

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

KUPRİZON MODELİNDE PERİFERAL NONSPESİFİK UYARILMIŞ T
LENFOSİT ÇALIŞMASI:
ALTERNATİF BİR BAKIŞ

Dr. Melike ÇAKAN ERCAN

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

KUPRİZON MODELİNDE PERİFERAL NONSPESİFİK UYARILMIŞ T
LENFOSİT ÇALIŞMASI:
ALTERNATİF BİR BAKIŞ

Dr. Melike ÇAKAN ERCAN

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Meryem Aslı Tuncer

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürecimin her aşamasında desteğini hissettiren, her bilimsel soruma değer vererek bu yolda ilerleyebilmem için değerli vizyonuyla ve sabırla beni yönlendiren, beraber çalışmaktan ve tez öğrencisi olmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağım Prof. Dr. Meryem Aslı Tuncer'e,

Bilimsel duruş ve çalışma şekli ile bana ilham veren, Nöroimmunolojiye olan tutkumun mimarlarından Prof. Dr. Rana Karabudak'a ve her zaman olduğu gibi tezim boyunca da içten desteğini hissettiren Öğr.Gör. Dr. N.Pınar Acar Özen'e,

Uzmanlık eğitim süresince hep daha iyi bir hekim olabilmem amacıyla yol gösteren ve her zaman destek olan Prof. Dr. Mehmet Akif Topçuoğlu'na,

Laboratuvarını çalışmalarına açan, bilimsel tartışmalarıyla ufkumu genişleten Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya ve tezimin yapıtaşlarını birlikte inşa ettiğimiz kıymetli çalışma arkadaşlarım Süleyman Can Öztürk ile Sıla Ulutürk'e,

Lise yıllarından beri her zaman olduğu gibi bu tez süresince de beni yalnız bırakmayarak tezimin gelişimine büyük katkıda bulunan Dr.Bariş Can Çimen'e,

Koşulsuz sevgi ve emeğin gücüyle bu yaşıma kadarki tüm başarılarımın asıl sebebi olan sevgili ailem, annem ve babam Ayla ve Mehmet Çakan'a,

Ailem olduklarını hissettiren, tez boyunca karşılaştığım sorunlarla dahi yakından ilgilenerek her zaman yanımda olan Serap ve Mustafa Ercan'a,

Tezimi ithaf ettiklerim, yaşam yolumu elele yürüdüğüm canım Dr.Fatih Ercan'a ve kardeşi söz konusu olduğunda gökyüzünü bile sınır olarak tanımayacağını bildiğim, bu kadar tatlı olacağını tahmin etmediğim immünolojik tartışmalarımızla ufkumu genişleten, hayatımın en sahii destekçisi canım MD-PhD. Elif Çakan'a,

COVID-19 pandemisinde kaybettiğimiz değerli meslektaşlarım ve beş yılımı paylaştığım asistan arkadaşlarıma,

Minnettarım.

Dr.Melike Çakan Ercan

ÖZET

Melike Çakan Ercan, Kuprizon Modelinde Periferal Nonspesifik Uyarılmış T Lenfosit Çalışması: Alternatif Bir Bakış, Multipl Skleroz, kronik demiyelinizan merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Patofizyolojisinde nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonun birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Ancak başlatıcı faktörün ne olduğu henüz aydınlatılamamıştır. Literatürde MS'in değişik yönlerini konu alan birçok deneysel hayvan modeli mevcuttur. Ancak bu modellerden hiçbiri MS'in patofizyolojisini tümüyle açıklayamamaktadır. Çalışmamızda, özgül olmayan bir uyarımla aktifleştirilmiş periferal T lenfositlerin MSS'deki demiyelinizasyona katkısını incelemek amacıyla basamaklı bir deney modeli oluşturulmuştur. Öncelikle sağlıklı farelerde yapılan biyodağılım çalışmalarıyla, aktifleştirilmiş T lenfositlerin MSS'e naif T lenfositlerden daha fazla göç edebildiği ve lenfositlerin elde edildiği lenfoid organın bu göçte etkili olmadığı saptanmıştır. Kuprizonlu toksik demiyelinizasyonun indüklendiği farelerde yapılan biyodağılım çalışmalarında, oligodendrosit hasarı gibi nörodejenerasyon ve lokal inflamasyon oluşturabilecek durumda hem naif hem aktif T lenfositlerin MSS'e yöneliminin arttığı gösterilmiştir. Deneysel aktivasyonun organlara yöneliminin arttığı ve bu artışın omurilik ve beyin için belirgin olduğu gösterilmiştir. toksik demiyelinizasyona sahip fare grubunda da kuprizonlu toksik demiyelinizasyona T lenfosit enjeksiyonu eklenmiş ve böylece çift indüksiyon sağlanmış fare grubunda da senesyal otoimmün ensefalomyelit DOE skorlarında belirgin artış görülmemiştir. Bu nedenle nörolojik fonksiyonel kötüleşmeyi tespit etmek için yapılan davranış deneylerinde çift indüksiyon uygulanan farelerde ve kuprizonlu farelerde kontrole göre lokomasyonda kötüleşme, allodini ve artmış anksiyete semptomları olduğu kanıtlanmıştır. Histopatolojik çalışmalarda kuprizonun tek başına uygulandığında yaygın demiyelinizasyona ve mikroglia aktivasyonu ile sayısında artışa yol açabildiği tespit edilmiştir. Bu etkiler, T lenfosit enjeksiyonunun deneye dahil edilmesi ile birlikte daha belirgin hale gelmiştir. Çalışmamızda, özgül olmayan bir uyarımla aktifleştirilen periferal T lenfositlerin MSS'deki demiyelinizasyona histopatolojik ve klinik düzeyde katkı sağladığı kanıtlanmıştır. Ayrıca önerilen modelde lokal inflamasyonun ve nörodejenerasyonun baskın olması nedeniyle progresif MS modellerine bir alternatif sunabileceği düşünülmüştür.

ABSTRACT

Melike Çakan Ercan, Study on Peripheral Non-specific Stimulated T Lymphocytes in the Cuprizone Model: An Alternative Perspective. Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the CNS, involving neuroinflammation and neurodegeneration. The initiating factor remains unclear. Various experimental animal models address aspects of MS, but none fully elucidate its pathophysiology. Our study investigates the role of non-specifically activated peripheral T lymphocytes in CNS demyelination using a stepwise experimental model. Biodistribution studies in healthy mice showed that activated T lymphocytes migrate to the CNS more efficiently than naive T lymphocytes, regardless of the lymphoid origin. In mice with cuprizone-induced toxic demyelination, both naive and activated T lymphocytes exhibited increased CNS migration, likely due to neurodegeneration and local inflammation. Activation enhanced organ-specific migration, notably affecting the CNS. In the toxic demyelination group, adding T lymphocyte injection to cuprizone-induced demyelination created a double induction model. Despite this, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) scores did not significantly increase. Behavioral experiments revealed worsened locomotion, allodynia, and increased anxiety symptoms in both double induction and cuprizone-only groups compared to controls. Histopathological studies found that cuprizone alone caused widespread demyelination and increased microglia activation and numbers, which were more pronounced with T lymphocyte injection. Our study shows that non-specifically stimulated peripheral T lymphocytes contribute to CNS demyelination at both histopathological and clinical levels. The model, highlighting local inflammation and neurodegeneration, may offer an alternative to progressive MS models.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
TABLO DİZİNİ	XVIII
1. GİRİŞ:	1
2. GENEL BİLGİLER:	4
2.1. MULTIPL SKLEROZ (MS):	4
2.1.1. MULTIPL SKLEROZ KISA TARİHÇESİ:	4
2.1.2. MULTIPL SKLEROZUN EPIDEMİYOLOJİSİ VE RISK FAKTÖRLERİ:	5
2.1.3. MULTIPL SKLEROZ SEMPTOMATOLOJİSİ:	6
2.1.4. MULTIPL SKLEROZUN KLİNİK FENOTİPLERİ:	7
2.1.5. MULTIPL SKLEROZ TEŞHİSİ	10
2.1.6. MULTIPL SKLEROZ HASTALARINDA KLİNİK ÖLÇEKLER:	16
2.1.7. MS TEDAVİLERİ	18
2.2. MULTIPL SKLEROZ PATOFİZYOLOJİSİ:	26
2.2.1. MIYELİN KILIFIN YAPISI:	26
2.2.2. BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ VE MSS İLİŞKİSİ:	29
2.2.3. MSS'İN BARIYERLERİ:	30
2.2.4. MENİNGEAL İMMÜNİTE VE İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİ:	34
2.2.5. MSS'E T-LENFOSİT GÖÇÜ:	36
2.2.6. MS PATOFİZYOLOJİSİNDE ÖZGÜL OLMAYAN T LENFOSİT CEVABININ YERİ:	40
2.3. DENEYSEL MULTIPL SKLEROZ MODELLERİ:	41
2.4. TOKSİK DEMİYELİNİZASYONUN TARİHİ VE KUPRIZON MODELİ GELİŞİMİ	45
2.4.1. BEYİN ÖDEMI İLE İLGİLİ TOKSİKOLOJİ DENEYLERİ:	45
2.4.2. KUPRIZON MODELİNİN EVRİMİ:	48
2.4.3. KUPRIZON MODELİNİN ETKİ MEKANİZMASI:	53
2.4.4. KUPRIZON MODELİ VE DENEY HAYVANLARI	54
2.5. MODERN KUPRIZON MODELİ	55
3. KAPSAM VE AMAC:	57

4. MATERYAL VE YÖNTEM:	59
4.1. KULLANILAN MATERYALLER:	59
4.2. KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER:	60
4.3. DENEY HAYVANLARI:	60
4.4. DENEY PROTOKOLÜ VE GRUPLARI:	61
4.5. KUPRIZONLU YEM UYGULAMA:	68
4.6. İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER:	70
4.6.1. NAİF T-LENFOSİT ELDESİ	70
4.6.2. AKTİF T-LENFOSİT ELDESİ VE ENJEKSİYONU	72
4.6.3. T-LENFOSİTLERİN DİĞER HÜCRELERDEN AYRILMASI:	76
4.6.4. HÜCRELERİN PROLİFERASYON VE FENOTİP DEĞERLENDİRMESİ:	80
4.7. HÜCRE SAYIMI:	80
4-14. <i>Ex vivo</i> GÖRÜNTÜLEME İLE T LENFOSİT DAĞILIMININ İNCELENMESİ	81
4.8. DENEYSEL OTOİMMÜN ENSEFALOMİYELIT (DOE) SKORU:	84
4.9. DAVRANIŞ DENEYLERİ:	86
4.9.1. AÇIK ALAN ARENA TESTİ:	86
4.9.2. VON FREY FİLAMANI TESTİ:	87
4.9.3. YÜKSELTİLMİŞ ARTI LABİRENT TESTİ:	88
4.10. HISTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME:	89
4.10.1. DOKU TOPLAMA:	89
4.10.2. DOKU TAKIBI VE KESİT HAZIRLIĞI	91
4.10.3. HISTOPATOLOJİK BOYAMA VE DEĞERLENDİRME:	92
4.11. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM:	96
5. BULGULAR:	97
5.1. KUPRIZONLU DİYETİN GENEL KLİNİK VE HISTOPATOLOJİK ETKİLERİ	97
5.1.1. VÜCUT AĞIRLIĞI VE SİSTEMİK ETKİLENME:	97
5.1.2. DENEYSEL OTOİMMÜN ENSEFALOMİYELIT SKORU:	99
5.1.3. HISTOPATOLOJİK DÜZEYDE TOKSİK DEMİYELİNİZASYON	101
5.2. T LENFOSİT AKTİVASYON VE PROLİFERASYONUNUN İNDÜKSİYONU:	104
5.3. SAĞLIKLI FARELERDE T LENFOSİT BİYODAĞILIMI:	111
5.3.1. <i>EX-VIVO</i> GÖRÜNTÜLEME BULGULARI	111
5.3.2. AKİM SİTOMETRİ ANALİZLERİ	117

5.4. KUPRIZONLU DIYET ALAN FARELERDE T LENFOSİT BİYODAĞILIMI:	118
5.4.1. EX VIVO GÖRÜNTÜLEME BULGULARI:	118
5.4.2. AKIM SİTOMETRİ BULGULARI:	122
5.5. KUPRIZONLU TOKSİK DEMİYELİNİZASYON MODELİNDE T LENFOSİT BİYODAĞILIMININ SAĞLIKLI GRUPLA KARŞILAŞTIRILMASI:	123
5.5.1. EX-VIVO GÖRÜNTÜLEME BULGULARI:	124
5.5.2. AKIM SİTOMETRİ BULGULARI:	126
5.6. KUPRIZONLU TOKSİK DEMİYELİNİZASYON VE NONSPESİFİK OLARAK AKTİFLEŞTİRİLMİŞ PERİFERAL T LENFOSİT İNDÜKSİYONUyla OLUŞTURULAN YENİ MODELİN MULTİDİSİPLİNER YAKLAŞIMLA DEĞERLENDİRİLMESİ:	128
5.6.1. DOE SKORU İLE DEĞERLENDİRME:	128
5.6.2. DAVRANIŞ DENEYLERİ:	129
5.6.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME:	135
5.6.4. DALAK AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ:	141
6. TARTIŞMA:	143
6.1. KUPRIZONLU TOKSİK DEMİYELİNİZASYON MODELİNİN UYGULANMASI:	145
6.2. KUPRIZONUN SİSTEMİK ETKİLERİ:	147
6.3. KUPRIZONUN HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİ:	148
6.4. BİYODAĞILIM ÇALIŞMALARI:	150
6.5. T LENFOSİTLERİN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNE GÖÇÜ:	151
6.6. KUPRIZON TOKSİSİTESİ VE NONSPESİFİK T LENFOSİT ENJEKSİYONUNUN HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİ: MODELİN HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ	153
6.7. DAVRANIŞ DENEYLERİ:	154
7. KAYNAKLAR:	157

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

9HPT	- Dokuz Delikli PEG Testi
ACTH	- Adrenokortikotropik Hormon
APC	- Allophycoyanin
ASH	- Antijen Sunan Hücre
AIC	- Akaike Information Criterion (Akaike Bilgi Kriteri)
AICC	- Akaike Information Criterion Correction (Düzeltilmiş Akaike Kriteri)
ANOVA	- Analysis of Variance (Varyansların Analizi)
AQP4	- Akuaporin 4
BOS	- Beyin Omurilik Sıvısı
BİUP	- Beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyelleri
BG-12	- Dimetil Fumarat
BIC	- Bayesian Information Criterion (Bayesian Bilgi Kriteri)
BOND-MAX	- Otomatik İmmünohistokimya Boyama Sistemi
BOS	- Beyin Omurilik Sıvısı
BSA	- Bovine Serum Albumin
CCL19	- Chemokine (C-C motif) ligand 19
CCL21	- Chemokine (C-C motif) ligand 21
CCR10	- Chemokine (C-C motif) receptor 10
CCL27	- Chemokine (C-C motif) ligand 27
CCR20	- Chemokine (C-C motif) receptor 20
CCR4	- Chemokine (C-C motif) receptor 4
CLA	- Cutaneous Lymphocyte Antigen
CCL17	- Chemokine (C-C motif) ligand 17

CCR6	- Chemokine (C-C motif) receptor 6
CCR7	- Chemokine (C-C motif) receptor 7
CCR9	- Chemokine (C-C motif) receptor 9
CD	- Cluster of Differentiation
CFSE	- Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CI	- Confidence Interval (Güven Aralığı)
CMTPX	- CellTracker Orange CMTMR (Chloromethylbenzamido) dye
DAB	- Diaminobenzidin
DAPI	- 4',6-diamidino-2-fenilindol
DH	- Dentritik Hücre
DHK	- Distal Hipokampus
DMF	- Dimetil Fumarat
DOE	- Deneysel Oyoimmün Ensefalomyelit
DMSO	- Dimetilsülfoksit
DNA	- Deoksiribonükleik Asit
DPX	- Dibutylphthalate Polystyrene Xylene
DS9800	- Anti-Fade Mounting Medium
DTR	- Difterotoksin Reseptörü
EDSS	- Genişletilmiş Özürlülük Durumu Skalası
EDTA	- Etilendiamin Tetraasetik Asit
EBV	- Epstein-Barr Virüsü
EM	- Elektron Mikroskopi
FACS	- Floresan Aktif Hücre Ayırma
FBS	- Fetal Bovine Serum

FDA	- Food and Drug Administration
FIT-C	- Fluorescein Isothiocyanate
FK-506	- Takrolimus
FLAIR	- Fluid-Attenuated Inversion Recovery
FOXP3	- Forkhead Box P3
FSC-A	- Forward Scatter Area (İleri Saçılım Alanı)
GATA3	- GATA Binding Protein 3
GFP	- Green Fluorescent Protein (Yeşil Floresan protein)
H&E	- Hematoxylin and Eosin
HÜDHAM	- Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi
ICAM-1	- İnterselüler Adezyon Molekülü-1
ICAM-2	- İnterselüler Adezyon Molekülü-2
ICAM-3	- Intercellular Adhesion Molecule 3
IF	- İmmünfloresan
IFN	- İnterferon
IL-17	- İnterlökin 17
IL-2	- İnterlökin 2
IL-4	- İnterlökin 4
IL-5	- İnterlökin 5
KBB	- Kan-Beyin Bariyeri
KCFT	- Karaciğer Fonksiyon Testleri
KİS	- Klinik İzole Sendrom
LECAM-1	- Lenfosit Endotelyal Hücre Adezyon Molekülü-1
LFA-1	- Lenfosit fonksiyonu ilişkili antijen 1

LY6G	- Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus G
MACS	-Magnetic-Activated Cell Sorting (Manyetik Aktivasyonlu Ayırma)
MAG	- Myelin-Associated Glycoprotein (Miyelin İlişkili Glikoprotein)
MBP	- Myelin Basic Protein (Temel miyelin proteini)
MHC	- Major Histocompatibility Complex
MKR	- Melanokortin reseptör
MKR3	- MicroRNA 3
MOG	- Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MRG	- Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	- Multipl Skleroz
MSKT	- Multipl Skleroz Kompozit Fonksiyon Testi
MSS	- Merkezi Sinir Sistemi
N20	- N20 Wave Component
N25	- N25 Wave Component
NEDA	- No Evidence of Disease Activity
OCT	- Hücre medyumunu
OFY	- Ortalama Floresan Yoğunluğu
OKB	- Oligoklonal Band
OKT	- Optik Koherens Tomography
ON	- Optik Nörit
OPERA	- MS-Okrelizumab Çalışması
ORATORIO	- Multiple Skleroz Tedavi Çalışması
P100	- Vizüel Uyarılmış Potansiyel komponenti
P40	- Protein 40

PAS	- Periodic Acid-Schiff
PASAT	- Paced Auditory Serial Addition Test
PAX5	- Paired Box Protein 5
PCR	- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD-1	- Programmed Cell Death Protein 1
PBS	- Phosphate Buffered Saline
PHK	- Proksimal Hipokampus
PLN	- Periferik lenf düğümü
PLP	- Proteolipid Protein
PML	- Progresif Multifokal Lökoensefalopati
PPMS	- Primer Progresif Multipl Skleroz
PSS	- Periferik Sinir Sistemi
RIS	- Radyolojik İzole Sendrom
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute Medium
RRMS	- Relapsing Remitting Multipl Skleroz
SAB	- Subaraknoid Boşluk
SD	- Standard Deviyasyon
SE	- Standard Hata
SPMS	- Sekonder Progresif Multipl Scleroz
SPSS	- Statistical Package for the Social Sciences
SSC-A	- Side Scatter Area (Yana saçılım alanı)
SWI	- Susceptibility Weighted Imaging
T25FW	- Timed 25-Foot Walk Test
TH	- T Helper Cell (Yardımcı T lenfosit)

TH17	- T Helper Cell 17 (Yardımcı T lenfosit-17)
TMEV	- Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus
VCAM1	- Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1
VIL-2	- Vasküler İnterlökin-2
YEV	- Yüksek Endotelyal Venül
İHK	- İmmünohistokimya

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2-1. Multipl Sklerozun Klinik Seyri

Şekil 2-2. 1996'dan 2013'e Klinik MS Tanımı ve Fenotip Sınıflamasında Değişenler

Şekil 2-3. Multipl Skleroz Teşhisinde Kullanılan Elektrofizyolojik Testler

Şekil 2-4. Multipl Skleroz Tedavi Stratejileri

Şekil 2-5. Merkezi Sinir Sisteminde Miyeline Ait İnce Yapıyı Gösteren Kompozit Diyagram

Şekil 2-6. Oligodendrosit ve Schwann Hücresi Plazmalemmaları ve Miyelin Konfigürasyonu

Şekil 2-7. Beynin Bariyerleri

Şekil 2-8. Merkezi Sinir Sistemi Bariyerleri

Şekil 2-9. Koroid Pleksus Kesiti

Şekil 2-10. T Lenfositler ve Çeşitli Organlara Göçlerinde Görevli Reseptörler

Şekil 2-11. Bis(cikloheksanon oksalihidrazon)

Şekil 4-1. Çalışmanın Genel Akış Şeması

Şekil 4-2. Kuprizonla İndüklenmiş Toksik Demiyelinizasyonun Değerlendirilmesi

Şekil 4-3. Naif ve Aktif T lenfositlerin Sağlıklı Farelerdeki Biyodağılım Çalışmaları

Şekil 4-4. Oluşturulan Modelin Klinik ve Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Şekil 4-5. %0,2 Kuprizon İçeren Pelletler

Şekil 4-6. Lenf Nodu ve Dalak Diseksiyonu

Şekil 4-7. Ficol Çözeltisi ile Kan Hücrelerinden Lenfomononükleer Hücrelerin Ayrılması

Şekil 4-8. Aktif T Lenfosit Eldesi

Şekil 4-9. MACS Kiti

Şekil 4-10. Akım Sitometri Prensibi

Şekil 4-11. Kapılama Stratejileri

- Şekil 4-12.** MACS Etkinliğini Değerlendiren Akım Sitometri Çalışması
- Şekil 4-13.** Bağışıklık Sistemi Hücrelerinde Yüzey Molekülleri
- Şekil 4-14.** Proliferasyon Değerlendirilmesinde Kapılama Protokolü
- Şekil 4-15.** Thoma Laminin Şematik Görseli
- Şekil 4-16.** Biyodağılım Çalışmalarında Ex Vivo Görüntüleme
- Şekil 4-17.** Açık Alan Arena Testi
- Şekil 4-18.** Von Frey Filamanı Testi
- Şekil 4-19.** Diseksiyon Sonrasında Organlar
- Şekil 4-20.** Fiksasyon Yapılmış Omurilik ve Beyin
- Şekil 4-21.** Beyin Kesit Hazırlığı
- Şekil 4-22.** İmmünohistokimya ile Boyanmış Beyin Kesitlerinde İncelenen Alanlar
- Şekil 5-1.** Fare Kütlelerinin Zamana Göre Değişimi
- Şekil 5-2.** Kuprizonun Sistemik Yan Etkileri-İnspeksiyon Bulguları
- Şekil 5-3.** Grupların DOE Skorunun Zamansal Değişimi
- Şekil 5-4.** İmmüno Floresan Görüntülemeye DAPI ve MBP Boyanma Yüzdeleri
- Şekil 5-5.** Kuprizon İle İndüklenen Demiyelinizasyonun İmmüno Floresan Görüntüleme Bulguları.
- Şekil-5-6.** Nonspesifik Aktif T Lenfosit Eldesinde Optimizasyon Deney Planı
- Şekil 5-7.** Dalak Ve Lenf Nodundan Toplanan T Lenfositlerde CD25, CD69 Ve CD44 İfadelerinin Ortalama Floresan Yoğunluk (OFY) Cinsinden Zamanla Değişimi
- Şekil 5-8.** Dalak Ve Lenf Nodundan Toplanan T Lenfositlerde CD25, CD69 Ve CD44 İfadelerinin Yüzde (%) Cinsinden Zamanla Değişimi
- Şekil 5-9.** Dalak Ve Lenf Nodu Kökenli T Hücrelerinde Uyarılma Durumunun Akım Sitometri Kullanılarak Değerlendirilmesi
- Şekil 5-10.** Sağlıklı Kontrol Grubunda T Lenfosit Biyoğalımı
- Şekil 5-11.** Sağlıklı Farelerde Naif Ve Aktif T Lenfosit Biyodağılımı

- Şekil 5-12.** Sağlıklı Farelerde MSS ve Lenfoid Organlara Lenfosit Biyodağılımı
- Şekil 5-13.** Farklı Kaynaklardan Elde Edilmiş Aktif Ve Naif T Lenfositlerin Farklı Organlarda Akım Sitometri ile Ölçülmesi
- Şekil 5-14.** Kuprizonlu Toksik Demiyelinizasyona Sahip Farelerde T Lenfosit Biyodağılımı-Ex vivo Görüntüleme
- Şekil 5-15.** Kuprizonlu Yem İle Beslenen Farelerde Naif T Lenfositlerin Ve Aktifleşmiş T Lenfositlerin -Ex Vivo Görüntüleme Analizi
- Şekil 5-16.** Kuprizonlu Hayvanlarda Farklı Organlarda Aktif T Lenfosit Ve Naif T Lenfosit Dağılımı
- Şekil 5-17.** Sağlıklı Fareler Ve Kuprizonlu Yem ile Beslenen Farelerin Beyinlerinde T Lenfosit Biyodağılımı-Ex Vivo Görüntüleme Bulguları
- Şekil 5-18.** Fare Beyninden APC+ T Lenfositlerin Kapılama Stratejisi
- Şekil 5-19.** Sağlıklı Fareler Ve Kuprizonlu Yem İle Beslenen Farelerin Beyinlerinde T Lenfosit Biyodağılımı-Akım Sitometri Bulguları
- Şekil 5-20.** Farklı Gruplardaki Farelerin DOE Skorlarının Karşılaştırılması
- Şekil 5-21.** Açık Alan Arena Testi Sonuçları
- Şekil 5-22.** Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçları
- Şekil 5-23.** Von Frey Filamanı Testi Sonuçları
- Şekil 5-24.** Beyin ve Omurilik Kesitleri
- Şekil 5-25.** Kuprizon Diyeti Alan Farelerde Vakuol Formasyonları
- Şekil 5-26.** Farklı Deney Gruplarında Demiyelinizasyon
- Şekil 5-27.** Farklı Beyin Bölgelerinde Mikroglia Yoğunluklarının Gruplar Arasında Karşılaştırılması
- Şekil 5-28.** Farklı Deney Gruplarında Dalak ve Lenf Nodu Büyüklükleri
- Şekil 5-29.** Farklı Deney Gruplarında Dalak Ağırlıklarının Karşılaştırılması

TABLO DİZİNİ

Tablo 2-1. Ataklarla Seyreden Ms Tanı Kriterleri	12
Tablo 2-2. Primer Progresif Ms Tanı Kriterleri	12
Tablo 2-3. Tedaviye Yanıtsızlık Konusunda Kaygı Derecesi (Neda-3)	20
Tablo 2-4. Beyin İmmün Arayüzleri Ve İmmün Hücre İçerikleri	35
Tablo 2-5. Beyinde Ödemin Tanımlandığı Hastalıklar	45
Tablo 4-1. Çalışmada Kullanılan Antikorlar	59
Tablo 4-2. Deney Grupları Ve Uygulamalar	67
Tablo 4-3. Kuprizonlu Yem İçeriği	69
Tablo 4-4. Doe Skorum Tablosu	84
Tablo 4-5. Hücre Artışı Ve Demiyelinizasyon İçin Kullanılan Skorum Sistemi	94
Tablo 5-1. Kuprizonla Beslenme Ve Zaman Faktörlerinin Kütle Üzerine Etkisi	98
Tablo 5-2. Sağlıklı Farelerde Naif Ve Aktif T Lenfosit Biyodağılımı	114

1. GİRİŞ:

Multipl Skleroz (MS), merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde kronik inflamatuvar ve demiyelinizan etkileri olan ciddi bir hastalıktır. Dünya çapında, özellikle genç ve orta yaş grubundaki yaklaşık 2,5 milyon insanı etkilediği bilinmektedir. Bu hastalık motor fonksiyonlarda kayıplara neden olurken, zaman içinde bilişsel fonksiyonlarda düşüş, depresyon, anksiyete, yorgunluk, ağrı ve duyuşsal sorunlar gibi çeşitli semptomları da beraberinde getirmektedir. [1]. Hastalık seyri bireyler arasında farklılık gösterir. Üç temel klinik fenotip tanımlanmıştır: 1) Relaps ve remisyonla seyreden multipl skleroz (RRMS), 2) primer progresif multipl skleroz (PPMS) ve 3) sekonder progresif multipl skleroz (SPMS). MS hastalarının yaklaşık %85'i RRMS olarak tanı almakta fakat bu hastaların yaklaşık %50'si hastalığın seyri sırasında progresif MS komponentleri geliştirerek SPMS'e dönüşmektedir. MS hastalarının geriye kalan yaklaşık %15'lik kesimi ise klinik tanı anında progresif seyir göstermekte ve PPMS olarak tanı almaktadır [2].

Hastalık patogeneğinde temel olarak otoimmün süreçler sonucunda ortaya çıkan inflamasyon yer alır. Ancak bu süreçlerin başlangıç noktası ile ilgili iki farklı görüş vardır. 'İnside-outside' hipotezi, inflamasyonun MSS'nin kendisindeki bir hasarla tetiklendiğini savunurken 'outside-inside' hipotezi, periferal immün sistemdeki aktivasyonun santrale göç ederek hastalığı başlattığını savunur. Bunların yanında aksonal yıkımın ön planda olduğu ve pek çok mekanizmanın beraberce tetiklediği nörodejenerasyon da patogeneşte yer almaktadır. Klinik yaklaşım progresif seyir ve ataklı seyri birbirinden ayrı ele almış olsa da, bu iki hasar mekanizmasının hastalığın başlangıcından itibaren farklı oranlarda beraber bulunduğu hem klinik hem patolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Günümüzde bilinmektedir ki, periferik immün sistemin dahil olduğu güçlü inflamasyon atakların ortaya çıkmasına neden olur. Daha küçük ölçekte lokal bir inflamasyon ve beraberinde ortaya çıkan nörodejenerasyon progresif kötüleşme ile sonuçlanır [3]. Bu patolojik mekanizmalar sonucunda ortaya çıkan plaklar hem beyaz cevherde hem de gri cevherde görülebilir.

MSS demiyelinizasyonu üzerine derinlemesine anlayış kazanmak ve yeni terapötik stratejiler geliştirmek amacıyla çeşitli mekanizmalara dayanan bir dizi deneysel hayvan modeli kullanılmaktadır. Bu modellerin prototipi deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) olup miyelin yapısında bulunan Miyelin-oligoglikoprotein'e (MOG) karşı immün aktivitenin tetiklenmesi ile oluşturulur. Kuprizon ile indüklenen toksik demiyelinizasyon modeli ise, immünolojik olarak tetiklenen demiyelinizasyon modellerine önemli bir alternatiftir. Bu model yaygın olarak MSS demiyelinizan /dejeneratif hastalıklarının patofizyolojilerinin aydınlatılmasında ve remiyelinizasyon süreçlerinin gözlenmesi amacıyla kullanılır. Bunun yanında, MS hastalığında esas patolojik sürecin merkezi sinir sisteminin kendisinden başladığını savunan "inside out" teorisinin en iyi çalışılabildiği model kuprizon modelidir. Ayrıca uzun süreli uygulamalarında kronik demiyelinizasyonun görüldüğü bildirilmiştir.

MSS'deki antijenlere karşı uyarılmış T lenfositlerin ve son zamanlarda önemi daha iyi anlaşılmış B lenfositlerin MS'le sonuçlanacak inflamasyonun temel sorumluları olduğu bilinmektedir. Genetik ve epigenetik olarak her yönüyle demiyelinizan hastalık geliştirmeye aday bir organizmada periferik immün sistemin herhangi bir sebeple (aşı, viral hastalık gibi) indüksiyonu hastalığı ateşleyen sebep olabilir ve bu sürecin MSS'deki etkisini ortaya koyan bir deneysel model bulunmamaktadır.

Bu çalışmadaki **hipotezlerimiz** şu şekildedir:

1. Kuprizon C57/BL6 farelerde toksik etki ile demiyelinizasyon oluşturur ve kan beyin bariyerini açar. Bu yolla kuprizon, hem MSS'de lokal inflamasyonu uyarır hem de MSS'ni periferik immün sistem etkisine açık hale getirir. Kuprizon en az sekiz hafta uygulandığında C57/BL6 farelerde MS'in progresif fazını taklit edebilecek histopatolojik ve klinik değişiklikler görülür.
2. Sağlıklı C57/BL6 farelerde, *in vitro* uyarılmış ve kuyruk veninden enjekte edilmiş T hücrelerin MSS'e yönelimi, naïve T hücrelere göre daha fazladır.
3. Periferik immün sistem bileşenlerinden olan T lenfositlerin nonspesifik yolla gerçekleşen aktivasyon ve proliferasyonu, kuprizona mağruz kalmış C57/BL6 fare beyinlerinde demiyelinizasyonu artırır; MS'in 'ataklı' fenotipine benzer klinik ve histopatolojik değişikliklere yol açar.

Bu çalışmadaki **amaçlarımız** şu şekildedir:

1. Literatürde çeşitli protokollerde uygulandığı görülen ‘kuprizon toksik demiyelinizasyon’ modelinin, en az sekiz hafta uygulama sonunda C57/BL6 farelerin merkezi sinir sistemindeki etkisini klinik, immünolojik ve histopatolojik yöntemlerle belirlemek
2. Kuprizonla indüklenmiş toksik demiyelinizasyona, antijen spesifik olmayacak şekilde *in vitro* aktif edilmiş T lenfositlerin etkisini klinik, immünolojik ve histopatolojik yöntemlerle ortaya koymak
3. Kuprizon ile indüklenen toksik demiyelinizasyon modeline alternatif bir yaklaşım getirmek, daha fazla patofizyolojik mekanizmayı daha fizyolojik bir ortamda simüle edecek şekilde mevcut modeli yeniden yapılandırmak

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. Multipl Skleroz (MS):

Multipl Skleroz (MS), santral sinir sisteminin otoimmün, kronik bir inflamatuvar hastalığıdır. Sıklıkla genç kadınlarda görülen MS; görme, hareket kabiliyeti, denge gibi nörolojik fonksiyonlarda bozukluğa yol açar.

2.1.1. Multipl Skleroz Kısa Tarihçesi:

Prof. Dr. Murray'in kitabında mistik bir tutumla bahsedilen, Hollanda'nın Schiedam şehrinde yaşayan Bakire Lidwina (1380-1433) MS benzeri semptomlar geliştirdiği belgelenen ilk vakadır. Ayrıca, Sussex Prensi Augustus'un oğlu, yaşadığı MS benzeri semptomları günlüğüne kaydeden, 28 yaşında başlayan görme kaybı ve paraparezi semptomları ile tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelen Augustus d'Este (1794-1848), MS teşhisi konulabilen ilk vaka olarak kabul edilir[4-6]. Dr. Robert Carswell (1793-1857) tarafından nöral aksta atrofi, Jean Cruveilhier (1791-1873) tarafından çoklu küçülmüş ve solmuş odaklara neden olan hastalık şeklinde tarif edilse de[7], Multipl Skleroz'un ilk klinik tanımlaması 1868'de Dr.Charcot tarafından yapılmıştır ve bu hastalığa (sclérose en plaque disseminée) ait dizatri, ataksi ve tremor bulguları Charcot triadı olarak isimlendirilmiştir[8]. Takip eden 20 yılda lomber ponksiyon tekniği keşfedilmiş; optik nörit ve transvers miyelit ataklarıyla gelen hastaların olgu raporları sunulmuştur. Kognitif semptomlar 1800lerden itibaren gözlenmesine rağmen MS'e atfedilmeleri 1900lerin başında gerçekleşmiştir[6]. O dönemde önerilen etiolojiler genetik bozukluk, toksik veya infektif mağruziyet şeklindedir. Dr. Golgi ve Dr. Cajal'ın boyanmış hücreleri mikroskop altında görüntüleyebilmesinin ardından 1916'de Dr. James Dawson Patoloji çalışmalarıyla MS plaklarında perivasküler inflamasyon ve hasarlanmış miyelinin yer aldığını göstermiştir[9]. 20. Yüzyılın üçüncü dekadında, deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) modellemeleri ile, insanlarda görülen patolojinin farklı hayvan türlerinde taklit etme çabası ortaya çıkmıştır[10].

Tedavide 'sıcaktan kaçınma' önerilen ilk yöntem olmuştur. Strisin ve gümüş nitrat, tremoru geçici olarak azaltmak için; hidroterapi ise kas spazmlarını ve kontraktürleri tedavi etmek için kullanılmıştır. Arsenik, belladonna, çavdar ergotu ve

potasyum bromür, faradizasyon ve galvanizm denenmiş ancak tedavide etkisi gösterilememiş yöntemlerdir[11]. MS'te kortizon tedavisi ilk kez 1951'de, interferon 1977'de kullanılmıştır. Patofizyoloji çalışmalarının ışığında otuz yıl içinde farklı yollardan uygulanabilen ve farklı mekanizmalar üzerinden etkili uzun dönem immün modülatör ilaçlar piyasaya sürülmüştür[11].

2.1.2. Multipl Sklerozun Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri:

MS, genç erişkinlerde özürüllüğe yol açan travmatik olmayan sebeplerinin başında gelir. Dünya genelinde yaklaşık 2,5 milyon insanı etkileyen MS, 2010 yılı verilrine göre Avrupa'da yaklaşık 14,6 milyon euro ekonomik maliyete yol açmıştır[12]. Artan insidans ile birlikte getirdiği sosyoekonomik yük de artış göstermektedir. Bebo ve ark. 2022 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde MS'in total maliyetinin yaklaşık 89 milyon dolar olduğunu göstermiştir [13].

MS prevelansı Asya ülkelerinde tespit edilen $\sim 2/100,000$ 'den, Avrupa'da $\sim 1/1000$ ve hatta yüksek enlemlerde $\sim 1/400$ 'e kadar değişiklik göstermektedir. Sigara, gençlik döneminde obezite ve güneş ışığı mağruziyetinin dolaylı etkisi olarak vitamin-D seviyeleri gibi birçok çevresel faktörün bunda etkili olduğu düşünülmektedir.

MS'nin immün aracılı patogenezi nedeniyle, enfeksiyon hastalıkları hastalığın başlangıcını tetikleyebilecek olası nedenler olarak araştırılmış ve MS hastalarının %100'üne yakınında EBV antikorları saptanması nedeniyle EBV, MS risk faktörü olarak değerlendirilmiştir [14]. EBV'nin, B hücrelerini enfekte ederek aktivitelerini modüle etme ve moleküler taklit mekanizması ile çapraz reaktif T hücre oluşumunu uyarma mekanizmaları ile MS'i tetikleyebileceği önerilmiştir [15, 16].

Tüm MS fenotipleri için ailesel MS prevelansı yaklaşık %13'tür. Yaş etkisi benzer kabul edilerek değerlendirme yapıldığında monozigotik ikizlerden biri MS olduğunda diğesinde de olma riski %35 iken bu oran dizigotik ikizlik durumunda %6 ve ikiz olmayan kardeşlik durumunda %3 bulunmuştur. Tespit edilmiş riskli genetik varyantların çoğu, bağışıklık sisteminde yer alan molekülleri kodlar (örneğin, 6. kromozom üzerindeki HLA genleri, HLA-DRB115:01 polimorfizmleri ve IL2 ve IL7R'deki polimorfizmler). En yüksek risk, HLA I ve HLA II gruplarındaki genlerle ilişkilidir. Ayrıca genetik polimorfizmlerin hasta üzerindeki etkisi, çevresel şartlarla modifiye olabilmektedir [17].

2.1.3. Multipl Skleroz Semptomatolojisi:

MS semptomları heterojen olup beynin etkilenen bölgesine bağılı olarak değişir. MS'te klinik bir atak veya nüks, ateş veya enfeksiyon gibi kötüleştiren bir sebep yokluğunda semptomların akut veya subakut olarak geliştiiği ve en az 24 saat boyunca devam ettiği durum olarak tanımlanır [18]. Klinik atağa bağılı semptomlar, günler ve haftalar boyunca progresif şekilde artar; maksimum defisit genellikle ikinci haftada ortaya çıkar ve takip eden yaklaşık 2-3 haftalık dönem içerisinde, rezidüel özürllük bırakarak veya tam remisyon ile iyileşir. Yirmi dört saatten kısa, genelde saniyeler veya dakikalarca süren ve geçen ağrı, konuşma bozukluğu, bulanık görme ile duyuşal değişiklikler 'geçici nörolojik defisit' olarak isimlendirilir. Geçici nörolojik defisitler MS atağı veya epileptik nöbetler ile karışabilmektedir [19].

MS hastalarında başlangıç semptomu olarak yaklaşık %30-40 oranında motor semptomlar görülür. Motor semptomlar arasında piramidal bulgular, parezi, paralizisi ve spastisite yer alır ve kısmi miyelit ya da serebral lezyonlardan kaynaklanabilir. Üriner inkontinans, birinci motor nöron tutulumuna bağılı yaygın mesane disfonksiyonunun en bilinen göstergesidir Progresif simetrik spastik paraparezi, duyuşal ataksi, tüm duyuşal modaliteler için seviye veren muayene bulgusu, segmental ağrı ve sıcaklık duyuşu kaybı, arefleksi, akut üriner retansiyon ise MS açısından atipik semptomlardır [20].

Optik nörit (ON), MS'in en yaygın başlangıç semptomları arasında yer alır. ON, ilk atakta %10-20 oranında görülür ve bu hastaların %34-75'inin 15 yıl içinde MS tanısı aldığı bildirilmiştir. ON atağı geçiren hastaların %10-20'sinde uzun vadede MS gelişmektedir. MS hastalarının %50-70'i ise hastalık başlangıcından sonra en az bir kez ON atağı geçirir [21]. ON geçiren hastalarda görme keskinliği ile renkli görme bozulur, santral skotom gelişir. Beraberinde göz hareketli ile ortaya çıkan ağrı görülür. Bilateral, periferal veya altitudinal görme alanı kaybı, ağrısız optik nörit, ciddi optik disk ödemi, fotofobi, retinal hemoraji ve eksuda, MS açısından atipiktir.

MS hastalarında duyuşal semptomlar hastaların %43'ünde görülür ve genellikle miyelit veya beyin sapı sendromu kaynaklıdır. Bu semptomlar; yüzeysel (parestezi hipoestezi, dizestezi) ya da derin duyu (vibrasyon ve pozisyon duyuşlarında kayıp) bozuklukları veya nöropatik ağrı (ağrılı soğuk hissi, keğelenme, kaşınma gibi),

trigeminal nevralji, viseral ağrı şeklinde tezahür edebilir. Lhermitte işareti, boynun fleksiyonu ile omurga boyunca veya ekstremitelere doğru yayılan geçici elektrik çarpması hissi olarak tanımlanır. Ayrıca, vücut ısısındaki artış ile semptomlarda kötüleşmeyi ifade eden Uhthoff fenomeni de gözlemlenebilir [22].

Beyin sapı ve serebellar semptomlar ise MS hastalarının %70'inde nistagmus, osilopsi, diplopi, ataksi, dismetri veya disfaji şeklinde ortaya çıkar. Vasküler sulama alanlarına ait semptomlar, izole trigeminal nevralji, dalgalanma gösteren okular veya bulber kuvvetsizlik, ateş ve ensefalopati, epileptik nöbet ile kortikal körlük MS için tipik değildir [23].

MS ile ilişkili diğer semptomlar arasında kognitif disfonksiyon (%40-70), yorgunluk (%95) ve anksiyete de bulunmaktadır [24]. MS hastalarında bilgi işleme hızında, yönetici fonksiyonlarda, epizodik hafızada ve dikkatte düşüş yaşanabilir. Kognitif etkilenim, KİS'ten MS'e geçişin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Hastaların yaklaşık üçte ikisinde duygudurum bozuklukları, özellikle de depresyon görülebilir.

Nörolojik muayenede bulunabilecek objektif bulgular arasında afferent pupil defekti, azalmış görme keskinliği ve renkli görme, hipoestezi, parestezi, dizestezi, parezi, paraliz, ataksi ve sıklıkla hiperrefleksi ile beraber yürüme bozukluğu yer alır.

2.1.4. Multipl Sklerozun Klinik Fenotipleri:

Multipl Sklerozun (MS) seyrine hem tekrarlayıcı ataklar hem de progresif kötüleşme katkıda bulunur[25, 26]. "Relaps" terimi, Zeydan ve Kantarci [27] tarafından, klinik olarak saatler veya günler içinde ortaya çıkan MSS ilişkili yeni nörolojik semptom veya bulguların yanı sıra, semptom göstermeksizin yeni manyetik rezonans görüntüleme (MRG) lezyonlarının tespit edilmesi şeklinde iki farklı durumu kapsayacak biçimde açıklanmaktadır. Aynı çalışmada "progresyon" kavramı, MS'e özgü patolojik bir özellik olan ve nörolojik işlevlerin geri dönüşsüz biçimde bozulmasına yol açan ilerleyici aksonal kaybı belirtmek için kullanılmaktadır. 1996'da Amerika Ulusal MS Topluluğu tarafından kabul edilen klinik fenotipler (**Şekil 2.1**), 4 grupta toplanmıştır: Görülen (klinik) hastalık aktivasyonunun sadece ataklardan ibaret olup atak dışında hastaların tamamen bazal fonksiyonel kapasitelerine döndüğü ya da her atakta kalan sekel ile yeni bir özrürlük kazandığı fenotip '**ataklarla seyreden**

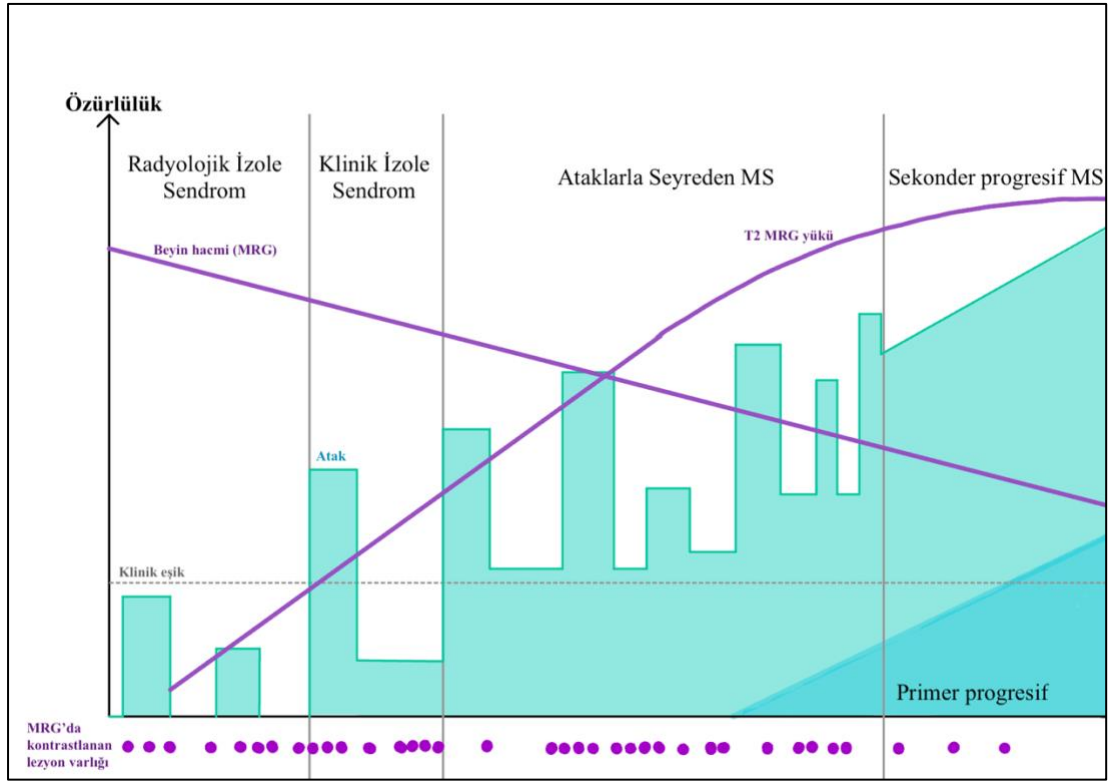
MS' (Relapsing Remitting MS-RRMS) olarak adlandırılır [2, 28-30]. MS'nin nükseden evreleri genellikle kan-beyin bariyerinin bozulması ve T ve B hücrelerinin infiltrasyonu ile ilişkilidir. RRMS'in geç döneminde hastaların %10-15'inde ataklar arasında da özür lülük durumunda yavaş bir kötüye gidiş görülebilir. Klinik atakların azalmasıyla birlikte Nörolojik fonksiyonlardaki ilerleyici bozulmanın artarak devam ettiği bu klinik fenotip '**Sekonder Progresif MS' (SPMS)** olarak adlandırılır[31]. **Primer Progresif MS (PPMS)** fenotipi, hastalığın başlangıcından itibaren semptomların lineer olarak kötüleşmesiyle karakterizedir[29]. Kan-beyin bariyerinin (KBB) görece sağlam olduğu, merkezi sinir sistemi (MSS)/beyin omurilik sıvısı (BOS) içindeki lokal mekanizmaların muhtemelen dejenerasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir[2, 28]. **Ataklarla seyreden progressif MS (Progresif Relapsing MS)**, diğer klinik fenotiplerle örtüşen özellikleri nedeniyle kullanımdan çıkarılmıştır.

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal MS Çalışma Grubu, 2013 yılında, MS Fenotipleriyle ilişkili sınıflamaya yönelik yapılan çalışmada, klinik resmin tanımlanmasında 'aktivasyon' ve 'progresyon' şeklindeki iki önemli faktörün rol oynadığı kararına varmıştır. Aktif hastalık, klinik atak varlığı, MRG'da kontrastlanan, yeni ortaya çıkan ya da büyüyen plak varlığı şeklinde tanımlanmıştır[32]. Bu nedenle hasta takibinde belirli aralıklarla beyin görüntülemeleri[33]nin tekrarlanması önerilmiştir. Progresyon varlığı, terim olarak Genişletilmiş MS Özür lülük Ölçeğindeki skorun takip eden muayenelerde kötüleşme eğiliminde olması şeklinde tanımlanmış[34] olup standardize görüntüleme kriterleri olmasa da, MRG'da lezyon yükünde, kara delik benzeri kronik plaklarda artış ve beyin hacim değişiklikleri progresyon lehine yorumlanmıştır. Bu doğrultuda, yeni sınıflamada **Şekil 2.2'de** ifade edilen terimler ortaya çıkmıştır.

Klinik İzole Sendrom (KİS), hastalığın ilk hastalık aktivasyonu olarak tanımlanmıştır. Zamanda yayılım kriterlerini karşılamasa da, hastanın semptomlarını açıklayan plakların MRG'da yer aldığı gösterilen KİS vakalarının büyük oranda MS'e evrildiği gösterilmiştir[35]. Bu nedenle 2013 revizyonunda MS hastalığının bir alt tipi olarak kabul edilmiştir.

KİS'ten daha karmaşık olarak Radyolojik İzole Sendrom (RİS), ilişkili semptomların eş zamanlı olarak görülmediği, başka sebeplerle çekilen MRG'lerde

demiyelinizan plakların tesadüfen saptandığı durumu açıklar. Ancak, boyu, yeri ve kontrastlanma özellikleri, bu plakların MS ile ne kadar ilişkili olduğuna işaret eder. MS’i yordayan lezyonların görüldüğü hastalar, izlemlerinde yüksek oranda MS tanısı almaktadır. Asemptomatik spinal kord lezyonlar, kontrastlanan demiyelinizan plakları olan ve/veya beyin omurilik sıvısından yapılan tetkiklerinde pozitiflik saptanan hastalar yakın takip edilmelidir.[36]



Şekil 2-2-1. MS'in Klinik seyri. (Bu şekil, 2018'de Baecher-Allan ve ark.'nın 'MS: Mekanizmalar ve İmmünterapi' isimli derlemesinden uyarlanmıştır [37].)

Bu sınıflama ile örtüştüğü düşünülen patofizyolojik yaklaşım, temelde atakları inflamasyon artışı, progresif kötüleşmeyi ise kronik süreçte eklenen nörodejenerasyon ile ilişkilendirmiştir. Ancak, RRMS ve PPMS'in birbirinden kesin sınırlarla ayrılamadığı bilinmektedir[37]. Patoloji çalışmaları da, PPMS, RRMS ve SPMS'li beyinlerde birbirleriyle benzer süreçlerin işlediğini göstermiştir[38]. Transgenik farelerde yapılan MSS demiyelinizasyon modelleme çalışmaları, peroksizom eksikliği, mitokondri disfonksiyonu veya proteolipid over-expresyonu gibi

bozuklukların oligodendrositleri haraplayarak nörodejeneratif bir süreçle özürlülük oluşturduğunu ve araya giren inflamasyonla bu özürlülükteki artışın hızlandığı dönemler olduğunu göstermiştir [39, 40]. Bu bulgular, MS'in belki de nörodejenerasyonla başlayan ve inflamasyon nedeniyle kötüleşen bir hastalık olduğu düşüncesine neden olmuştur.

2.1.5. Multipl Skleroz Teşhisi

MS, klinik kriterler ile konulabilen bir tanı olsa da çoğu zaman MRG bulguları da bu konuda belirgin katkı sağlamaktadır. Temel olarak '**mekanda yayılım**' ve '**zamanda yayılım**' kriterlerinin karşılanması gerekmektedir. 2017 McDonald's kriterlerine göre MS için karakteristik olduğu kabul edilen 4 anatomik lokasyondan (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoriyel, medulla spinalis) en az 2 tanesinde MS'e ait plakların görülmesi '**mekanda yayılım**' olarak nitelendirilir. Herhangi bir zamanda çekilen bir MRG'de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların beraber bulunması veya belirli aralıklarla çekilen iki farklı MRG'den ikincisinde yeni eklenen en az bir plak görülmesi '**zamanda yayılım**' olarak nitelendirilir. 2010 yılındaki kriterlerden farklı olarak plakların anlamlı kabul edilmeleri için semptomatik olmalarına gerek yoktur [41], [42]. Ataklarla seyreden MS ve Primer Progresif MS için tanı kriterleri sırasıyla **Tablo 2.1** ve **Tablo 2.2**'de belirtilmiştir.

1996 Klinik MS Tanımı ve MS Fenotipleri	2013 MS Kliniğini Tanımlamada Kullanılan Fenotipler
<p>PP</p> <p>Kötüleşmede geçici dönem görülen platoların görüldüğü, minör remisyon veya iyileşmelerle gidebilen, özürülüğün hastalık başından beri arttığı durum</p> <p>SP</p> <p>Erken dönemdeki ataklı seyrin ardından, minör remisyon veya iyileşmelerin görülebildiği ve özürülüğün giderek arttığı durum</p> <p>PR</p> <p>Özürülüğün ataklardan kalan sekellerle ve ataklar arasındaki kötüleşme dönemleriyle arttığı durum</p>	<p>Hastalığın başlangıcından itibaren, atak görülmeksizin, çzürlülüğün devamlı olarak arttığı durum</p> <p>PP</p> <p>Progresif Hastalık</p> <ul style="list-style-type: none"> Aktif, Progresyon Görülen Hastalık Aktif, Progresyon Görülmeyen Hastalık Aktif Olmayan Progresyon Görülen Hastalık Aktif Olmayan Progresyon Görülmeyen Hastalık <p>SP</p> <p>Hastalığın erken döneminde atakların görüldüğü, zamanla atakların azaldığı ancak süregelen bir özürülük artışının devam ettiği durum</p>

1996 Klinik MS Tanımı ve MS Fenotipleri	2013 MS Kliniğini Tanımlamada Kullanılan Fenotipler
<p>Atak ve Remisyonla Seyreden MS (RRMS)</p> <p>Ataklardan tamamen iyileşme</p> <p>Ataklardan kısmen iyileşme ve sekel bulgular</p>	<p>Klinik İzole Sendrom (KİS)</p> <p>Aktif değil</p> <p>Aktif</p> <p>Atak ve Remisyonla Seyreden MS (RRMS)</p> <p>Aktif değil</p> <p>Aktif</p>

Şekil 2-2-2. 1996'dan 2013'e Klinik MS Tanımı ve Fenotip Sınıflamasında değişenler. (Lublin et. al, 2014, Journal of Neurology'de yer alan 'MS'in Klinik seyrinin tanımlanması:2013 revizyonları derlemesinden uyarlanmıştır [41])

Tablo 2-1. Ataklarla Seyreden MS Tanı Kriterleri

Klinik Görünüm ve MRG	Ek kriter
En az 2 atak ve >2 lezyona ait objektif klinik bulgu	-
En az 2 atak ve 1 lezyona ait objektif klinik bulgu	MY*: Farklı bir MSS bölgesini işaret eden ek 1 klinik atak veya MRG lezyonu
1 klinik atak ve >2 lezyona ait objektif klinik bulgu	ZY:** Farklı bir MSS bölgesini işaret eden ek 1 klinik atak veya MRG lezyonu veya spesifik BOS OKB bulgusu
1 klinik atak ve 1 lezyona ait objektif klinik bulgu	MY: Farklı bir MSS bölgesini işaret eden ek 1 klinik atak veya MRG + ZY: Farklı bir MSS bölgesini işaret eden ek 1 klinik atak veya MRG veya spesifik BOS OKB bulgusu

*MY:Mekanda yayılım, **ZY: Zamanda yayılım

Tablo 2-2. Primer Progresif MS Tanı Kriterleri

Klinik ve MRG Özellikleri
Klinik relapstan bağımsız 1 yıl süreli hastalık özürülük progresyonu (prospektif veya retrospektif saptanabilir)
Ek olarak aşağıdakilerden ikisi: --MS için karakteristik anatomik lokasyonlardan (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentorial) bir veya birkaçında MS için karakteristik en az 1 T2 hiperintens lezyon --Omurilikte en az 2 T2 hiperintens lezyon --BOS'ta oligoklonal bandlar

Multipl Skleroz Tanı ve İzleminde MRG Kullanımı

MS tanı sürecinde ve ayırıcı tanılar açısından yapılan değerlendirmede MRG sıkça kullanılmaktadır [43]. MS ve diğer demiyelinizan hastalıklar için yapılacak MRG'lerinin en az 1.5 Tesla ve üzerindeki cihazlarda yapılması ve kesitlerin mümkünse 3 mm (ya da en çok 5mm) aralıklarla alınması gerekmektedir. Kesitlerin aynı düzlemden başlatılması ve subkallozal çizgi referans alınarak eşlenmesi, görüntülerin karşılaştırılması için kolaylık sağlar. Kraniyal incelemelerde sagittal ve aksiyal T1, T2 ve FLAIR ve postkontrast aksiyal T1 ağırlıklı kesitler alınmalıdır. Spinal incelemeler aksiyal ve sagittal T1 ve T2, postkontrast T1 planlarında yapılmalıdır. Optik sinirin görüntülenmesi için yağ baskılı optik sinire yönelik MRG istenmelidir. Kontrastlı inceleme 0,1 mmol/kg gadolinyum 30 saniye içinde verildikten sonra ve en az 5-10 dakika beklendikten sonra postkontrast yapılır. MR görüntülemenin fetüs üzerine zararlı etkisi gösterilmemiş olmakla birlikte, hamilelerin ilk üç ayda (organogenez döneminde), tıbbi açıdan yüksek düzeyde indikasyon yoksa, MR incelemesine alınmamaları tercih edilir.

Aktif plaklarda kontrastlanma bir ay sürer. Bu lezyonlar T1 sekanslarda hipointens 'kara delik' görüntüsü bırakır. Beyin sapı ve spinal lezyonlar kaybolabilir ancak diğerlerinde kaybolma daha nadirdir. [44]. Atrofi ve T2 hiperintens lezyon yükü prognostik öneme sahiptir. Demiyelinizan plak sahaları içinde yer alan vasküler yapı SWI (susceptability weighted image/duyarlılık ağırlıklı görüntüleme) sekanslarında hipointens olarak saptanır ve bu bulguya 'santral ven işareti' adı verilir.

KİS ve MS şüphesi durumunda hastanın muayene bulgularına göre lezyon olduğu düşünülen anatomik lokasyonlar için (beyin ve/veya spinal kord) MRG endikasyonu bulunur. Ayrıca MS ile takip edilen hastalarda atak şüphesi varlığında, yeni bir tedaviye başlamadan önce ve klinik yakınma yoksa bile rutin olarak 2-3 yılda bir MRG kontrolü yapılmalıdır. Ayrıca RIS hastalarında klinik yakınma yoksa bile ilk 2 yıl 6 ayda bir kontrol beyin MRG çekilmesi önerilir.

Multipl Skleroz Teşhisinde BOS Analizi:

MS teşhisinde beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları önemli ipucu sağlar. BOS Sitolojisi, demiyelinizan hastalık tanısını koyma ile beraber enfektif ve malign süreçlerin dışlanması için de önem taşır. BOS lökosit normal değeri 5/ μ L'dir. MS hastalığı için 5-50/ μ L normal kabul edilir [45]. Bazı parametreler için BOS ve kan beraber çalışılmalıdır. Kan glukoz değeri BOS değerinin 2/3ü kadardır. MS hastalığında BOS protein değerleri normal (15-45 mg/ dL) veya hafifçe yüksek olabilir. MS hastalarında BOS protein değerinin 100 mg/dL'nin üzerinde olması beklenmeyen bir bulgudur. IgG indeksi (Link indeksi), $(\text{IgG}_{\text{BOS}}/\text{IgG}_{\text{Serum}})/(\text{Albumin}_{\text{BOS}}/\text{Albumin}_{\text{Serum}})$ formülü ile hesaplanır ve MS hastalığında genellikle 0,66'dan büyüktür. BOS ve serum örnekleri, jel elektroforezde eş zamanlı olarak yürütüldüğünde elde edilen oligoklonal bant (OKB) paternleri 5 tipte incelenir. BOS'ta veya serumda protein saptanmamış ise tip I, BOS'ta OKB saptanmış ve kanda saptanmamış ise tip II, BOS'ta seruma göre daha fazla sayıda OKB saptanmış ise tip III, BOS ve serumda birbirinin aynı görüntüsü elde edilmiş ise tip IV, BOS ve serumda monoklonal bandların varlığı tip V şeklinde isimlendirilir. MS hastalığında OKB'nin tip II paterni tipik olup OKB paterni tip III veya daha nadir olarak (%15) negatif saptanabilir [46].

MS Tanısında ve İzleminde Kullanılan Diğer Tetkikler:

Uyarılmış Potansiyeller: Fizyolojik sistem bir noktadan uyarıldığında anatomik yol takip edilebiliyorsa anatomik yol üzerinden, takip edilemiyorsa diğer uç noktadan elektriksel yanıtlar alınır ve değerlendirilir. Böylece incelenen yolun intakt olup olmadığına karar verilir.

Vizüel Uyarılmış Potansiyeller (VUP): VUP'lar, görsel yolların optik sinirden kalkarın kortekse kadar olan elektriksel aktivitesinin bir ifadesidir. Hasta belirli görsel uyarılara mağruz bırakılarak uyarılan bu potansiyeller, bilinç ve dikkat durumundan bağımsız olarak uyarılara yanıt veren nöronal havuz aktivitesini tespit ederek insan görsel sisteminin işlevselliğini invaziv olmayan bir yöntemle araştırma imkânı sağlar [47]. Skalpten kaydedilen elektriksel dalgaların formu ve dalga latansları ölçülür. VUP testinde en çok değerlendirilen dalga 100 msn civarında ortaya çıkan

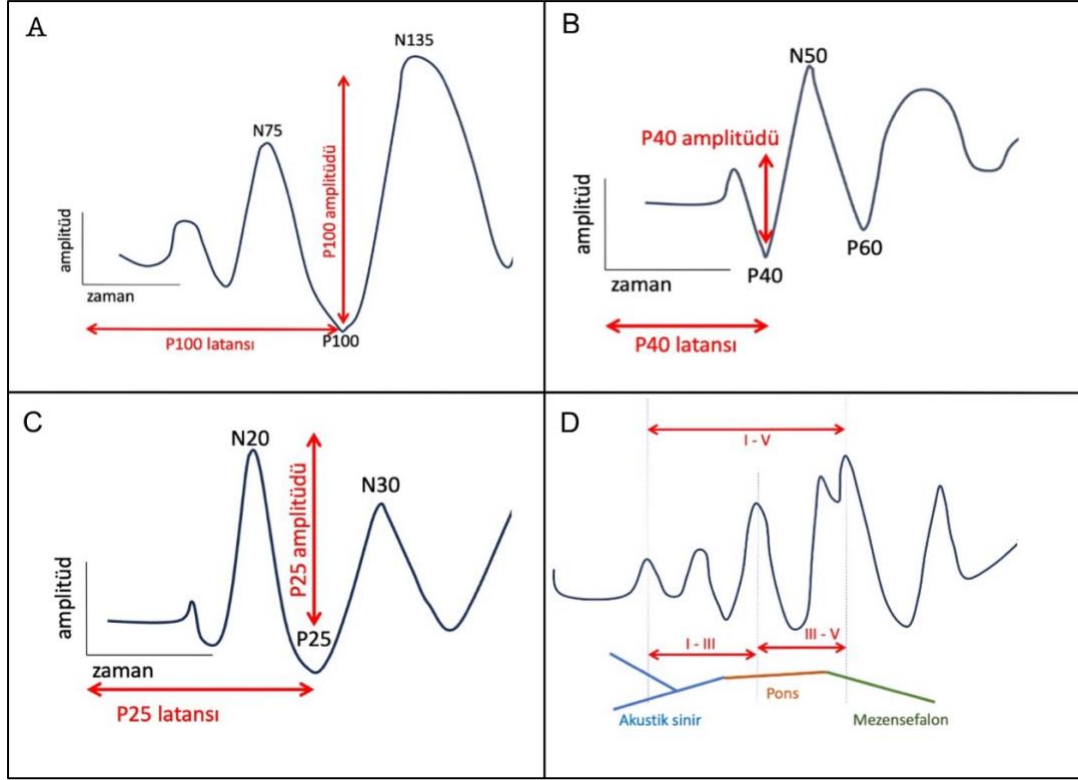
P100 dalgası olup latansının uzaması görsel yollarda demiyelinizasyon olarak yorumlanır. P100 latansının amplitüdündeki bir düşme akson harabiyeti şeklinde değerlendirilir (**Şekil 2.3A**). RRMS hastalarının %50'sinde Nervus Opticus lezyonları, %70'inde Radiatio Optica lezyonları görülür ve VUP bozukluklarına neden olur [48].

Sensoriyel Uyarılmış Potansiyeller (SUP): Periferik sinir sistemi üzerine verilen uyarı, pleksus, radiks, spinal kord arka kordon, medial lemniskus, talamus ve son olarak primer duyuşal kortekse gelir. SUP ile periferden verilen uyarının primer duyuşal kortekste oluşturduğu etki elektrofizyolojik olarak ölçülür. Uyarı noktaları üst ekstremitede median, alt ekstremitede tibial sinirdir. Bu sinir uyarımlı kaslarda hafif bir kasılmanın görüleceği şekilde düşük şiddette uyarı verilir. Median SUP uygulamasında N20 veya N25 dalgalarının latansında uzama veya amplitüdlerinde düşüklük olup olmadığı test edilir. Tibial SUP'ta ise P40 latans ve amplitüdü değerlendirilir (**Şekil 2.3B,C**).

Beyin Sapı İşitsel Uyarılmış Potansiyeller (BİUP): Beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyelleri (BİUP) rutin kullanımda en az kullanılan potansiyellerdir. MRG'ye göre daha az duyarlı olması dezavantajıdır. Buna rağmen klinik belirti vermeyen beyin sapı lezyonlarını saptamakta kullanılabilir. Beyin sapı işitsel yollarını etkileyen bir patolojik sürecin varlığında lezyonun etkilediği düzeyden sonraki potansiyellerin latansları uzar veya kaybolur. Anormalliği en çok yansıtan parametre interpike latanslardır. I-III interpike latansının uzaması VIII. sinir ve alt ponsa ilişkin patolojik durumları (akustik nörinom gibi), III-V interpike latansındaki uzama orta-pons ve alt mezensefalondaki lezyonlara işaret eder (**Şekil 2.3D**).

Optik Koherans Tomografi (OKT): Retinal gangliyon hücrelerinin uzantıları olan retinal sinir lifleri, iç retinada yer alır ve birleşerek optik siniri meydana getirirler. Bu aksonlar, lamina kribrosa bölgesine ulaşana kadar miyelinsizdir. Optik koherans tomografi (OKT), retina dokusunun kesit görüntülerini yüksek çözünürlükle elde etmeye yarayan ve retina katmanlarının kalınlığına dair bilgiler sunan, invaziv olmayan bir görüntüleme metodudur. Görüntülemenin fiziksel temeli optik yansıma farklılıklarına dayanır. Retina sinir lifi tabakası (RSLT) peripapiller bölgede kalınlaşır. Hörgücü kalın inferior ve superior kadranlar, aradaki çukurlukları ise ince nazal ve temporal kadranlar oluşturmaktadır. Bunun sonucu olarak OKT analizinde 'çift

hörgüç' görüntüsü elde edilir. Çift hörgüç görüntüsünün kaybolması ve RSLT'de inceleme aksonal dejenerasyon göstergesi olup prognostik açıdan değerlidir [49].



Şekil 2-2-3. Multipl Skleroz Teşisinde Kullanılan Elektrofizyolojik Testler
A.Vizüel uyarılmış potansiyel B.Tibial Sensoriyel Uyarılmış Potansiyel C. Median Sensoriyel Uyarılmış Potansiyel D.Beyin Sapı İşitsel Uyarılmış Potansiyel ([49]'tan uyarlanmıştır)

2.1.6. Multipl Skleroz Hastalarında Klinik Ölçekler:

Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği (Expanded Disability State Scale – EDSS):

MS hastalığının klinik etkilerini değerlendirmek amacıyla nitel (kalitatif) ve semi-kantitatif olmak üzere çeşitli ölçekler kullanılmaktadır. Bu ölçekler arasında en yaygın kabul gören ve kritik öneme sahip olanı Genişletilmiş Engellilik Durumu Skalası (EDSS)'dir. EDSS puanlaması, bir nöroloji uzmanı tarafından yapılır. Skorlama 0 ila 10 arasında, yarım puan aralıklarıyla yapılmakta olup, EDSS 0 puan

tamamen normal bir muayeneyi, EDSS 10 puan ise MS nedeniyle meydana gelen ölümü ifade etmektedir. Bu puanlama sistemi, piramidal fonksiyonlar, serebellar fonksiyonlar, beyin sapı fonksiyonları, duyuşal fonksiyonlar, bağırsak ve mesane fonksiyonları, görme fonksiyonları, serebral fonksiyonlar ve diğlerleri olmak üzere sekiz farklı alt kategori üzerinden çoklu sistem değerlendirmesini içerir. EDSS puanlamasına göre, yaklaşık olarak 1 ile 4,5 arası puan alan MS hastaları herhangi bir yardıma ihtiyaç duymadan yürüyebilirken 5 ile 9,5 arası puan alan hastalar ise yardımsız yürüyemeyen kişileri temsil etmektedir [50]. Cohen ve ark. EDSS'nin değerlendiriciler arasındaki variabilitesinin %30'a kadar çıkabildiğini göstermiştir [51]. Twork ve ark.'a göre EDSS skorlarındaki artış, her zaman yaşam kalite ölçeklerindeki artışla korelasyon göstermemektedir. EDSS 4,5 ve altında olan hastalardaki skor artışı, EDSS 4,5-6,5 arasında olan ve EDSS > 7 olan hastalara göre yaşam kalite ölçeklerinde daha az etki oluşturmaktadır [52]. EDSS düşük skorlarda engellilikten ziyade Nörolojik muayenede tespit edilenleri yansıtır. Bunun yanında, 4.5-7.5 arasında yürüme bozukluğunun bir göstergesi iken 7.5 ve üzeri skorlarda immobil hastaların günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirebilme yeteneklerini yansıtır [53].

Multipl Skleroz Kompozit Fonksiyon Testi (MSKT):

MS'in hastalar üzerindeki etkisini üç temel fonksiyon kaybı üzerinden ölçmeyi amaçlayan bu kompozit test 1990'ların sonunda önerilmiştir. 'Yirmi beş feet yürüme testi' hareket ve yürüme kabiliyeti; 'dokuz delikli çivi testi' üst ekstremité becerisi ve 'Zamanlı Sesli Seri Testi' (PASAT-3) işitsel bilgiyi işleme kapasitesini değerlendirir. PASAT-3 testinde hastaya her 3 saniyede bir yeni bir sayı sunulur ve hastanın bu sayıyı hemen önceki sayı ile toplaması istenir. Hastanın performans stresini azaltma ve daha kolay uygulayabilme amaçlarıyla PASAT-3 testi yerine 'Sembol Rakam Modalite' testi önerilmiştir. Bu testte hastanın belirli sayılar ile figürleri eşleştirmesi beklenmektedir. Ancak MSKT EDSS kadar yaygınlaşmamış olup genellikle araştırma amacıyla kullanılmaktadır [54, 55].

EDSS-Plus:

EDSS skorunun 1,0'den 2,0'ye yükselmesi ile 5,0'ten 6,0'ya yükselmesi için gerekli progresyon miktarları farklı olacaktır. EDSS, geniş bilimsel ve düzenleyici bir

geçmişe sahip olmasına rağmen, SPMS hastalarında klinik olarak önemli engellilik artışını tespit etmedeki duyarlılığı sınırlıdır. Bunun nedenleri kısmen, kısa mesafe yürüyüş ve üst ekstremitte fonksiyonunun anlamlı bir şekilde ölçülmemesidir [55]. Cadavid ve ark. 24 hafta arayla uyguladıkları yeni kompozit skorun sekonder progresyonu tahmin etmede EDSS'den daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu skorda EDSS, 25ft yürüme testi ve dokuz delikli çivi testinden oluşmaktadır [56, 57].

Bu gelişmeler, MS'in klinik sonlanımının büyük ölçüde alt ekstremitte motor disfonksiyonu ve hareket kabiliyeti olmadığını göstermiştir. Özellikle progresif MS hasta grubunda özürülükteki kötüleşmenin 'fonksiyonel' kapasite ile daha yüksek ilişkisi nedeniyle MS hastalarının fonksiyon kapasitesini ölçebilecek çok yönlü yeni bir ölçek gereği ortaya konmuştur. Ayrıca progresyonun muhtemelen farklı immünopatolojik mekanizmalarla gerçekleştiği de klinik olarak desteklenmiştir.

2.1.7. MS Tedavileri

MS Atak Tedavileri:

MS'te, enflamatuvar ve demiyelinizasyon süreçleri nedeniyle yeni nörolojik belirtilerin görüldüğü veya mevcut belirtilerin şiddetlendiği, en az 24 saat süren nörolojik kötüleşme atak olarak adlandırılır. Psödoatak, vücut sıcaklığında yükselme gibi sebeplerle enfeksiyon veya diğer faktörler eşliğinde geçmişte yaşanmış semptomların yeniden ortaya çıkması ya da mevcut semptomların ağırlaşması durumunu ifade eder. Yoğun stres, uyku eksikliği, açlık, menstruasyon gibi faktörler psödoatağa katkıda bulunabilir. Ayrıca, paroksizmal semptomlar (tonik spazmlar veya trigeminal nevralji gibi) 24 saat veya daha uzun süre boyunca var olduğunda, atak olarak değerlendirilmelidir.

MS akut atak döneminde en çok tercih edilen tedavi **intravenöz metilprednizolondur (IVMP)**. Akut ataklarda IVMP tedavisi 500-1000 mg/gün dozda 3 ila 10 gün arasında ve Adrenokortikotropik hormon (ACTH) ritmini en az düzeyde inhibe edebilmek amacıyla sabahları 60-90 dk süre içinde tek seferde uygulanır. Oral yoldan uygulanan steroide göre ivmp uygulanan hastalarda bir sonraki MS atağının daha geç görüldüğü saptanmıştır. Ancak klinik yararlanım ve yan etki profili açısından 1250 mg po prednizon gün aşırı kullanımı ile 1000 mg/gün ivmp 5 gün kullanımının benzer olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur [58]. Steroid

tedavisinin periferik immün sistem üzerindeki etkisinin 3. Gün başladığı, ancak kalıcı olmadığı ve tedavi kesildikten yaklaşık 30 gün sonra kaybolmaya başladığı gösterilmiştir [59]. Klinik iyileşme günler içinde veya bir hafta sonra başlayabilir. Ağızda metalik tat veya tat değişikliği (%53), yüzde kızarma ve ateş basması (%61), karın ağrısı veya dispepsi (%53), uyku bozukluğu (%44), iştahta azalma (%37), ajitasyon (%36) ve davranış değişikliği (%36) akut dönemde görülen yan etkilerdir [59, 60]. En korkulan yan etkilerden biri osteoporoz olup ivmp tedavisinin kemik yoğunluğu üzerinde negatif etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [61]. İVMP alan hastalara, beraberinde proton pompa inhibitörü ve kalsiyum/d-vitamini reçete edilmelidir.

Kortikosteroid tedavisini tolere edemeyen veya bu tedaviye yanıt alınamayan hastalarda **adrenokortikotropik hormon (ACTH)** kullanılabilir. 50 ünite (1 mg)/gün- 5-7 gün, im olarak verildikten sonra, 50 ünite (1mg)/günaşırı, 3-5 gün süreyle uygulanabilir. Dozun azaltılarak kesilmesi uygundur. Kortikosteroidlerle benzer veya biraz daha az klinik yararlanım sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Yan etki profilleri benzerdir. Melanokortin reseptör-1(MKR1) üzerinden kortikotropik, MKR2 ve MKR3 üzerinden antiinflamatuvar etki gerçekleştirdiği düşünülmektedir [62].

MS ataklarında **intravenöz immüoglobulin (ivig)** kullanımına ilişkin yeterli veri yoktur. Ancak akut atak döneminde steroid tedavisinin kontrendike olduğu hastalarda toplamda 2 gr/kg dozda kullanılabilir. Ivig tedavisinin yardımcı T hücre-1 ile yardımcı T hücre-2 arasındaki bozulmuş dengeyi modüle edebileceği ve antikor-kompleman kompleksinin oluşumunu engelleyerek fayda sağlayabileceği düşünülmektedir [63].

MS ve diğer MSS otoimmün ilişkili inflamatuvar hastalıklarında kortikosteroide yanıt alınamayan hastalarda plazmaferez yapılabilir. Plazmaferez, antijen-antikor ve kompleman-antikor komplekslerinin kandan uzaklaştırılması ile etki eder ve defisitlerde önemli ölçüde iyileşme sağlayabilir. Kateter enfeksiyonu, pnömotoraks, hemotoraks, anafialktoid reaksiyon, hipofibrinojenemi gibi yan etkilere neden olabilmektedir [64, 65].

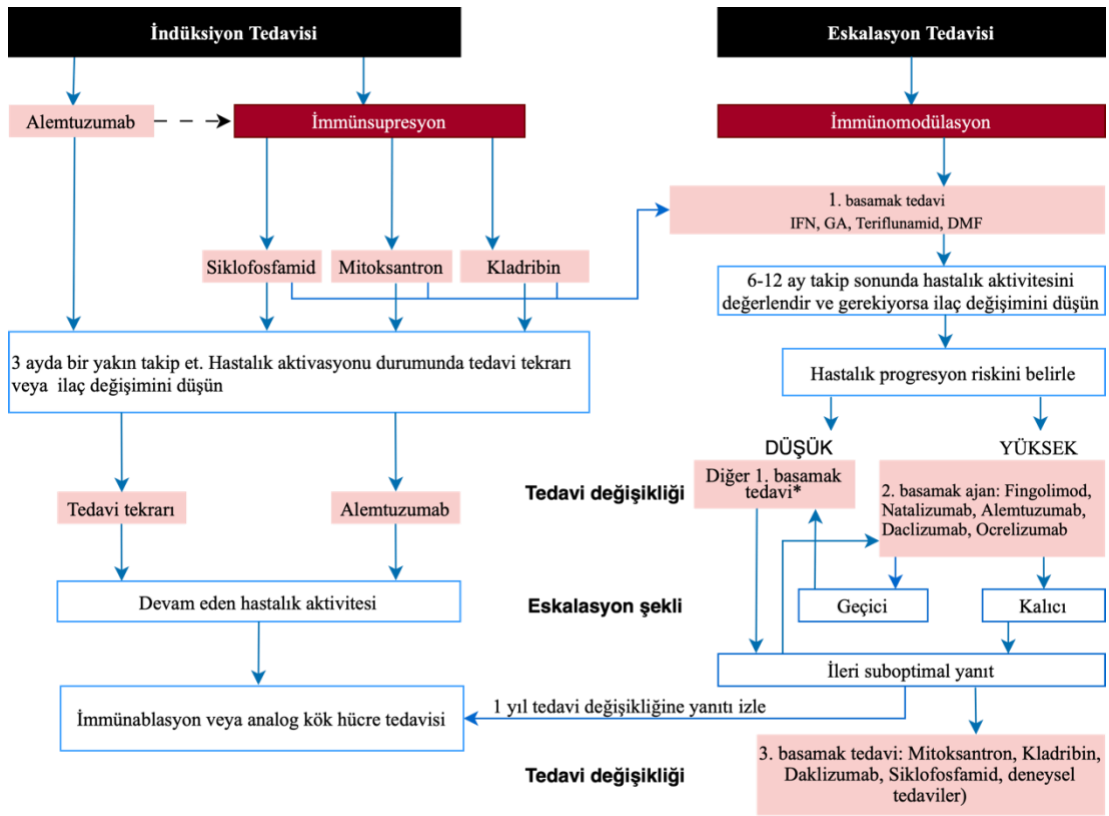
Multipl Skleroz İdame Tedavileri:

MS idame tedavilerinin amacı, hastalık aktivasyonunu uzun süreli olarak kontrol altına almaktır. Bu nedenle, tedaviye başlarken ve mevcut tedavi değiştirilirken hedef, 'Hastalık Aktivitesinin Olmaması (No Evidence of Disease Activity - NEDA)' durumuna ulaşmaktır. NEDA-3, klinik atak yokluğu, özürüllükte ilerleme gözlenmemesi ve MRG kontrollerinde yeni T2 hiperintens lezyonların eklenmemesi veya T1'de kontrast tutan lezyonların bulunmaması kriterlerine dayanır. Son yıllarda, bu kriterlere MS ilişkili beyin atrofisinin yokluğu eklenerek NEDA-4, NEDA-4ê kognitif semptomlar eklenerek NEDA-5 önerilmiştir [66]. Tedavi açısından atılacak her adımda hasta bu kriterlere göre düşük-orta-yüksek riskli olarak değerlendirilir (**Tablo 2.3**).

Tablo 2-3. Tedaviye yanıtızsızlık konusunda kaygı derecesi (NEDA-3)

Değerlendirme	Tedaviye yanıtızsızlık konusunda kaygı derecesi		
	Düşük	Orta	Yüksek
Atak sayısı	Tedavinin ikinci yılında 1 atak	Tedavinin birinci yılında 1 atak	Tedavinin birinci yılında >1 atak
Atak şiddeti	KS gerektirmeyen 1 fonksiyonel sistem etkilenmesi, motor ve serebellar tutulum yok/ılımlı, yaşam kalitesine hafif derecede etkili	KS gerektiren >1 fonksiyonel sistem etkilenmesi, orta derecede motor ve serebellar tutulum, yaşam kalitesine orta derecede etkili	KS/yatış gerektiren >1 fonksiyonel sistem etkilenmesi, ciddi derecede motor ve serebellar tutulum, yaşam kalitesine yüksek derecede etkili
Ataktan düzelme (süre)	Hızlı iyileşme, fonksiyonel kusur yok	Üç ayda tam olmayan iyileşme ılımlı fonksiyonel kusur	6 ayda tam olmayan iyileşme, belirgin fonksiyonel kusur
EDSS			
≤3.5	≤1 puan	6 ayda 2 puan	6 ayda >2 puan 12 ayda 2 puan
4,0-5,0	<1 puan	6 ayda 1 puan	6 ayda >1 puan 12 ayda 1 puan
≥5.5		6 ayda 0,5 puan	6 ayda >0,5 puan
MRG			
Yeni KTL veya T2L/yıl	1 lezyon	2 lezyon	≥3 lezyon

MS tedavi seçiminde kullanılan iki temel strateji ‘eskalasyon tedavisi’ ve ‘indüksiyon tedavisi’ kavramları ile ifade edilir. Eskalasyon yaklaşımında, MS tedavisine daha düşük etkinlikli ilaçlarla başlanır ve yan etki riski gözetilerek hastalık aktivasyonu arttıkça daha yüksek etkinlikli ilaçlara geçilir. İndüksiyon yaklaşımında, erken dönemde hastalık aktivasyonunu maksimum düzeyde azaltabilecek agresif tedaviler tercih edilir (Şekil 2.4). Bu yaklaşımlar içerisine dahil edilen MS ilaçları etkinlik ve yan etki düzeylerine göre farklı basamaklarda ele alınmıştır.



Şekil 2-2-4. MS Tedavi Stratejileri ([67]'den Türkçe'ye çevrilerek uyarlanmıştır.)

İdame olarak kullanılan MS ilaçları immünsüpresif (alemtuzumab, kladrinin, siklofosfamid, mitoksantron, okrelizumab) veya hastalık seyrini yavaşlatan immün modülatuar mekanizmalar (interferon-beta-1a, glatiramer asetat, dimetilfumarat, fingolimod, teriflunamid, daclizumab, natalizumab) ile etki gösterir [68]. MS idame tedavisinde kullanılan ilaçlar ve özellikleri aşağıdaki gibidir:

Interferon Beta: 1993'te, interferon beta-1b (IFN- β 1b) MS için onaylanan ilk hastalık modifiye edici tedavi olmuştur ve KİS, RRMS, SPMS hastalarında endikedir [69]. Klinik olarak atak sıklık ve şiddetini, radyolojik olarak da yeni lezyon gelişimini ve lezyon yükünü azaltıcı etkileri olan interferon-beta'nın IFN- β 1b (Betaferon sc.) ve IFN- β 1a (Avonex im. ve Rebif sc.) olmak üzere iki tip rekombinant formu bulunur. IFN- β 1a, endojen insan IFN- β 1a ile aynıdır. IFN- β 1b, IFN- β 1a'dan bir amino asit farklıdır ve glikozil grubu eksiktir. IFN- β , T lenfositlerin aktivasyon ve çoğalmasını, proinflamatuvar sitokinlerin üretimini ve mikroglialarda antijen sunumunu azaltarak; ayrıca kan-beyin bariyerinde matriks metalloproteinlerinin üretimini inhibe ederek etki gösterir[67]. Yan etkiler enjeksiyonu takiben 2-8 saat sonra ortaya çıkan ve 24 saat sonra azalan influenza benzeri semptomların yanı sıra yaygın lenfopeni, nötropeni, tiroid fonksiyon bozukluğu, hepatit, enjeksiyon yerinde abse ve nekroz şeklindedir. Bazı hastalarda spastisiteyi artırdığı bildirilmiştir. IFN- β tedavisi ile nötralizan antikorlar (NAB) oluşumu indüklenebilir. NAB'lar genellikle tedavinin 6. ila 18. ayları arasında yaş, cinsiyet ve ilacın kullanıldığı süreden bağımsız olarak ortaya çıkar ve NAB'ların varlığında tedavinin etkinliğinin azaldığı düşünülmektedir[70]. 2020 itibariyle, interferon betalar, gerçek yaşam gebelik verilerine dayanarak teratojenik olarak kabul edilmemektedir. IFN- β kullanırken emzirmenin güvenli olduğu düşünülmektedir. Eskalasyon gereğinde hastalık aktivasyonuna göre başka tedaviye geçilebilir. Düşük riskli aktivasyonda yüksek doz IFN- β uygulanabilir veya glatiramer asetatı geçilmesi düşünülebilir. Yüksek riskli hastalık aktivasyonunda ikinci basamak MS tedavilerinden birine geçilmesi önerilmektedir.

Glatiramer Asetat (GA): Polipeptid yapıda doğal 4 aminoasidin (L-glutamik asit, L-alanin, L-tirozin, L-lizin) sentetik bileşimidir ve ‘‘myelin basic protein’’ (MBP) yapısındadır. Glatiramer asetat ilk olarak 1996 yılında FDA tarafından RRMS için onay almıştır. Daha sonra onay, yetişkinlerde KİS ve aktif SPMS'i içerecek şekilde genişletilmiştir. Periferik kanda anti-inflamatuvar yardımcı T lenfositlerini (T helper-2, Th2) indükler. Antijen sunan hücreler (monosit ve dendritik hücreler), CD4+ yardımcı T lenfositler, CD8+ T sitotoksik lenfositler, pro-enflamatuvar (Th1/Th17) lenfositlerin anti-enflamasyon yönünde modülasyonunu sağlar. GA, ayrıca nörotrofik faktörlerin (beyin kaynaklı nörotrofik faktör-3 ve nörotrofik faktör-4) sekresyonunu indükleyerek nöroprotektif ve nörorejeneratif özellik gösterir [71]. 20 mg/sc/her gün veya 40

mg/sc/haftada üç kez subkütan uygulanır. GA genellikle iyi tolere edilir, ancak çoğu hastada (%65) enjeksiyon bölgesi reaksiyonları, eritem (ağrı, kızarıklık, şişlik ve kaşıntı) görülür. Lokalize lipoatrofi kronik kullanımda kalıcı olabilir. Yaklaşık %15 hastada, enjeksiyon sonrası yüzde kızarma ve göğüste geçici sıkışma, çarpıntı ve dispne şeklinde kendi kendini sınırlayan sistemik reaksiyon görülebilir. Glatiramer asetatın, teratojenite veya fetal kayıp riskinde artış olmadan gebelik boyunca alınması güvenli kabul edilir ve emzirirken kullanmak için güvenlidir [72].

Teriflunamid: Teriflunomid, de novo pirimidin sentezinde görevli mitokondriyel bir enzim olan dihidroorotat dehidrojenazı geri dönüşümlü olarak inhibe eder. T ve B lenfosit çoğalmasını engeller. T-lenfosit alt tipleri içinde proinflatuvar özellikteki hücre gruplarını azaltır ve antiinflatuvar özellikteki düzenleyici T hücreleri (Treg) artırır. Sitokin salıverilmesini azaltarak humoral immunitiyi baskılayıcı etki gösterir. RRMS ve KİS hastalarında endikedir. Bir faz 3 çalışmasında plaseboya kıyasla 14 mg'lık teriflunamid dozunun relaps oranını % 31-36, özürülülüğün progresyon oranını % 26-27 ve MRG gadolinium tutan lezyonları % 80 oranında azalttığı gösterilmiştir[73]. Teriflunamid 7 mg veya 14 mg dozlarda tablet halinde günlük olarak alınır. En sık görülen yan etki saç dökülmesi (%7-13) olup periferik nöropati, karaciğer fonksiyon bozukluğu, toksik hepatit, hipertansiyon, lenfopeni ve nötropeni de görülebilir. Teriflunomid hayvan çalışmalarında teratojenik bulunmuştur. Gebe kadınlarda ve etkili kontrasepsiyon kullanmayan üreme potansiyeline sahip iki cinsiyette de kontrendikedir [74]. Yarı ömrü uzun olan teriflunamid dokularda depolanır. Bu nedenle gebelik veya ciddi advers etkiler durumunda, kolestiramin veya aktif edilmiş kömür kullanılarak ilacın hızlandırılmış bir şekilde vücuttan atılması önerilir.

Dimetil Fumarat: Fumarik asit esterlerinin oral formulasyonudur, eskiden beri psoriasis tedavisinde de kullanılmaktadır. Erişkin KİS, RRMS ve SPMS hastalarında kullanımı 2013 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Etki mekanizması net olarak bilinmeyen ilacın, antiinflatuvar, nöroprotektif ve anti-oksidan etki gösterdiği düşünülmektedir. Kullanımı esnasında Th1'den Th2'ye kaymaya neden olmakta; hücreleri oksidatif strese karşı koruyan bir transkripsiyon faktörü olan Nrf aracılıklı hem-oksjenaz aktivasyonunu ve IL-4, IL-5 gibi sitokinlerinin düzeyini artırmaktadır [75]. Dimetil fumarat günde iki kez 120 mg veya 240 mg kapsül olarak

uygulanır. Plasebo karşılaştırmalı Faz 3 çalışmasında relaps oranını % 44-53, özürlülük oranını % 22-32 ve MRG kontrast tutulumu % 75- 94; Copaxone ile karşılaştırmalı bir çalışmada relaps oranını % 24, özürlülük oranını ise % 17 oranında daha fazla azalttığı gözlenmiştir [76]. En sık görülen yan etki olan flushing (yüzde kızarma ve ateşlenme hissi), ilacın yemek sırasında alınması ve asetil salisilik kullanımını ile önlenabilir. İlk 3 ayda karın ağrısı ve dispepsi şikayetleri siktir ve yemekle birlikte alındığında azalabilir. İlk yılda lenfosit sayısında %30 azalmaya neden olur. Lenfosit sayısı 6 ay süresince 500 lenfosit/mm³'ün altında ise ilacın geçici olarak kesilmesi düşünülebilir. İleri yaş, 6 aydan daha uzun süreli evre 3 lenfopeni artmış Progresif multifokal lökoensefalopati (PML) tablosu ile ilişkilidir[77]. İlacın gebelikte kullanımı önerilmez ancak kullanılabilirliğini savunan küçük örneklemli çalışmalar mevcuttur [78, 79].

Fingolimod: Sfingozin 1-fosfat reseptör modülatörü olan fingolimod, oto-reaktif lenfositlerin lenf nodlarından ayrılmalarını ve merkezi sinir sistemine göçünü engeller. 0,5 mg'lık kapsül formu oral olarak günlük kullanılır. INF- β , Glatiramer asetat, Teriflunamid ya da dimetil fumaratı en az 1 yıl süreyle kullandığı halde yeterli yanıt alınamamış RRMS hastalarında 2.basamak tedavi ya da başlangıçtan beri yüksek hastalık aktivitesine sahip olgularda ilk seçenek olarak başlanabilir. Faz 3 çalışmalarında; plaseboya göre yıllık relaps oranında, özürlülük progresyonunda, yeni gelişen MRG lezyon sayısında ve beyin atrofisinde azalma sağladığı gösterilmiştir [80]. En sık görülen yan etki uzamış QTc ve bradikardidir. İlk dozdan sonra 1 saat içinde kalp hızında azalma olur, 4.5 saatte maksimuma ulaşır. Nadiren 40atım/dk'nın altına iner. Bu durumda tedavi durdurulmalıdır. Geçici AV bloklar olabilir. Bu nedenle ilk doz sonrası en az 6 saatlik kardiyak monitorizasyon önerilir. Genellikle ilk 3-4 ayda karaciğer fonksiyon testlerinde (KCFT) bozulmaya neden olur. Bu nedenle KCFT takibi 1. 3. 6. Ay ve sonrasında periyodik olarak izlenmelidir. Lenfosit sayısı 200/mm³ altında ise tedavi kesilir ve lenfopeni birkaç hafta içinde normale döner. Fingolimod, fırsatçı enfeksiyonlara ve öncesinde immünsupresan tedavi veya natalizumab kullanan hastalarda PML'ye yatkınlığı artırır. İlacın kullanımı esnasında canlı-attenüe aşılar yapılmamalıdır. Lipid profilinde bozulma, hipertansiyon ve maküla ödemine yol açabilir. Bu nedenle tedaviye başlandıktan sonraki 3. Ayda oftalmolojik değerlendirme, 6. ayda Optik Koherens Tomografi (OCT) ve yıllık

oftalmolojik kontrol önerilir. Fingolimod kesildikten sonra rebound hastalık aktivitesi gelişebilir[81, 82].

Natalizumab: Natalizumab α 4-integrin'e karşı bir monoklonal antikordur. Aktife olmuş lökositlerin endotele yapışmasını önleyerek, inflamatuvar hücrelerin MSS'e geçişini inhibe eder[83]. Erişkin KİS, RRMS ve aktif SPMS hastalarında endike olan natalizumab, her 4 haftada bir 300 mg intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. Monoterapi olarak kullanıldığında plaseboya karşı hastalık aktivitesini %62, MRG'da kontrastlanma gösteren plakları %92 azalttığı gösterilmiştir[84].

Natalizumab genellikle iyi tolere edilmesine rağmen, PML riski her zaman göz önünde bulundurulmalıdır (4.1/1000). JCV PCR negatif olan ve daha önce immünsupressif ilaç kullanmayan hastalarda PML riski düşüktür (<1 /10000). JCV pozitif hastalarda PML riski, Natalizumab tedavi süresi ve daha önceki immünosupresif tedavilere bağlıdır. Bu hastalarda risk ilk 2 yılda düşüktür, ama süre arttıkça risk artar. En yüksek risk, daha önce de 2 yıllık natalizumab tedavisi sonrası immünsupresif tedavi alan JCV pozitif hastalar arasında bulunmuştur (~ 1/60). Genel bir kural olarak, 2 yıldan uzun bir süre natalizumab ile tedavi edilen JCV pozitif hastaların başka bir ikinci basamak tedaviye geçmeleri önerilmektedir[85]. JCV indeksi <1,5 ise 3 ayda bir PML açısından klinik ve radyolojik olarak kontrol edilmek şartıyla bazı hastalarda Natalizumab'a devam edilebilir. JCV-negatif hastalarda her 6 ayda bir indeks bakılması önerilir. Natalizumab tedavisine karşı immün cevap oluşabilir ve ilaca karşı antikor gelişimi Natalizumaba karşı sentezlenen antikorlar genellikle tedavinin ilk 12 ayı içerisinde ortaya çıkar, tedavinin etkinliğini azaltır ve daha yüksek oranda infüzyonla ilişkili yan etkilere sebep olabilir. Buna göre, hastalar tedavinin 6 ve 12. ay bu açıdan test edilmeli, daha sonraki dönemde ise tedavi başarısızlığı ya da infüzyon ilişkili reaksiyonlar gelişirse bu açıdan kontrol edilmelidir. Natalizumab kesildikten sonra hastalığın rebound aktivite gösterme riski mevcuttur[86].

Okrelizumab: Rekombinant olarak elde edilmiş humanize bir monoklonal antikordur. Kimerik rituksimab gibi etkisini, B hücrelerin yüzeyindeki CD20 molekülü ile etkileşime geçerek gerçekleştirir. Ancak rituksimabda olduğu gibi anti-kimerik nötralizan antikor oluşumu görülmez ve infüzyon ile ilişkili reaksiyonlar daha

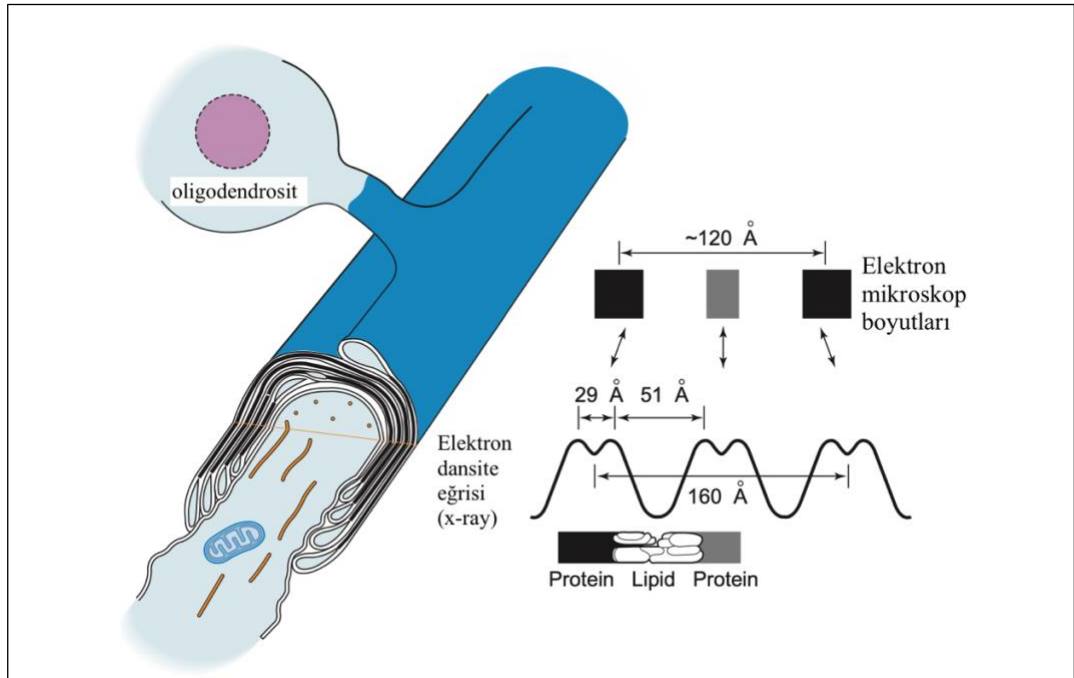
azdır. Okrelizumab, B hücrelerinin CD20 molekülüne bağlanarak apoptozuna dolayısıyla dolaşımdaki B hücrelerin azalmasına yol açar. 2011 yılında yapılan faz 2 çalışmasında 2 hafta ara ile verilen 300 mg intravenöz ocrelizumab tedavisinin plaseboya kıyasla yıllık atak sıklığında %80 azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan 2 faz 3 çalışma RRMS'te atak sıklığını ve MR aktivitesini IFN-beta'ya göre önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (OPERA1-2). Ocrelizumab, PPMS'te progresyon üzerine olumlu etkinliği gösterilmiş ilk tedavidir (ORATORIO) [87]. Mart 2017'de FDA, hem RRMS hem de PPMS için okrelizumab onayı vermiştir. EDSS'si 7'den düşük, en az 1 yıl süreyle INF- β , teriflunomid, GA, DMF tedavisine yanıtız olduğunun gösterilmiş RRMS ve SPMS hastaları ile EDSS'si 7'den düşük PPMS hastalarında kullanım endikasyonu mevcuttur. İlk iki doz 15 gün arayla 300 mg intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. Daha sonra her 24 haftada bir, 600 mg IV infüzyon olarak devam edilir. İlaç yakın tıbbi gözetim altında ve premedikasyon (metilprednizolon 100 mg iv, Difenhidramin 50 mg tb oral, Parasetamol 500 mg tb oral) ile verilmelidir. Tedavi öncesi Varicella, tüberküloz, hepatit serolojisi ve meme kanseri açısından tarama yapılmalıdır. Ocrelizumab kullanan hastalarda artmış neoplazi riski olması nedeniyle meme kanseri taramaları ilaca başlanmadan önce yapılmalıdır[88].

2.2. Multipl Skleroz Patofizyolojisi:

2.2.1. Miyelin Kılıfın Yapısı:

Miyelin kılıf, sinir aksonlarını spiral şekilde sararak elektriksel yalıtım sağlayan plazma membranıdır. Periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri, merkezi sinir sisteminde ise oligodendrositler miyelini oluşturur [89] [90] [91]. Uzun bir akson boyunca birçok hücre aralarında boşluklar kalacak şekilde miyelini oluşturabilir. Hücreler arasında kalan boşluklar, aksonun ekstraselüler boşlukla direkt temas ettiği 'Ranvier nodları'dır. Elektriksel ileti akson boyunca bir Ranvier nodundan diğerine sıçrayarak ilerlediği için miyelini yapısı sinir iletimini hızlandırır. Miyelinli aksonlar, MSS'de glial hücreler ve kan damarları ile birlikte beyaz cevherde yer alır. Gri cevherde ise miyelinsiz aksonlar, hücre gövdeleri ve gövdeden çıkan dendritler yer alır.

Miyelinin yapısı ile ilgili ilk bilgiler elektrofizyoloji ve elektron mikroskopi (EM) çalışmalarından gelmiştir. Periferik sinir sistemi (PSS) prototipi olarak siyatik sinir, MSS prototipi olarak optik sinir çalışılmış ve görüntüler boyunca bu yapılarda koyu-açık-koyu-açık-koyu' renklerde ritmik bir paterne rastlanmıştır. Öyle ki, EM görüntüsü boyunca miyelin kılıfın sitozolik veya ekstraselüler boşluklara ait protein içerikli katmanları koyu renkte, lipidlerce zengin membranöz katmanları açık renkte görünür (**Şekil 2.5**). PSS'de her bir schwann hücresi bir aksonu çepeçevre sararken MSS'de bir oligodendrosit plazmalemması birden fazla aksona değer ve her aksonun bir kısmını örter. **Şekil 2.6'da** görüldüğü gibi hücre zarları ortada iki tabaka halinde yoğun bir katman oluşturur ve sitoplazmayı periferik iter. Yoğun katmanın sitozolik kısmı koyu/dens çizgiyi; periferde kalan sitozolik boşluklar lateral katlantı veya Schmidt-Lanterman yarıklarını oluşturur.

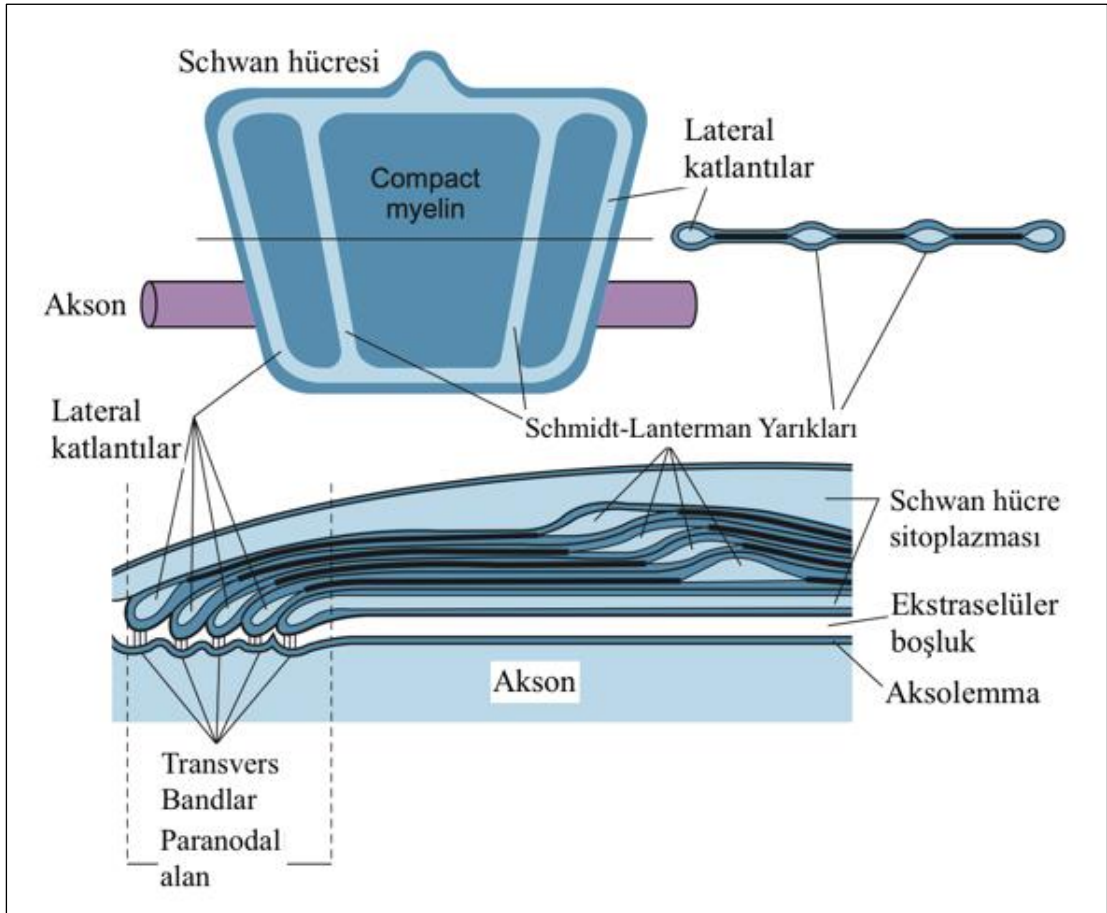


Şekil 2-5. MSS'de miyeline ait ince yapıyı gösteren kompozit diyagram. (Norton'un 1977'de miyelin yapılarını incelediği çalışmasından uyarlanmıştır [92].)

Miyelin, %70'lik lipid oranı ile organizmada protein:lipid oranı ve %35-55lik su oranı ile organizmada su içeriği en düşük membranöz yapıdır[93]. Miyeline özel

bir lipid yoktur ancak serebrozid (galaktozil seramid) miyelinde bulunan bir tipik lipiddir. Serebrozid ve sülfatidlerle birlikte kolesterol ve fosfolipidler, miyelinde en sık bulunan yağ grubunu oluşturur. PSS ve MSS miyelinleri lipid içerik açısından benzerdir, ancak protein çeşitliliği ve yerleşimi açısından oldukça farklıdır [94].

MSS'de miyelin yapısında en çok bulunan proteinler 'proteolipid protein' (PLP) ve 'miyelin basic protein'dir (MBP). PLP, tetramerik yapıda bulunur. Hem N-terminali hem C-terminali ekstraselüler boşluğa bakar ve miyelini oluşturan



Şekil 2-6. Oligodendrosit ve Schwan hücresi plazmalemmaları ile miyelin konfigürasyonu (Hirano ve Dembitzer'in 1967'de J.Cell Biology'de yayımlanan miyelin çiziminden uyarlanmıştır [95].)

membranöz yapıları ekstraselüler taraftan birbirine tutturur. Miyelin basic protein (MBP) dimerik yapısı ile membranları sitozolik yüzlerinden birbirine tutturur ve dens çizginin oluşmasını sağlar. MBP, 7 ekzonlu bir genden alternatif kombinasyonlarla

oluşan 4 farklı alt tipe sahiptir. Ekzon 2, gelişimin ve remiyelinizasyonun erken dönemlerinde eksprese edilirken geç dönemde bulunmaz. Farklı MBP izoformlarının görevleri bilinmemekle birlikte MBP miyelin yapısı için vazgeçilmez bir proteindir [96]. Miyelin ilişkili glikoprotein (myelin associated glycoprotein-MAG) kompakt miyelin yapısında yer almaz. Miyelin iskeletinin aksona yakın kısmında transmembran tek geçişli bir glikoprotein olarak yer alır ve akson-miyelin bağlantısını sağlar. Oligodendrosit Miyelin glikoprotein de (OMG) benzer şekilde akson-oligodendrosit bağlantısını sağlar. Miyelin iskeletinin aksona en uzak (dış) katmanında, miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) bulunur. MAG gibi transmembran tek geçişli yapıda olan MOG'un sinyal iletiminde görevli olduğu düşünülmektedir. MOG'un yüzeyel yerleşimi onu bağışıklık sistemi etkilerine açık hale getirir[89].

2.2.2. Bağışıklık Sistemi ve MSS İlişkisi:

1940'larda Medawar, farelerle yaptığı transplantasyon deneyleriyle beyinde diğer organlardan daha toleranslı bir immün yanıt olduğunu ortaya koymuştur. Deri greftlerinden yaptığı heterotopik transplantasyon, ventrikül yüzeylerinde parankime göre daha fazla ancak beyinde tüm diğer vücuda göre daha az immün yanıt oluşturmuştur [97]. Ayrıca daha önce immünize olmuş farelere yapılan transplantasyon, naif farelere göre daha yüksek immün aktivite ile sonlanmıştır. Klasik lenfatik sistemin beyinde saptanmamış olması ve beyin parankiminde yer alan antijen sunucu hücrelerin düşük aktivitesi MSS'nin immün sistem etkileri açısından ayrıcalıklı organlar olduğunu düşündürmüştür. Diğer yandan 1974'te Imamoto&Leblond, 1975'te Leibovich & Ross ve 1985'te Movat, beyinde fiziksel hasar sonrası ortaya çıkan inflamatuvar yanıtın non-nöronal dokularla benzerlik gösterdiğini saptamıştır. Bu yanıtta az sayıda polimorfonükleer hücre ve çok sayıda mononükleer hücre rol oynamaktadır. 1988'de Graeber ve ark. MSS'deki inflamasyonda lokal mikroglia hücrelerinin çoğaldığını göstermiştir. 1990'da Coffey, Perry & Rawlins, bu inflamasyona katılan hücrelerin büyük çoğunluğunun periferden çağrılan hücreler olduğunu ve periferden MSS'e olan hücre göçünün bir gecikme süresi sonunda ortaya çıktığını bulmuştur. Gecikme süresinin olası sebebinin kan beyin bariyeri olduğunu düşünmüştür [98]. 20. yy'da yapılan diğer çalışmalar, BOS

ve kan beyin bariyerinin beyni zararlı olabilecek her türlü ajandan koruduğunu göstermiştir.

Günümüzde bağışıklık sistemi hücrelerinin sağlıklı organizmada devriye görevi amacıyla MSS’de bulunabildiği ve ‘glimfatik sistem’ in BOS’tan derin servikal lenf nodlarına bir immünolojik bağlantı oluşturduğu kanıtlanmıştır. Nedergaard ve ark. farelerin sisterna magnasına enjekte ettikleri işaretleyici maddelerin önce paraarteriyel sonra paravenöz boşluklarda; parankime enjekte ettiklerinin ise sadece paravenöz alanda biriktiğini göstermiştir. Bu çalışma, BOS'un periarteriyel alanlardan perivenöz alanlara, beyin parankimi üzerinden yayıldığını ortaya koymuştur [99]. Devamında, derin servikal lenf nodlarına giden yolda meningeal lenfatik sistemin rol aldığı kanıtlanmıştır.

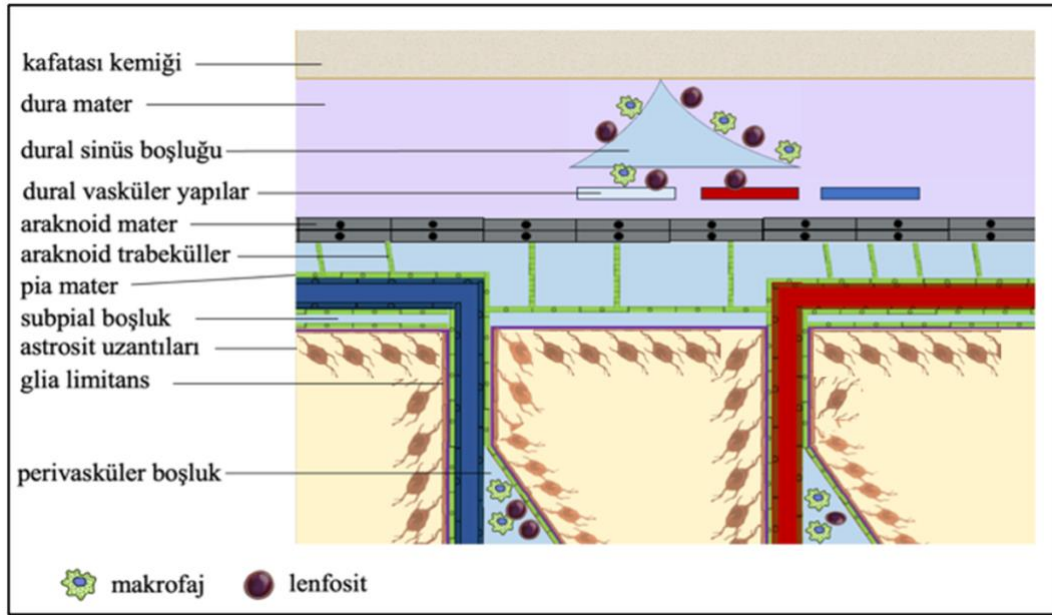
Bu bağlamda MSS’de bağışıklık mekanizmalarının fonksiyonel ve anatomik kompartmanlara göre farklı işlediği söylenebilir. Bağışıklık sistemine karşı korunaklı olan parankim, nöronların fonksiyonel kapasitesini sürdürebileceği bir ortam sağlar. Sınır bölgelerini oluşturan koroid pleksus, subaraknoid ve perivasküler boşluklar ise hem afferent hem efferent immün geçişin gerçekleştiği temel anatomik bölgelerdir.

2.2.3. MSS’nin Bariyerleri:

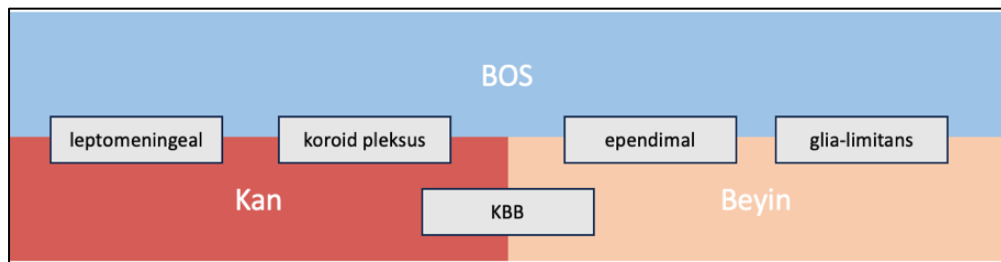
Normal şartlarda beyin ve spinal kordu koruyan immünolojik tolerans, farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilir. Timus ve periferde otoantijenle karşılaştığında otomatik tepki veren bağışıklık hücrelerinin silinmesi veya bu tepkinin düzenleyici hücreler tarafından bastırılması bu mekanizmalara örnek olarak gösterilebilir. Otoimmüniteyi önlemenin üçüncü bir yolu, bağışıklık hücrelerine karşı geçirgen olmayan bir doku bariyeri ile kendi dokularını gizlemektir. Bu son mekanizma, sinir dokusuna toleransın temelini oluşturur[100].

Beyni fiziksel, metabolik ve immünolojik açılardan koruyan bariyerler bulunur (Şekil 2.7). En dışta bulunan kafatası yassı kemiklerle beyni sararak güçlü bir fiziksel bariyer oluşturur. Ayrıca kemik iliğinde eğitimini tamamlamış bağışıklık sistemi hücreleri, kemiklere yapışık olarak seyreden meningeal yapılara salıverilerek immün devriyeye katılır. Dural arteriyel ve venöz yapılar sıkı bağlantı içermez ve büyük moleküller ile hücreleri geçirir [101]. Araknoid mater sıkı bağlantılarla birbirine tutunmuş hücrelerden oluşur. Bu nedenle hücrelerin ya da büyük moleküllerin geçişine

izin vermez. Araknoid materden pia'ya kadar uzanan boşluk subaraknoid boşluk (SAB) olarak isimlendirilir. SAB içinde kan damarları ve beyin omurilik sıvısı yer alır. Subaraknoid boşlukta yer alan yapıları ve beyin parankimini saran yapı, iki hücre tabakasından oluşmuş pia materdir. Pia mater, yoğun fibroblast içeriği ile araknoide uzanan trabekülleri de oluşturur. Pia, sıkı bağlantılar içermediği için görece geçirgen kabul edilse de, eritrositler gibi hücelere geçirgen değildir. Beyni çevreleyen bağ dokunun beyin ile sınırını pial membran oluşturur. Bu sınırın parankim yüzünde ise astrosit bacaklarının sıkı bağlantılarla ve boşluklu bağlantılarla bir bazal membran boyunca birleşerek meydana getirdiği glia limitans yer alır. Glia limitans büyük moleküllere ya da hücelere karşı geçirgen değildir [102-105]. İşlevsel birimler olarak MSS bariyerleri Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2-7. Beynin bariyerleri ([102]'den uyarlanmıştır)



Şekil 2-8. MSS bariyerleri, anatomik olarak yer aldığı yapılarla isimlendirilir.

Kan beyin bariyeri:

Arteriel ve venöz yapılar parankim içine ilerlerken çapları incelerek yerini arteriyol, venül ve kapillerlere bırakır. Bu hat boyunca pia mater de giderek incelik ve endotel altındaki bazal laminayı oluşturur. Endotel tabakası, ekstraselüler matriks elemanlarından oluşan endotelial bazal lamina (BL) tabakası tarafından sarılır. Bu seviyede tunica media kaybolarak yerini BL içinde endotel hücrelerinin gelişimini ve görevlerini destekleyen perisitlere bırakır. MSS’de bir endotel hücresi başına 3 perisit düşerken periferde bu oran 1:100 şeklindedir[106]. İçinde perisitlerin yığıldığı endotelial bazal laminanın altında BOS içeren perivasküler boşluklar bulunur. Perivasküler boşluk, BOS ve antijen sunucu hücreler ihtiva eder [107]. Yer yer bu boşluklar kaybolur. Böylece vasküler lümeninden perisitler ve en dışta glia limitansın oluşturduğu **kan beyin bariyeri** meydana gelir. Astrosit bacakları sıkı bağlantılar ile birleşir ve üzerindeki parankimal bazal lamina ile glia limitans oluşturur. Damar endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, transselüler geçişi engelleyen endotelial enzimler (gama glutamil transpeptidaz gibi) ve glia limitans nedeniyle KBB’nin geçirgenliği oldukça sınırlıdır. Bununla beraber, hayati olaylar için gerekli geçirgenlik, endotel ve perisitlerdeki transporterlar ile sağlanır. Astrositler KBB’i yapısal olarak güçlendirirken metabolik ve pro-inflamatuvar destek de sağlar. KBB’deki hassas dengenin sürdürülebilirliğini sağlayan endotel, bazal lamina, perisit ve astrositlerden oluşan bu yapı ayrıca ‘Nörovasküler Ünite’ olarak da isimlendirilir.

Parankimal, leptomeningeal ve koroideal vasküler yapılarda endotel ve bazal lamina ortak iken, astrosit uzantıları ile bezeli ‘glia limitans’ sadece parankimal damarlarda yer alır [108]. Fizyolojik şartlarda T lenfositler subaraknoid ve perivasküler boşlukta bulunarak beyin parankimine en fazla glia limitans sınırına kadar yaklaşabilir. Bu boşluklarda MSS antijenleri ile karşılaşması mümkün olur. Hastalık durumunda lenfositler perivasküler bir manşon yapısı oluşturur. Proinflamatuvar etki ve matriks metalloproteazlar yardımı ile glia limitans yapısı bozulur. KBB geçirgenliği artar. Böylece parankime lenfosit göçü mümkün hale gelir [109].

Leptomeningeal Kan-Beyin Omurilik Sıvısı Bariyeri:

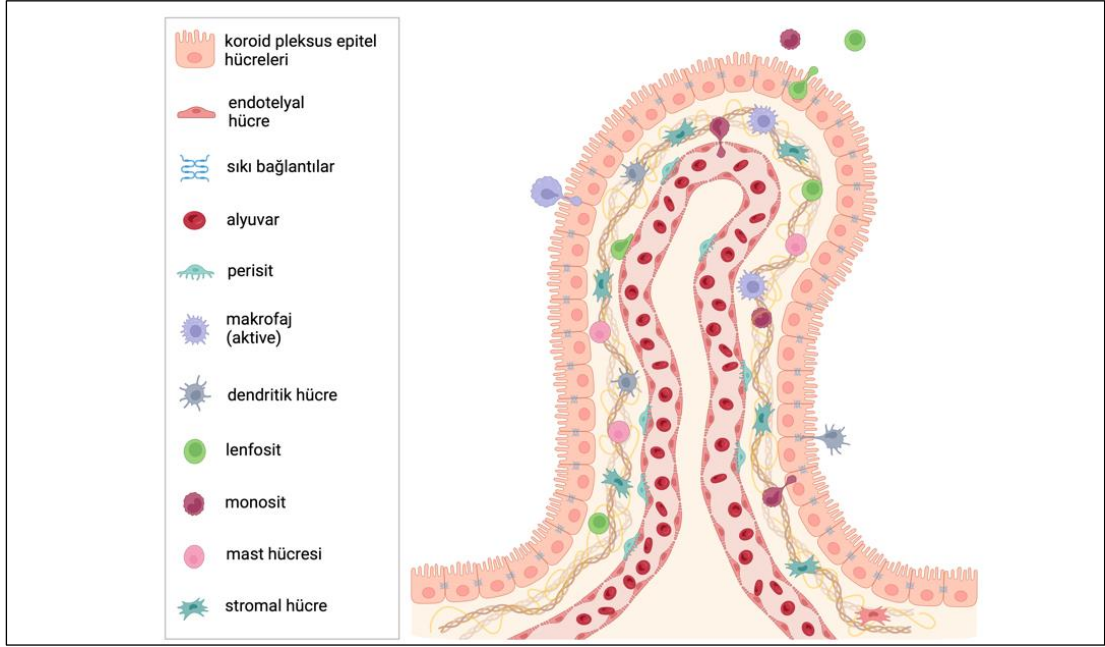
Dura materin vaskülerite ve immün hücrelerden zengin yapısı, kafatası kemiklerinde üretilen B lenfositlerin beyne ulaşmasına ve beyin içindeki immün

hücreler ile antijenlerin periferik dolaşıma geçmesine olanak tanır. Bununla birlikte, araknoid mater, hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar sayesinde dura materi BOS'tan belirgin bir şekilde ayrılmıştır. Ayrıca, subaraknoid boşluktaki tüm damarlar da pial membran ile çevrenmiştir. Pial ve araknoid membranlar birlikte leptomeningeal kan-BOS bariyerini oluşturur [109]. Subaraknoid boşlukta yer alan damarların çevresinde bazal lamina haricinde tabaka yoktur ve bağışıklık sistemi hücrelerinin beyin omurilik sıvısına geçişi için önemli bir yol oluşturur.

Koroid Pleksus Kan-Beyin Omurilik Sıvısı Bariyeri:

BOS'un üretildiği koroid pleksus, epitelyal ve endotelyal hücrelerden oluşan kıvrımlı bir yapıdır (**Şekil 2.9**). Stromasındaki damarların endotel hücreleri, böbrek glomerüllerindeki damarlara benzer şekilde fenestrasyonludur ve sıkı bağlantılar içermez. Buna karşın, BOS ile doğrudan temas eden ependimal hücreler arasında sıkı bağlantılar bulunur. Ependimal hücrelerin ventriküler yüzlerinde yer alan Kolmer hücreleri, fagositoz yapabilir [110]. Sağlıklı bir organizmada, koroid pleksus lenfositlerin devriye yapması için bir giriş noktası olarak görev yapar. Enfeksiyöz hastalıklarda ise, koroid pleksus, enfeksiyöz ajanların beyin parankimine geçebileceği zayıf bir nokta olabilir. Stromadaki makrofaj ve lenfositler bu durumda artar.

Beyin-Beyin Omurilik Sıvısı Bariyerleri: Leptomeningeal yüzde *glia limitans* ve pial membran beyin parankimini BOS'tan ayırmayı sağlar. Ancak perivasküler boşlukta pial membran yerini bazal laminaya bıraktığı için parankim-BOS ayrımı sadece glia limitans tarafından yapılır. Bu bölgedeki AQP4 su kanalları BOS'tan parankime kontrollü su geçişini gerçekleştirir. Periarteriyal boşluktaki BOS glia limitanstan emilir ve interstisyel sıvıya karışır. Aynı zamanda parankimden uzaklaştırılması gereken atıklarla beraber perivenöz boşluklara sürüklenir. Buradan da dural sinüslere boşalır. Ventrikül cidarını kaplayan silli yapıdaki hücrelerden oluşan ependimal bariyer ise, sıkı bağlantılara sahip olmadığı için kısmi bir bariyer görevi görür [111].



Şekil 2-9. Koroid pleksus kesit

2.2.4. Meningeal İmmünite ve İmmün Sistem Hücreleri:

MSS'in hem iç hem dıştan gelen risklere karşı sürekli gözetim altında tutulması bağışıklık sisteminin görevidir. Bağışıklık sistemi ile MSS arasında bir bariyer gibi davranan meninksler farklı oranlarda immün sistem hücrelerine ev sahipliği yaparak aslında MSS-bağışıklık sistemi arasındaki bağlantıları da oluşturur. Beyin parankiminin aksine, bulundurduğu makrofaj, dendritik hücre, doğal lenfoid hücre, mast hücreleri, nötrofiller, B ve T lenfositler ile meninksler sağlıklı koşullarda da inflamasyona yatkın bir ortama sahiptir (**Tablo 2.4**).

Dura materin sinirsel ve vasküler dağarcığı geniştir. Dural vasküler yatak dış ortama açıktır, sıkı bağlantılar yoktur ve endotelial pencereler bulunur [112]. Bu nedenle arter ve kapillerlerle MSS'e taşınan periferik immün hücreler ile periferde ortaya çıkan stres faktörlerinin indirekt bulguları duraya ulaşabilir. Duranın kanı venöz sinüslere drene olur. Kemik kanalları, dura mater ve kafa kemiklerinin kemik iliğini birbirine bağlar. Kafa kemiğinden gelen immün hücreleri ve immün aktif maddeleri venöz sinüslere iletebilir. Parankim ve BOS'ta bulunan MSS antijenleri dural venöz sinