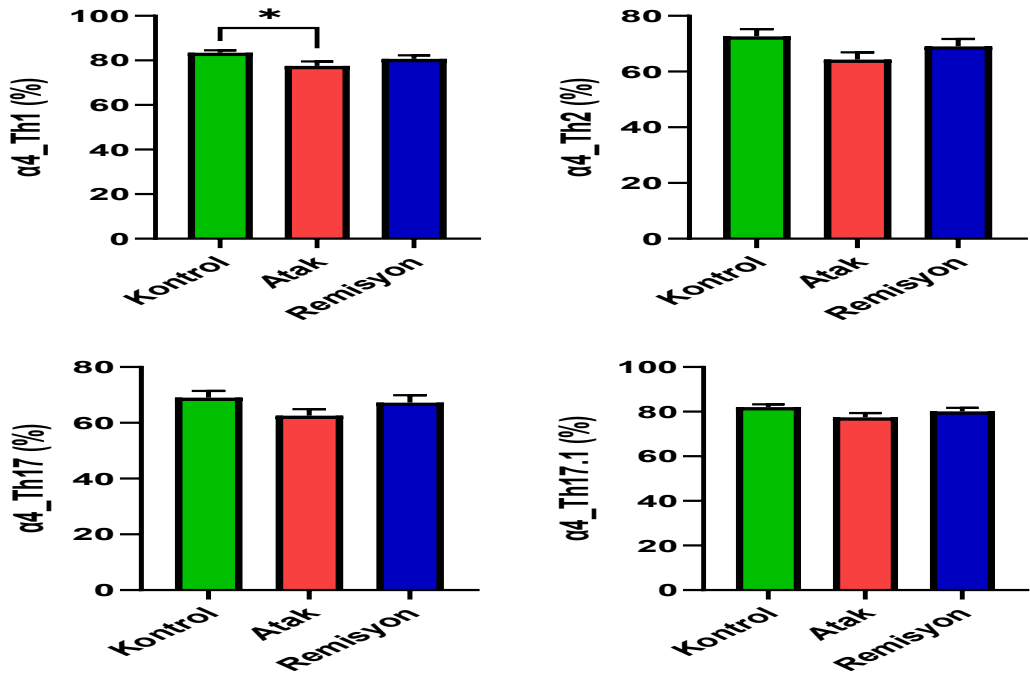
#### 4.11 $\alpha 4$ İntegrin Düzeyleri

$\alpha 4$  integrin düzeyine tüm gruplarda ve Th1, Th2, Th17 ve Th17.1 hücrelerinin yüzeyindeki ekspresyon seviyelerine bakılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.12).

**Tablo 4.12:** Gruplarda Th hücrelerinde  $\alpha 4$  integrin ekspresyonunun yüzdesi.

| Parametre              | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| $\alpha 4$ _Th (%)     | 75,23 $\pm$ 8,55               | 70,74 $\pm$ 11,09           | 72,88 $\pm$ 9,58                |
| $\alpha 4$ _Th1 (%)    | 83,48 $\pm$ 4,78               | 77,56 $\pm$ 8,68            | 80,73 $\pm$ 7,00                |
| $\alpha 4$ _Th2 (%)    | 72,65 $\pm$ 11,54              | 64,30 $\pm$ 11,60           | 69,02 $\pm$ 11,94               |
| $\alpha 4$ _Th17 (%)   | 69,04 $\pm$ 10,55              | 62,58 $\pm$ 10,44           | 67,20 $\pm$ 12,10               |
| $\alpha 4$ _Th17.1 (%) | 82,07 $\pm$ 5,57               | 77,46 $\pm$ 8,69            | 80,15 $\pm$ 6,96                |

$\alpha 4$  integrin ekspresyonu, Th1 ve Th17.1 hücrelerinde, Th2 ve Th17 hücrelerine göre üç grupta da daha yüksekti. Tüm Th hücre alt gruplarında  $\alpha 4$  integrin düzeyi, kontrol grubunda en yüksek, atak grubunda da en düşük olarak bulundu. Th1 hücresine bakıldığında atak grubu, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük  $\alpha 4$  integrin ekspresyonuna sahip olduğu tespit edildi ( $p=0.027$ ). Diğer Th hücre alt gruplarında, üç grup arasında anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10:** Gruplar arası Th hücrelerinde  $\alpha 4$  integrin yüzdesinin karşılaştırılması (\*:  $p=0.027$ ).

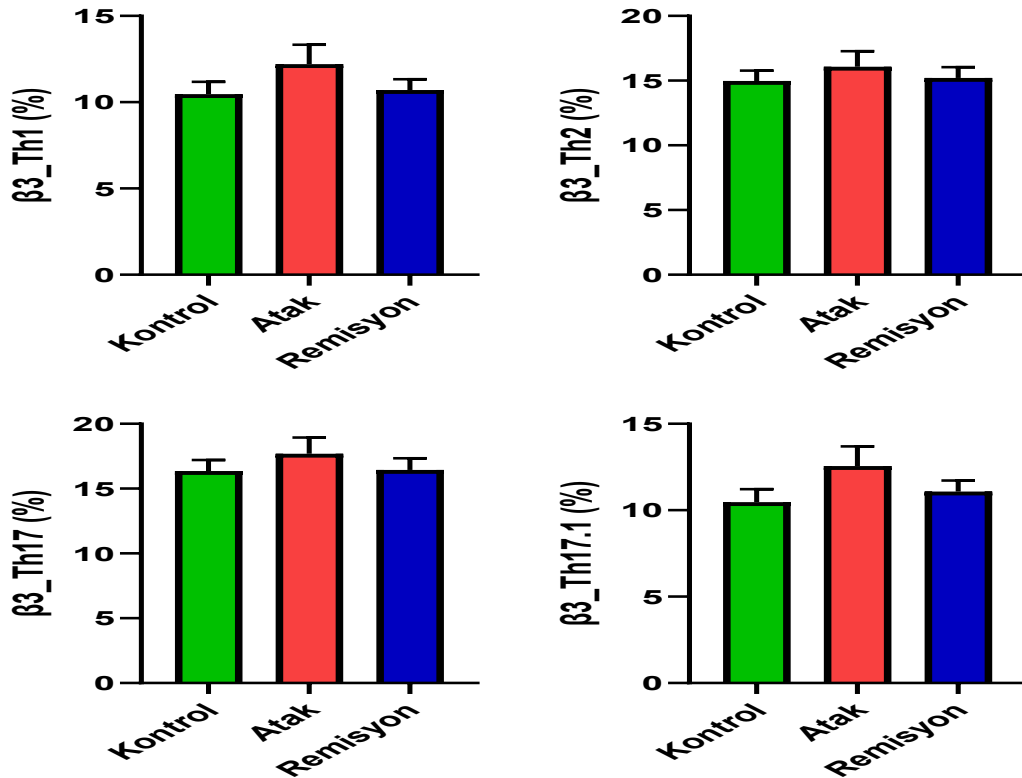
#### 4.12 $\beta 3$ İntegrin Düzeyleri

$\beta 3$  integrin düzeyine tüm gruplarda ve Th1, Th2, Th17 ve Th17.1 hücrelerinin yüzeyindeki ekspresyon seviyelerine bakılarak analiz sonuçları elde edildi (Tablo 4.13).

**Tablo 4.13:** Gruplarda Th hücrelerinde  $\beta 3$  integrin ekspresyonunun yüzdesi.

| Parametre              | Kontrol<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Atak<br>(Ortalama $\pm$ SS) | Remisyon<br>(Ortalama $\pm$ SS) |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| $\beta 3_{Th}$ (%)     | 13,38 $\pm$ 3,07               | 15,57 $\pm$ 5,53            | 14,02 $\pm$ 3,32                |
| $\beta 3_{Th1}$ (%)    | 10,46 $\pm$ 3,16               | 12,20 $\pm$ 4,99            | 10,71 $\pm$ 2,77                |
| $\beta 3_{Th2}$ (%)    | 14,97 $\pm$ 3,61               | 16,07 $\pm$ 5,35            | 15,21 $\pm$ 3,70                |
| $\beta 3_{Th17}$ (%)   | 16,36 $\pm$ 3,75               | 17,69 $\pm$ 5,57            | 16,44 $\pm$ 4,04                |
| $\beta 3_{Th17.1}$ (%) | 10,47 $\pm$ 3,34               | 12,55 $\pm$ 5,10            | 11,08 $\pm$ 2,87                |

$\beta 3$  integrin ekspresyonu, Th2 ve Th17 hücrelerinde, Th1 ve Th17.1 hücrelerine göre ekspresyon düzeyi üç grupta da daha yüksekti. Tüm Th hücre alt gruplarında  $\beta 3$  integrin düzeyi atak grubunda en yüksek, kontrol grubunda da en düşük olarak bulundu. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir istatistiksel fark saptanmadı (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11:** Gruplar arası Th hücrelerinde  $\beta 3$  integrin yüzdesinin karşılaştırılması.

## 5.TARTIŞMA

MS, çoğunlukla genç erişkinleri etkileyen, MSS'nin kronik, enflamatuvar bir hastalığıdır. Patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamış olup periferdeki otoreaktif bağışıklık hücrelerinin MSS'e geçmesi ve bu hücrelerden salgılanan enflamatuvar sitokinlerin demiyelinizasyona yol açmasıyla meydana geldiği düşünülmektedir (46).

Bu çalışmada, atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ve sağlıklı bireylerin periferik kanında patogenezi oluşturabilecek enflamatuvar hücreleri ve patogenezi önleyebilecek anti-enflamatuvar hücrelerin düzeyleri tespit edilmeye çalışıldı. Ayrıca bu hücrelerin yüzeyinde eksprese edilip MSS'e geçmesinde rol oynayan integrinlerin düzeyleri belirlenmeye çalışıldı. İlk olarak total lenfosit düzeyi, daha sonra sırayla Th hücresi ve alt grupları olan Treg, Th1, Th2, Th17, Th17.1 hücrelerinin düzeyleri ve bu hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen LFA-1, MAC-1,  $\alpha 4$  ve  $\beta 3$  integrin seviyeleri belirlendi ve daha önceki literatür bulgularıyla karşılaştırıldı.

Jamshidian ve ark. çalışmalarında, atakla gelen RRMS hastalarının periferik kanında total lenfosit düzeyini sağlıklı kişilerinkinden daha düşük bulmuşlardır (106). Akaishi ve ark. da aynı iki grubu karşılaştırmış monosit, bazofil ve nötrofil sayısını MS hastalarında daha yüksek bulurken lenfosit düzeyine baktıklarında anlamlı bir farklılık tespit etmemişlerdir (107). Turgut ve ark. aktif MS, non-aktif MS ve sağlıklı kişilerde lenfosit düzeyini karşılaştırmış, iki MS grubu arasında bir fark tespit edememişlerdir, ancak sağlıklı bireylerden daha düşük olduğunu göstermişlerdir (108). Ünlü ve Demirci, yine MS hastalarında sağlıklı bireylere göre lenfosit düzeyini düşük bulmuş, atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastalarını ayrıca karşılaştırdıklarında anlamlı bir fark bulamamışlardır (109).

Bu çalışmada da atak ve remisyon döneminde olan RRMS hastaları ve sağlıklı bireylerin periferik kanındaki lenfosit düzeyi karşılaştırıldı. Literatürle benzer şekilde atak grubunda kontrol grubuna göre lenfosit düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde daha düşük bulundu. Remisyon grubu da atak grubuna göre yüksek, kontrol grubuna göre düşük lenfosit düzeyine sahipti, ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi.

Total lenfosit düzeyinin MS hastalarında sağlıklı bireylere göre daha düşük olması sistemik enflamasyon durumunda nötrofillerin artışı ve lenfositlerin zamanla apoptoza gitmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu durum, MS'e özgül olmayıp diğer nörolojik hastalıklarda da bu şekilde olduğu gösterilmiştir (107,109). Bizim çalışmamız da önceki araştırmalarla paralellik gösterdi. Özellikle sistemik enflamasyonun belirgin olduğu atak döneminde lenfosit düzeyinin düşük olması ve zamanla durumu daha stabil hale gelen remisyon hastalarında lenfosit düzeyinin yüksek olması bu bulguyu destekler niteliktedir.

Lenfosit hücrelerinin neredeyse tamamının hastalık patogenezine katkısı olduğu düşünülse de MS'te hastalığın başlangıcı ve ilerleyişine ilişkin mevcut kanıtlar, otoreaktif Th hücrelerinin MS patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (2).

Mikulskova ve ark. remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerin periferik kanındaki Th hücre düzeyini karşılaştırmış, bellek Th hücrelerinin düzeyini RRMS hastalarında daha yüksek bulurken, olgunlaşmamış Th hücrelerini daha düşük bulmuşlardır (110). Canto-Gomes ve ark. da yeni tanı almış RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde total Th, olgunlaşmamış Th ve bellek Th hücre düzeylerini ve olgunlaşmamış/bellek Th hücre oranını karşılaştırmışlar ancak anlamlı bir fark saptamamışlardır (111). Yine D'Amico ve ark. yeni tanı almış RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde Th düzeyini karşılaştırmışlar ve hasta grubunda daha yüksek düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Olgunlaşmamış Th hücreleri açısından iki grup arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (112). Teniente-Serra ve ark. da yaptıkları çalışmada RRMS hastalarında sağlıklı bireylere göre Th hücrelerinin daha yüksek düzeyde bulunduğunu belirlemişlerdir. Ancak, erken bellek Th hücrelerini hasta grubunda daha düşük tespit etmişlerdir (113).

Biz çalışmamızda olgunlaşmamış ve bellek Th hücre ayrımı yapmadan total Th hücre düzeyini araştırdık. Remisyon grubunda kontrol grubuna göre Th hücre düzeyini istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek olduğunu saptadık. Atak grubunda ise Th düzeyi kontrol grubuna göre yüksek, remisyon grubuna göre düşük olmasına rağmen anlamlı bir fark yoktu. Bulgularımız daha önceki çalışmalarla benzerlik gösterdi. Bu bulgular, MS'te immünolojik aktivitenin yalnızca atak

dönemiyle sınırlı kalmadığını, remisyon döneminde de periferik kanda T hücre fonksiyonunun belirli düzeyde sürdüğünü ve remisyon döneminde hastalığın altta yatan immünolojik sürecinin hala devam ettiğini düşündürmektedir. Atak döneminde Th hücrelerinin KBB'yi geçerek MSS'e göç etmesi, sistemik dolaşımdaki düzeylerinin azalmasına yol açabilir. Bu nedenle periferik kanda Th hücre düzeyleri, atak döneminde remisyon dönemine kıyasla daha düşük saptanmış olabilir.

Treg hücreleri, potansiyel olarak otoreaktif T hücrelerinin aktivasyonunu engelleyerek düzenleyici rol oynamaları ile bilinmektedir. Treg'ler MS'te kapsamlı biçimde incelenmiş olsa da, bu hücrelerin oranı, sayısı ve fonksiyonuna ilişkin bulgular arasında görüş birliği bulunmamaktadır (111,114).

Mikulcova ve ark. remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde Treg düzeyini karşılaştırmış, hasta grubunda Treg düzeyini daha yüksek bulsalar da istatistiksel bir fark tespit etmemişlerdir (110). Canto-Gomes ve ark. yeni tanı almış RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde Treg düzeyini karşılaştırmış anlamlı bir fark bulamamışlardır. Aynı zamanda CD39<sup>+</sup> eksprese eden Treg düzeyini RRMS hastalarında daha düşük bulmuşlardır (111). Haas ve ark. MS' te Treg hücreleri üzerine yoğunlaştığı çalışma da aktif hastalık döneminde olan RRMS hastaları ile sağlıklı bireyleri karşılaştırmış, Treg düzeyini atak hastalarında istatistiksel bir fark olmadan daha düşük bulmuşlardır (115). Ciccocioppo ve ark. aktif hastalık dönemindeki RRMS hastaları ve sağlıklı bireylerin olduğu çalışmada, Treg düzeyini karşılaştırmış ve iki grup arasında istatistiksel bir fark tespit etmemişlerdir. CD45RO<sup>+/+</sup> ve CD25<sup>soluk/orta</sup> ekspresyon düzeyine göre Treg hücrelerini non-aktif, salgılayıcı ve aktif Treg olmak üzere 3 gruba ayırıp incelemişlerdir. Hasta popülasyonunda non-aktif Treg hücrelerini düşük, aktif Treg hücrelerini yüksek düzeyde bulmuşlardır. Ayrıca Treg hücrelerinde aktivasyon ve olgunlaşma belirteci olan HLA-DR ekspresyonuna baktıklarında MS hastalarında Treg hücresi ve alt gruplarında daha yüksek eksprese edildiğini saptamışlardır. CD39<sup>+</sup> ekspresyonuna baktıklarında Treg hücre ve alt gruplarında hasta ve sağlıklı grupta anlamlı bir fark saptamamışlardır (116).

Çalışmamızda, periferik kanda Th hücreleri içerisindeki Treg hücre düzeyini üç grupta karşılaştırdık. Atak grubu daha yüksek Treg düzeyine sahipken, remisyon grubunu Treg hücre düzeyi en düşük grup olarak belirlesek de üç grubun Treg

düzeyleri birbirine çok yakındı. Çalışmamızın bir eksiği olarak Treg hücrelerinde aktif/non-aktif ayrımı yapmamış olsak da, literatürdeki pek çok çalışmayla uyumlu şekilde, total Treg düzeylerini MS hastaları ile sağlıklı bireyler arasında karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Sonuç olarak periferik kanda MS hastalarında Treg hücre düzeylerinde belirgin bir seviye farklılığı olmadığını, buna karşın baskılayıcı kapasitelerinde ve aktivasyon belirteçlerinde azalma olabileceğini düşünmekteyiz.

Th1 hücrelerinin IFN- $\gamma$  salgılayarak makrofaj aktivasyonunu sağladığı ve bu mekanizma yoluyla hem EAE hem de MS patogenezinde demiyelinizasyona katkıda bulunduğu bilinmektedir (117). Bu nedenle periferik kandaki Th1 düzeylerinin belirlenmesi, hastalığın immünolojik aktivitesini ve patogenezdaki rolünü anlamada yol gösterici olabileceğini öngörmekteyiz.

Canto-Gomes ve ark. yeni tanı almış RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde Th1 düzeyini periferik kanda karşılaştırmış anlamlı bir fark bulamamışlardır (111). Arellano ve ark. da remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde Th1 ve IFN- $\gamma$  düzeyini karşılaştırmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır (118). Durelli ve ark. atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireyleri karşılaştırdıkları çalışmada Th hücrelerinde IFN- $\gamma$  eksprese eden hücrelerin düzeyine bakmışlar ve üç grup arasında anlamlı bir fark saptamamışlardır (119). Song ve ark. yaptıkları çalışmada, remisyon dönemindeki MS hastaları ile sağlıklı bireyler arasında Th hücrelerinde IFN- $\gamma$  eksprese eden hücrelerin düzeyini karşılaştırdıklarında anlamlı bir fark saptamamışlardır. Ayrıca, immünmodülatör tedavi alan ve almayan hastalar karşılaştırıldığında da bu hücre alt grubunda anlamlı bir farklılık tespit etmemişlerdir (120).

Çalışmamızda atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ve sağlıklı bireylerde Th1 düzeyini Th hücreleri içinde belirledik. Atak grubu en yüksek, remisyon grubu da en düşük Th1 düzeyine sahip grup olarak saptadık. Ancak üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Elde ettiğimiz bu veri diğer çalışmalarla benzerlik gösterdi. Sonuç olarak periferik kanda Th1 düzeyinin atak ve remisyon dönemindeki etkinliğini kandaki seviyesine bakarak anlamının bize sonuç vermeyeceğini düşünmekteyiz.

Th2 hücrelerinin IL-4, IL-5 ve IL-10 gibi sitokinler salgılaması, bu hücrelerin MS'te anti-enflamatuvar süreçlerde rol oynayabileceğini göstermiştir. Th1 ve Th2 hücrelerinden salınan sitokinlerin karşılıklı etkileşim içinde birbirlerinin etkisini dengelemesinin MS'te seyri belirleyebileceği öne sürülmüştür (75). Glatiramer asetat ve dimetil fumaratın bağışıklık yanıtını Th2 yönünde modüle etmesi, MS'teki terapötik etkilerinin temel mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir (32,35).

Canto-Gomes ve ark. yeni tanı almış RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde Th2 düzeyini periferik kanda karşılaştırmış anlamlı bir fark bulamamışlardır. Ancak ataktan sonra geçen süre uzadıkça Th2 hücre düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir (111). Clerici ve ark. da IL-4 eksprese eden Th2 hücrelerini incelediklerinde atakla gelen hastalarda Th2 düzeyinin azaldığını, remisyondaki hastalarda aksine arttığını bulmuş olsalar da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır (121). Song ve ark. IL-4 eksprese eden Th2 hücrelerini remisyon dönemi MS hastaları ve sağlıklı kişilerde karşılaştırdıklarında hastalarda daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ancak bu hastalardan bazıları interferon beta tedavisi aldığı için hastalardaki artışın buna bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (120). Liu ve ark. yaptığı çalışmada MS hastası ve sağlıklı bireylerde Th2 düzeyini karşılaştırmış hem atak hem remisyon hem de sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptamamışlardır (122).

Biz de çalışmamızda atak ve remisyon dönemlerinde olan RRMS hastaları ile sağlıklı bireyleri karşılaştırdığımızda, Th2 düzeyini sağlıklı bireylerde en yüksek, atak grubunda ise en düşük olarak saptadık. Diğer çalışmalara benzer şekilde hasta grupları ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmedik. Th2 hücrelerinin de Th1'de olduğu gibi periferik kanda atak ve remisyon dönemindeki etkinliğini kandaki seviyesine bakarak anlamının bize sonuç vermeyeceğini düşünmekteyiz.

Th17 hücrelerinin özellikle MS'teki immün saldırıyı başlattığı ve sürdürdüğü öne sürülmüştür. MS ve diğer immün aracılı hastalıklarda, olgunlaşmamış T hücrelerinin, IL-1 $\beta$  ve IL-6 etkisi altında IL-17 üreten bu hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir. IL-17'nin MSS'de bulunması, matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3) aktivasyonunu artırır ve böylece bu enzim, nötrofillerin inflamasyon bölgelerine taşınmasını sağlar ve ayrıca proteazlar ile jelatinazların salgılanmasını uyarır. Bu

enzimler, KBB'nin bozulmasına ve makrofajlar ile nötrofillerin inflamasyon bölgesine toplanmasına katkıda bulunur (123).

Jamshidian ve ark. yaptığı bir çalışmada, atakla gelen RRMS hastaları ve sağlıklı bireylerin periferik kanındaki Th17 düzeyine bakmış ve atak hastalarında daha yüksek düzeyde olduğunu bulmuşlardır (106). Teniente-Serra ve ark. RRMS hastaları ile sağlıklı hastaları karşılaştırdığı çalışmada Th17 düzeyini hasta grubunda daha yüksek bulmuşlardır (113). Arellano ve ark. yaptığı çalışmada Th17 düzeyini remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde karşılaştırmışlar hasta grubunda daha yüksek düzeyde tespit etseler de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır (118). Kebir ve ark. atak ve remisyon dönemi RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde, periferik kanda Th17 düzeyini karşılaştırmış ve atak grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek düzeyde Th17 saptamışlardır ancak remisyon hastalarında Th17 düzeyi sağlıklı bireylere göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemiştir (124). Li ve ark. yaptığı meta-analizde 2009-2015 yılları arasında periferik kanda Th17, IL-17 ve 1L-23 düzeyini MS hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda karşılaştıran çalışmaları incelemiş ve çalışmaların çoğunda MS hastalarında daha yüksek düzeyde bulunduklarını göstermişlerdir (125).

Biz de çalışmamızda periferik kanda Th hücreleri içinde Th17 düzeyini atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde karşılaştırdık. Remisyon grubunda düzeyi en yüksek, kontrol grubunda düzeyi en düşük olarak saptadık. Ancak üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadık. Bahsedilen çalışmalarla benzer olarak MS hastalarında sağlıklı bireylere göre daha yüksek düzeyde Th17 hücresi olduğunu bilsak da istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Th17.1 hücreleri MS patogenezinde en önemli enflamatuvar hücrelerden biri olduğu gösterilmiştir. MSS'i geçme potansiyelinin yüksek olması ve Natalizumab'a karşı en iyi yanıt veren hücre olması da MS'te etkin rol oynadığını düşündürmektedir (126).

Paroni ve ark. yaptığı çalışmada EDSS skoru yüksek remisyonda olan RRMS hastalarını sağlıklı bireylerle karşılaştırmış ve hasta grubunda periferik kanda Th17.1 düzeyini çok daha yüksek bulmuşlardır (126). Kebir ve ark. da atak ve remisyon dönemi RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde, TH17.1 düzeyini karşılaştırmış ve atak

grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek düzeyde Th17.1 saptamışlardır. (124). Van Langelaar ve ark. remisyon dönemindeki hastalar ile sağlıklı bireyleri karşılaştırdıklarında Th17.1 düzeyini remisyon grubunda daha düşük bulmuşlardır. Bu durumu, Th17.1 hücrelerinin MSS'e göç ederek BOS'ta birikip periferik kanda azalmasıyla ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir (127). Edwards ve ark. atak dönemindeki MS hastaları ile sağlıklı bireyleri kıyaslamış ve yine periferik kanda MS hastalarında Th17.1 düzeyini daha yüksek bulmuşlardır (128).

Bizde alışmamızda periferik kanda Th hücreleri içinde Th17.1 düzeyini atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerde karşılaştırdık. Atak hastaları sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde daha yüksek Th17.1 hücre düzeyine sahipti. Remisyon grubu da sağlıklı gruba göre daha yüksek Th17.1 hücre düzeyine sahipti ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Benzer çalışmalarla uyumlu olarak bizim atak hastalarımızda da Th17.1 düzeyi bariz yüksekti. Özellikle atak döneminde Th17.1 hücrelerinin periferik kanda artması MS patogenezinde rolünün önemine işaret etmektedir.

Çalışmamızda ayrıca Th2/Th17.1 oranını üç grupta karşılaştırdık. Atak grubu kontrol grubuna göre daha düşük bir orana sahipti. Bu durum atak döneminde periferik kanda enflamatuvar Th17.1 hücrelerinin arttığını gösterirken, anti-enflamatuvar Th2 hücrelerinin ise azaldığını göstermektedir.

Etkili adaptif immün yanıtların gelişebilmesi, patojenlerin temizlenmesi ve immün hafızanın oluşması için lenfosit dolaşımının zaman ve mekn açısından hassas biçimde düzenlenmesi gerekir. Lenfosit aktivasyonu veya gindeki bozukluklar, zayıf bağışıklık yanıtlarına, tekrarlayan enfeksiyonlara ve çeşitli otoimmün ya da kronik enflamatuvar hastalıklara yol açabilir. T hücrelerinin dokulara yönelmesinde önemli rol oynayan integrinler, hücre yüzeyinde bulunan ve adezyon, sinyal iletimi ve g süreçlerini düzenleyen reseptörlerdir (129).

LFA-1, dolaşımdaki lökositlerin damar duvarı boyunca yuvarlanmasına katılmakla birlikte, esas olarak lenfoid organların damar yatağında ve enflamasyon bölgelerinde, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi ligandlarla etkileşimi aracılığıyla bu hücrelerin sıkı tutunmasını sağlayan integrin molekülüdür (130).

İnsanlarda, LFA-1'in monoklonal antikor efalizumab ile blokajı, psoriasis tedavisinde kullanılmış olup derideki enflamatuvar immün yanıtları etkin biçimde azalttığı görülmüştür. Ancak bu ilacı kullananlarda PML gelişmesi nedeniyle endişeye yol açmıştır. Günümüzde bu yan etkilerinden dolayı kullanımdan kaldırılmıştır (131)

Eikelenboom ve ark. yaptığı çalışmada, farklı MS alt tiplerinde Th hücre yüzeyindeki LFA-1 integrin düzeyleri incelenmiştir. Araştırmacılar, SPMS hastalarında RRMS hastalarına kıyasla CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde LFA-1 ekspresyonunun anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu bulgu, SPMS hastalarının hastalık süresinin daha uzun olması ve buna bağlı olarak immün aktivasyonun daha ileri düzeyde seyretmesi ile açıklanmıştır (132).

Rothhammer ve ark. EAE modelinde Th1 hücrelerinin yüksek  $\alpha 4$  integrin ekspresyonu ile spinal kord infiltrasyonu gösterdiğini, buna karşılık Th17 hücrelerinin  $\alpha 4$  ekspresyonundan bağımsız LFA-1 üzerinden MSS'nin supraspinal bölgelerine geçebildiğini saptamışlardır (133). Aynı şekilde Schneider-Hohendorf ve ark. MS hastası bireylerde Th17 hücrelerinin LFA-1 bağımlı olarak MSS'e geçebildiğini tespit etmişlerdir (134). Glatigny ve ark. Treg hücreleri üzerine yaptığı çalışmada bu hücrelerin Th17 hücreleri gibi  $\alpha 4$  e bağlı kalmadan LFA-1 bağımlı olarak MSS'e göç edebildikleri gösterilmiştir (135).

LFA-1 üzerine Th hücrelerinde yapılmış kısıtlı çalışmalara ilave olarak bizde atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ve sağlıklı bireylerin periferik kanında Th hücre alt gruplarının hücre yüzeyindeki LFA-1 düzeyini karşılaştırdık. Çalışmamızda Th1 ve Th17.1 hücrelerinin LFA-1 ekspresyonunun diğer Th alt gruplarından daha yüksek olduğunu gördük. Th alt popülasyonlarında üç grup arasında LFA-1 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Literatürde LFA-1'in özellikle  $\alpha 4$ -bağımsız migrasyonda (ör. Th17 ve Treg hücreleri) belirleyici olduğu göz önüne alındığında, periferik kandaki ekspresyon düzeyinin anlamlı farklılık göstermemesi, MSS'de bu hücrenin ligandı olan ICAM-1 ekspresyonunun Th hücre migrasyonundan asıl sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

MAC-1 integrini, miyeloid hücre soyundan gelen hücreler tarafından eksprese edilir. Bunlara nötrofiller, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler dâhildir. MAC-1, sınırlı düzeyde olmak üzere bazı T lenfosit alt popülasyonlarında da eksprese

edildiği gösterilmiştir (136). Çalışmamızda Th1 ve Th17.1 alt popülasyonunda eksprese edildiğini ortaya koyduk.

MAC-1, lökositlerin adezyonundan sonra damar lümeni boyunca sürünerek hareketini ICAM-1 ile etkileşerek gerçekleştirir (137). LFA-1 ve MAC-1 integrinlerinin ICAM-1 ile bağlanma sürecinde LFA-1/ICAM-1 etkileşiminin baskın olduğu, dolayısıyla LFA-1 ve MAC-1'in bağlanma için rekabet edebileceği gösterilmiştir (138).

Bullard ve ark. EAE modelinde hem fagositik hücrelerde hem de T hücre yüzeyinde MAC-1 ekspresyonunun hastalığın gelişimi için zorunlu olduğunu öne sürmüşlerdir. Özellikle MAC-1 eksik T hücrelerinin EAE'yi geliştirememesi nedeniyle T hücrelerindeki CD11b'nin enflamatuvar aktivasyon ve patojenik göç süreçlerinde işlevsel rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (105). Mindur ve ark. yine EAE modelinde CD11b ekspresyonunun Th hücrelerinde arttığını tespit etmişlerdir. Ancak CD11b'nin dolayısıyla MAC-1'in patojenik rolünün tam olarak net olmadığını MSS'e göçte etkili olmayıp patojenik T hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir (139).

Th hücreleri üzerinde MAC-1 ekspresyonunun düşük olduğu bilindiğinden, bu integrinin MS'teki rolüne ilişkin literatür oldukça sınırlıdır. Çalışmamızda MAC-1'in Th1 ve Th17.1 hücreleri tarafından eksprese edildiğini ve Th17.1 hücrelerinde atak döneminde kontrol grubuna kıyasla daha düşük düzeyde olduğunu tespit ettik. Bu bulguların değerlendirilmesinde, atak döneminde Th17.1 hücre sayısındaki artışın da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Tüm sonuçlar birlikte ele alındığında, MAC-1'in Th17.1 hücrelerinin MSS'e göçünde rolünün oldukça sınırlı olduğu, hatta bu süreçte belirleyici bir katkısının bulunmadığı düşünülmektedir.

VLA-4, bağışıklık sisteminde lenfosit farklılaşması ve enflamasyon sırasında dokuya özgü göçte rol oynayan önemli bir integrindir. VLA-4 ve  $\alpha 4\beta 7$  dâhil  $\alpha 4$  integrinleri, lökositlerin endotel üzerinde yuvarlanma ve tutunma aşamalarında görevler üstlenir. Ayrıca, immünolojik sinapsın yapısında kritik öneme sahip olan LFA-1–ICAM-1 etkileşimine ek olarak, VLA-4–VCAM-1 etkileşimi de sinaps oluşumuna katkı sağlar (136).

Barrau ve ark., periferik kanda bellek Th hücrelerinde  $\alpha 4$  düzeyine bakmış ve atak dönemindeki RRMS hastalarında sağlıklı bireylere göre daha yüksek ekspresyon düzeyi saptamışlardır. Ayrıca bu hücrelerin çoğunun da IFN- $\gamma$  eksprese ettiği dolayısıyla Th1 benzeri özellik gösterdiğini belirlemişlerdir. Aynı şekilde IL-4 düzeyi ekspresyonuna bakıp Th2 hücreleri değerlendirildiğinde  $\alpha 4$  düzeyini o kadar güçlü eksprese etmediklerini belirlemişlerdir (140). Kimura ve ark. periferik kanda MS hastaları ile sağlıklı bireylerin Th1, Th17 ve Treg hücrelerinin  $\alpha 4$  ekspresyon düzeyini karşılaştırdıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır (141). Brucklacher-Waldert ve ark. aynı şekilde Th1 ve Th17 hücrelerinde  $\alpha 4$  ekspresyon düzeyini iki grup arasında karşılaştırdıklarında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Ancak BOS'da Th17 hücrelerinde  $\alpha 4$  ekspresyon düzeyini MS hastalarında daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (142). Bu çalışma bizim periferik kanda Th17 hücrelerinde atak döneminde  $\alpha 4$  ekspresyonunun azalmasını açıklamamıza yardımcı olmuştur.  $\alpha 4$  ekspresyonu artmış Th17 hücrelerinin periferden MSS'e geçmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

VLA-4 bloke edici antikorlar ve ligand-mimetik küçük moleküller gibi antagonistlerle terapötik olarak hedef alınmakla birlikte,  $\alpha 4$  integrin fonksiyonunun inhibisyonuna dayanan bu tedaviler otoimmün hastalıklarda fayda sağlasa da gelişim, hematopoiez ve immün gözetim gibi VLA-4 bağımlı süreçler üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir (136). Natalizumab, CD49d<sup>+</sup> hücreleri belirgin şekilde azaltarak Th hücrelerinin MSS'e göçünü engellese de, tedavi sonrasında dolaşımda kalan CD49d<sup>+</sup> Th1 ve CD49d<sup>+</sup> Th17 hücrelerinin belirgin biçimde daha proenflamatuvar bir fenotipe yöneldiği gösterilmiştir. Buna karşın, Treg hücrelerinde CD49d kaybı çok daha belirgindir. Bu durum enflamatuvar hücre dengesi yönünde bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, sayıca azalmasına rağmen fonksiyonel olarak daha agresif hale gelen CD49d<sup>+</sup> enflamatuvar T hücrelerinin, natalizumab tedavisi altında bile bazı hastalarda görülen klinik atakların tetiklenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (141).

Çalışmamızda atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ve sağlıklı bireylerde Th hücrelerinde  $\alpha 4$  düzeyini periferik kanda karşılaştırdık. Diğer çalışmalardan farklı olarak Th1 hücrelerinde atak döneminde daha düşük  $\alpha 4$  ekspresyon varlığını tespit ettik. Bu gözlemimiz Barrau ve ark.'nın atak döneminde

periferik kanda Th hücrelerinde  $\alpha 4$  artışı bulgusu ile tam örtüşmese de, diğer iki araştırmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Th2, Th17 ve Th17.1 hücrelerinde üç grup arasında benzer düzeyde  $\alpha 4$  ekspresyon varlığı tespit ettik.  $\alpha 4$  ekspresyonunun hasta ve sağlıklı bireylerde benzer düzeyde eksprese edilmesi literatürde de bildirildiği üzere, periferik kanın hastalığa özgü beklenen  $\alpha 4$  artışını yeterince yansıtmadığını ortaya koymaktadır. Özellikle daha önce yapılmış araştırılmaya rastlamadığımız Th17.1 hücrelerinde de bu durumun benzer olduğunu gördük.

$\beta 3$  integrin, insanda bilinen  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  ve  $\alpha \text{V}\beta 3$  yapısında bulunur.  $\alpha \text{V}\beta 3$  integrini, hücre adezyonu, migrasyonu ve sinyal iletimi dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde kritik bir rol oynar (90).

Du ve ark.  $\alpha \text{v}\beta 3$  integrinini özellikle Th17 hücreleri tarafından eksprese edildiğini saptamışlar ve IL-23 sinyalizasyonu aracılığıyla ekspresyonunun arttığını belirlemişlerdir.  $\alpha \text{v}\beta 3$  eksprese eden Th17 hücrelerinin EAE sırasında düzeyinin arttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu integrinin noksan olduğu ratlarda veya inhibitör kullanılarak blokaj uyguladıklarında, Th17 aracılı EAE'nin belirgin şekilde baskılandığını, Th1 aracılı EAE üzerinde bir etkisinin olmadığı tespit etmişlerdir. Dikkat çekici olarak,  $\alpha \text{v}\beta 3$  defektif Th17 hücrelerinin MSS'e infiltre olamadığını, dolayısıyla EAE sırasında patojenik Th17 hücrelerinin MSS'e göç edebilmesi için  $\alpha \text{v}\beta 3$  integrininin gerekli olabileceğini öne sürmüşlerdir (12). Han ve ark. ise yine EAE çalışmasında  $\alpha \text{v}\beta 3$ 'e bağlanan inhibe edici bir peptid yardımıyla lökositlerin transmigrasyon kapasitesinin düştüğünü ve EAE şiddetinde azalma meydana geldiği belirlemişlerdir (143).

$\alpha \text{v}\beta 3$  integrinin MS hastalarında Th hücrelerindeki ekspresyonu üzerine ilişkin bugüne kadar neredeyse hiç araştırılma yapılmamıştır. Biz çalışmamızda atak ve remisyon dönemindeki RRMS hastaları ile sağlıklı bireylerin periferik kanında Th hücrelerinde  $\beta 3$  ekspresyon düzeyini karşılaştırdık. Üç grupta da Th hücrelerindeki  $\beta 3$  ekspresyonunun benzer düzeyde olduğunu saptadık. Sonuç olarak çalışmamız, periferik kandaki Th hücrelerinde  $\beta 3$  integrin ekspresyonunun RRMS hastalarında sağlıklı kontrollerden farklı olmadığını göstererek  $\alpha \text{v}\beta 3$ 'ün insan MS patogeneziindeki rolünün muhtemelen periferik düzeyden çok dokuya özgü veya fonksiyonel mekanizmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız RRMS'in atak döneminde periferik kanda Th alt gruplarından sadece Th17.1'in arttığını gösterdi. Son yıllarda MS patogenezinde önemli rolü olduğu ileri sürülen Th17.1 hücre artışının periferik kanda gösterilmesi atak döneminin non-invazif ve pratik bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Th2/Th17.1 oranının atak grubunda daha düşük çıkması bu durumu ayrıca desteklemektedir.

MS patogenezinde rol alan Th hücrelerinin sinir sistemine adezyonu, migrasyonu ve invazyonunda rolleri olan 4 integrinin (LFA-1, MAC-1,  $\alpha 4$ ,  $\beta 3$ ) ekspresyonu Th alt popülasyonda bakıldığında MAC-1'in Th17.1 hücrelerinde,  $\alpha 4$ 'ün Th1 hücrelerinde atak döneminde azaldığını gördük. Atak döneminde bu integrinlerin ekspresyonunun arttığı Th hücreleri beklenirken bu durumun görülmesi, atak döneminde bu hücrelerin MSS'e invazyonu sonucu periferik kanda göremediğimizi düşündürdü. Perifer kanda Th hücrelerinin integrin ekspresyon düzeyi atak dönemini belirlemeye uygun olmadığını gördük.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Hücre ve integrin düzeylerine sadece periferik kanda bakılabildi. Hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden BOS örnekleri temin edemediğimiz için kan ve BOS örneklerinde bir karşılaştırma yapılamadı.

Remisyon grubumuzun yaş ortalaması diğer gruplara göre yüksekti. Bu durum çalışmamızın sonuçlarını etkilemiş olabilir

Çalışmamızda  $\alpha 4$  düzeyine bakıldığı için  $\alpha 4\beta 1$  ve  $\alpha 4\beta 7$  integrin düzeyleri ayrı ayrı değerlendirilemedi. Yine  $\beta 3$  düzeyine bakıldığı için  $\alpha V\beta 3$  ve  $\alpha II\beta 3$  integrinleri de ayrı ayrı tespit edilemedi.

## 7. KAYNAKLAR

1. Efendi H, Kuşçu DY. Multiple Skleroz tanı ve tedavi kılavuzu. İstanbul: Galenos Yayınevi; 2018.
2. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683–747.
3. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002 Sep 20; 110(6): 673–87.
4. Sheremata WA, Minagar A, Alexander JS, Vollmer T. The role of alpha-4 integrin in the aetiology of multiple sclerosis: current knowledge and therapeutic implications. *CNS Drugs* 2005; 19(11): 909-22.
5. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against  $\alpha 4\beta 1$  integrin. *Nature* 1992; 356: 63-6.
6. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 1993; 177(1): 57-68.
7. Weinstock-Guttman B. An update on new and emerging therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 2013; 19(17): s343-s354.
8. Gottlieb AB, Krueger JG, Wittkowski K, Dedrick R, Walicke PA, Garovoy M, et al. Psoriasis as a model for T-cell-mediated disease: immunobiologic and clinical effects of treatment with multiple doses of efalizumab, an anti-CD11a antibody. *Arch Dermatol* 2002; 138(5): 591-600.
9. Kuwahara H, Nishina K, Yokota T. Blood–brain barrier: a novel therapeutic target in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 2015; 6: 129–138.
10. Andersen GR, Emsley J. Structure and Function of the Leukocyte Integrin  $\alpha M\beta 2$ . In: Gullberg D, Eble JA (eds), *Integrins in Health and Disease*. Springer, 2023: 357–77.
11. Steinman L. Shifting therapeutic attention in MS to osteopontin, type 1 and type 2 IFN. *Eur J Immunol*. 2009; 39(9): 2358-60.
12. Du F, Garg AV, Kosar K, Majumder S, Kugler DG, Hernandez Mir G, et al. Inflammatory Th17 cells express integrin  $\alpha V\beta 3$  for pathogenic function. *Cell Rep*. 2016; 16(5): 1339-51.
13. Portaccio E, Magyari M, Havrdová EK, Ruet A, Brochet B, Salifi A, et al. Multiple sclerosis: emerging epidemiological trends and redefining the clinical course. *Lancet Reg Health Eur* 2024; 44: 100977.
14. Atlas of MS. Number of people with MS (Prevalence per 100,000 people). <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms> (Erişim tarihi: 21.09.2025).
15. Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol* 2018; 31(6): 752–9.

16. Ward M, Goldman MD. Epidemiology and pathophysiology of multiple sclerosis. *Continuum (Minneapolis)* 2022; 28(4): 988–1005.
17. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46: 907–11.
18. Ford H. Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Med*. 2020; 20(4): 380–3.
19. Ömerhoca S, Yazıcı Akkaş S, Kale İçen N. Multiple sclerosis: diagnosis and differential diagnosis. *Arch Neuropsychiatry* 2018; 55(Suppl 1): S1–S9.
20. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1965; 122(1): 552–8.
21. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983; 13(3): 227–231
22. Schwenkenbecher P, Wurster U, Konen FF, Gingele S, Sühs KW, Wattjes MP, et al. Impact of the McDonald criteria 2017 on early diagnosis of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Front Neurol* 2019; 10: 188.
23. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 897–902.
24. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121–7.
25. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 2005; 58: 840–6.
26. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69: 292–302.
27. Rovira À, Wattjes MP, Tintoré M, Tur C, Yousry TA, Sormani MP, et al. MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 471–82.
28. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018; 17: 162–73.
29. Auricchio F, Scavone C, Cimmaruta D, Di Mauro G, Capuano A, Sportiello L, et al. Drugs approved for the treatment of multiple sclerosis: review of their safety profile. *Expert Opin Drug Saf* 2017; 16: 1359–71.
30. Torkildsen O, Myhr KM, Bø L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis – a review of approved medications. *Eur J Neurol* 2016; 23: 18-27.

31. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon- $\beta$  mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 74(Suppl 1): S17-24.
32. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 74(Suppl 1): S25-30.
33. Papadopoulou A, Kappos L, Sprenger T. Teriflunomide for oral therapy in multiple sclerosis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2012; 5(6): 617-28.
34. Miller AE, Wolinsky JS, Kappos L, Comi G, Freedman MS, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with a first clinical episode suggestive of multiple sclerosis (TOPIC): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 2014; 13(10): 977-86.
35. Bomprezzi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: An overview. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; 8(1): 20-30.
36. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1098-107.
37. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010; 362(5): 387-401.
38. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354(9): 899-910.
39. Cliff DB, Cliff Ord DB, Deluca A, Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G, et al. Rapid review natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* 2010; 9: 438-84.
40. Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord* 2018; 11.
41. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in multiple sclerosis: mechanism of action and beyond. *Int J Mol Sci* 2015; 16(7): 16414-39.
42. Jacobs BM, Ammoscato F, Giovannoni G, Baker D, Schmierer K. Cladribine: mechanisms and mysteries in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018; 89: 1266-71.
43. Kulkarni AP, Kellaway LA, Lahiri DK, Kotwal GJ. Neuroprotection from complement-mediated inflammatory damage. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1035(1): 147-64.
44. Zabihi MR, Zangoie A, Piroozkhah M, Harirchian MH, Salehi Z. From multiple sclerosis to organ-specific autoimmune disorders: insights into the molecular and clinical implications of comorbidity. *Mol Neurobiol* 2025; 62(3): 3396-411.
45. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis—new concepts. *Brain Res Bull* 2003; 61(3): 321-6.
46. Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2021; 14.

47. Perry VH. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol* 1998; 90(2): 113-21.
48. Wu C, Rauch U, Korpos E, Song J, Loser K, Crocker PR, et al. Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression. *J Immunol* 2009; 182(10): 6508-16.
49. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1983; 62(1-3): 219-32.
50. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2011; 365(23): 2188-97.
51. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, et al. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 2004; 103(11): 4222-31.
52. Lolli F, Martini H, Citro A, Franceschini D, Portaccio E, Amato MP, et al. Increased CD8<sup>+</sup> T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis. *J Neuroinflamm* 2013; 10(1): 1-12.
53. Zang YCQ, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, et al. Increased CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004; 172(8): 5120-7.
54. van Nierop GP, van Luijn MM, Michels SS, Melief MJ, Janssen M, Langerak AW, et al. Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 2017; 134(3): 383-401.
55. Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2022; 22(12): 734-50.
56. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999; 5(2): 170-5.
57. Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, Uccelli A, Hartung HP, Montalban X, et al. Role of B cells in multiple sclerosis and related disorders. *Ann Neurol* 2021; 89(1): 13-23.
58. Genç K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80<sup>+</sup> B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon  $\beta$ -1b therapy. *J Clin Invest* 1997; 99(11): 2664-71.
59. Bodhankar S, Galipeau D, Vandenbark AA, Offner H. PD-1 interaction with PD-L1 but not PD-L2 on B cells mediates protective effects of estrogen against EAE. *J Clin Cell Immunol* 2013; 4(3): 143.
60. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2018; 19(7): 696-707.
61. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 2012; 209(5): 1001-10.

62. Batoulis H, Addicks K, Kuerten S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/TH1 paradigm. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* [Internet]. 2010; 192(4): 179-93.
63. Sallusto F. Heterogeneity of human CD4<sup>+</sup> T cells against microbes. *Annu Rev Immunol* 2016; 34: 317-34.
64. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100(6): 655-69.
65. Kaur KK, Allahaidda G, Singh M. Role of CD4<sup>+</sup> T helper cells as mediators of inflammation in the pathophysiology of multiple sclerosis: a systematic review. *SunText Rev Biotechnol* 2020; 1(1).
66. Murphy ÁC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KHG. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2010 ;24(4): 641-51.
67. Gran B, Chu N, Zhang GX, Yu S, Li Y, Chen XH, et al. Early administration of IL-12 suppresses EAE through induction of interferon- $\gamma$ . *J Neuroimmunol* 2004; 156(1–2): 123-31.
68. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011; 74(1): 1-13.
69. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , by human macrophages. *J Immunol* 1998; 160(7): 3513-21.
70. Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology* 2008; 125(2): 161-9.
71. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007; 13(10): 1173-5.
72. Acosta-Rodriguez E V., Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; 8(6): 639-46.
73. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010; 115(2): 335-43.
74. Van Langelaar J, Van Der Vuurst De Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain* 2018; 141(5): 1334-49.
75. Steinman L, Conlon P. Antigen specific immunotherapy of multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 2001; 21(2): 93-8.

76. Planas R, Metz I, Ortiz Y, Vilarrosa N, Jel C I, Salinas-Riester G, et al. Central role of Th2/Tc2 lymphocytes in pattern II multiple sclerosis lesions. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; 2(9): 875-93.
77. Perriard G, Mathias A, Enz L, Canales M, Schluep M, Gentner M, et al. Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *J Neuroinflamm* 2015; 12(1): 1-18.
78. Ruocco G, Rossi S, Motta C, Macchiarulo G, Barbieri F, De Bardi M, et al. T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. *Clin Sci* 2015; 129(4): 291-303.
79. Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, et al. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 2013; 8(4): e61835.
80. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151-64.
81. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2007; 8(12): 1353-62.
82. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, et al. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T Cell activation. *Immunity* 2010; 33(3): 326-39.
83. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007; 37(Suppl 1): S116–23.
84. Lowther DE, Hafler DA. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev* 2012; 248(1): 156-69.
85. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2005; 35(11): 3343-52.
86. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006; 180(1-2): 178-84.
87. Bjerg L, Brosbøl-Ravnborg A, Tørring C, Dige A, Bundgaard B, Petersen T, et al. Altered frequency of T regulatory cells is associated with disability status in relapsing–remitting multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2012; 249(1-2): 76-82.
88. Sambucci M, Gargano F, Guerrera G, Battistini L, Borsellino G. One, No One, and One Hundred Thousand: T Regulatory Cells' Multiple Identities in Neuroimmunity. *Front Immunol* 2019; 10: 2894.

89. Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009; 183(11): 7602–10.
90. Zhang X, Gao L, Wang Y, Meng Q, Bai M, Xu D, Wang Y, Wang J, Bi H, Ding Y. The potential and therapeutic advances of the integrin family in neurological disorders. *Neural Regen Res.* 2025; NRR.NRR-D-25-00020.
91. Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48(4): 549–54.
92. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238(4826): 491–7.
93. Kishimoto TK, O'Connor K, Lee A, Roberts TM, Springer TA. Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell* 1987; 48(4): 681–90.
94. Hemler ME, Huang C, Schwarz L. The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight  $\beta$  subunit. *J Biol Chem* 1987; 262(7): 3300–9.
95. Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Sprague AG, Laroux FS, Grisham MB, Kotliansky VE, et al. Collagen-binding integrin  $\alpha 1\beta 1$  regulates intestinal inflammation in experimental colitis. *J Clin Invest* 2002; 110(12): 1773–82.
96. Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 2009; 324(5929): 895–9.
97. Zeltz C, Gullberg D. The integrin–collagen connection—a glue for tissue repair? *J Cell Sci* 2016; 129(4): 653–64.
98. Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(2): 91–100.
99. Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, et al. Reelin binds  $\alpha 3\beta 1$  integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 2000; 27(1): 33–44.
100. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(11): 692–704.
101. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(4): 288–300.
102. Cui Y, Rolova T, Fagerholm SC. The role of integrins in brain health and neurodegenerative diseases. *Eur J Cell Biol* 2024; 103(3): 151441.
103. Kallmann BA, Hummel V, Lindenlaub T, Ruprecht K, Toyka K V., Rieckmann P. Cytokine-induced modulation of cellular adhesion to human cerebral endothelial cells is mediated by soluble vascular cell adhesion molecule-1. *Brain* 2000; 123(4): 687–97.
104. Dusi S, Angiari S, Pietronigro EC, Lopez N, Angelini G, Zenaro E, et al. LFA-1 Controls Th1 and Th17 Motility Behavior in the Inflamed Central Nervous System. *Front Immunol* 2019; 10: 2436.

105. Bullard DC, Hu X, Schoeb TR, Axtell RC, Raman C, Barnum SR. Critical requirement of CD11b (Mac-1) on T cells and accessory cells for development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005; 175(10): 6327–33.
106. Jamshidian A, Shaygannejad V, Pourazar A, Zarkesh-Esfahani SH, Gharagozloo M. Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms. *J Neuroimmunol* 2013; 262(1–2): 106–12.
107. Akaishi T, Misu T, Fujihara K, Nakaya N, Nakamura T, Kogure M, et al. White blood cell count profiles in multiple sclerosis during attacks before the initiation of acute and chronic treatments. *Sci Rep* 2021;11(1): 22357
108. Turgut E, Alpua M, Ergün U. The relationships between the neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, eosinophil/lymphocyte, and monocyte/lymphocyte ratios and disease activity in patients with multiple sclerosis. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2025; 27(2): 150–155.
109. Doğan Ünlü M, Demirci S. Sensitivity of platelet-lymphocyte ratio, monocyte-lymphocyte ratio, neutrophil-lymphocyte ratio, red blood cell distribution width and systemic immune inflammatory index in multiple sclerosis patients: relationship with disease subtypes and disability. *Kocatepe Med J.* 2024; 25(3): 315-321.
110. Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, Bednarik J, Michalek J. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011; 300(1–2): 135–41.
111. Canto-Gomes J, Silva CS, Rb-Silva R, Boleixa D, da Silva AM, Cheynier R, et al. Low Memory T Cells Blood Counts and High Naïve Regulatory T Cells Percentage at Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Diagnosis. *Front Immunol* 2022; 13: 901165.
112. D’Amico E, Zanghi A, Parrinello NL, Romano A, Palumbo GA, Chisari CG, et al. Immunological Subsets Characterization in Newly Diagnosed Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 2022; 13: 819136.
113. Teniente-Serra A, Grau-López L, Mansilla MJ, Fernández-Sanmartín M, Ester Condins A, Ramo-Tello C, et al. Multiparametric flow cytometric analysis of whole blood reveals changes in minor lymphocyte subpopulations of multiple sclerosis patients. *Autoimmunity* 2016; 49(4): 219–28.
114. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007; 8(2): 191–7.
115. Haas J, Fritzsching B, Trübswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, et al. Prevalence of newly generated naïve regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007; 179(2): 1322–30.
116. Ciccocioppo F, Lanuti P, Pierdomenico L, Simeone P, Bologna G, Ercolino E, et al. The Characterization of Regulatory T-Cell Profiles in Alzheimer’s Disease and Multiple Sclerosis. *Sci Rep* 2019; 9(1): 8788

117. Kunkl M, Frasca S, Amormino C, Volpe E, Tuosto L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells* 2020; 9(2): 482.
118. Arellano G, Acuña E, Reyes LI, Ottum PA, De Sarno P, Villarroel L, et al. Th1 and Th17 cells and associated cytokines discriminate among clinically isolated syndrome and multiple sclerosis phenotypes. *Front Immunol.* 2017; 8: 753.
119. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- $\beta$ . *Ann Neurol* 2009; 65(5): 499–509.
120. Song ZY, Nakamura Y, Yamasaki R, Kawano Y, Shinoda K, Guzailiayi M, et al. Peripheral blood T cell subset characteristics of multiple sclerosis in remission phase correlate with annualized relapse rates. *Clin Exp Neuroimmunol* 2016; 7(4): 346–52.
121. Clerici M, Saresella M, Trabattoni D, Speciale L, Fossati S, Ruzzante S, et al. Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in multiple sclerosis patients with active or quiescent disease. *J Neuroimmunol* 2001; 121(1–2): 88–101.
122. Liu J, Mori M, Sugimoto K, Uzawa A, Masuda H, Uchida T, et al. Peripheral blood helper T cell profiles and their clinical relevance in MOG-IgG-associated and AQP4-IgG-associated disorders and MS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020; 91(2): 132–9.
123. Balasa R, Barcutean L, Balasa A, Motataianu A, Roman-Filip C, Manu D. The action of TH17 cells on blood brain barrier in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Hum Immunol* 2020; 81(5): 237–43.
124. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon- $\gamma$ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 66(3): 390–402.
125. Li YF, Zhang SX, Ma XW, Xue YL, Gao C, Li XY. Levels of peripheral Th17 cells and serum Th17-related cytokines in patients with multiple sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 2017; 18: 20–5.
126. Paroni M, Maltese V, De Simone M, Ranzani V, Larghi P, Fenoglio C, et al. Recognition of viral and self-antigens by TH1 and TH1/TH17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(3): 797–808.
127. Van Langelaar J, Van Der Vuurst De Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain* 2018; 141(5): 1334–49.
128. Edwards LJ, Robins RA, Constantinescu CS. Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease. *Cytokine* 2010; 50(1): 19–23.
129. Walling BL, Kim M. LFA-1 in T cell migration and differentiation. *Front Immunol* 2018; 9: 952.
130. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(9): 678–89.

131. Jilek S, Mathias A, Canales M, Lysandropoulos A, Pantaleo G, Schluep M, et al. Natalizumab treatment alters the expression of T-cell trafficking marker LFA-1  $\alpha$ -chain (CD11a) in MS patients. *Mult Scler* 2014; 20(7): 837–42.
132. Eikelenboom MJ, Killestein J, Izeboud T, Kalkers NF, Baars PA, Van Lier RAW, et al. Expression of adhesion molecules on peripheral lymphocytes predicts future lesion development in MS. *J Neuroimmunol* 2005; 158(1–2): 222–30.
133. Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, et al. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of  $\alpha 4$  integrin expression during EAE. *J Exp Med* 2011; 208(12): 2465–76.
134. Schneider-Hohendorf T, Rossaint J, Mohan H, Böning D, Breuer J, Kuhlmann T, et al. VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med* 2014; 211(9): 1833–46.
135. Glatigny S, Duhon R, Arbelaes C, Kumari S, Bettelli E. Integrin alpha L controls the homing of regulatory T cells during CNS autoimmunity in the absence of integrin alpha 4. *Sci Rep* 2015; 5: 7834
136. Hyun YM, Lefort CT, Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunol Res* 2009; 45(2): 195–208.
137. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006; 203(12): 2569–75.
138. Lub M, Van Kooyk Y, Figdor CG. Competition between lymphocyte function-associated antigen 1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) for binding to intercellular adhesion molecule-1 (CD54). *J Leukoc Biol* 1996; 59(5): 648–55.
139. Mindur JE, Ito N, Dhib-Jalbut S, Ito K. Early Treatment with Anti-VLA-4 mAb Can Prevent the Infiltration and/or Development of Pathogenic CD11b+CD4+ T Cells in the CNS during Progressive EAE. *PLoS One* 2014; 9(6): e99068.
140. Barrau MA, Montalban X, Sáez-Torres I, Brieva L, Barberà N, Martínez-Cáceres EM. CD4+CD45RO+CD49dhigh cells are involved in the pathogenesis of relapsing–remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 111(1–2): 215–23
141. Kimura K, Nakamura M, Sato W, Okamoto T, Araki M, Lin Y, et al. Disrupted balance of T cells under natalizumab treatment in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016; 3(2): e210.
142. Brucklacher-Waldert V, Stüerner K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132(Pt12): 3329–41.
143. Han S, Zhang F, Hu Z, Sun Y, Yang J, Davies H, et al. Dose-Dependent Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects of an  $\alpha\beta 3$  Integrin-Binding Peptide. *Mediators Inflamm* 2013; 2013(1): 268486.

## EK-1

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.05.2024-137102

T.C  
KÜTAHYA SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
KARAR FORMU

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI |                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Multiple Skleroz Hastalarının (Relapsing/Remitting) Atak ve Remisyon Dönemlerinde T Helper Hücre Yüzeyindeki İntegrinlerin Araştırılması                                                                                                                                                                                                                                                  |
| ETİK KURUL BİLGİLERİ  | ETİK KURULUN ADI                                                                                                                                                                                                                                                                             | Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi<br>Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                       | KURUL ADRESİ                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi<br>Evliya Çelebi Yerleşkesi Tavşanlı Yolu 10. Km<br>KÜTAHYA                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                       | TELEFON                                                                                                                                                                                                                                                                                      | (0 274) 260 00 43 / 1139                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                       | FAKS                                                                                                                                                                                                                                                                                         | (0 274) 265 22 85                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                       | E-POSTA                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <a href="mailto:etik.gir.olmayan@ksbu.edu.tr">etik.gir.olmayan@ksbu.edu.tr</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| BAŞVURU BİLGİLERİ     | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI                                                                                                                                                                                                                                            | Prof. Dr. Tülay KÖKEN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                       | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI                                                                                                                                                                                                                                            | Tıbbi Biyokimya AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                       | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ                                                                                                                                                                                                                                          | Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                       | YARDIMCI ARAŞTIRMACI VE BÖLÜMÜ                                                                                                                                                                                                                                                               | Dr. Öğr. Üyesi Hayri DEMİRBAŞ-Nöroloji AD.-<br>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi<br>Dr. Öğr. Üyesi Abdullah GÜZEL- Nöroloji AD.-<br>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi<br>Arş. Gör. Dr. Muammer ÜZÜM- Tıbbi Biyokimya AD.-<br>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi |
|                       | ARAŞTIRMANIN TÜRÜ                                                                                                                                                                                                                                                                            | Olgu Kontrol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| KARAR BİLGİLERİ       | Karar No: 2024/06-28                                                                                                                                                                                                                                                                         | Tarih: 07.05.2024                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                       | Başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |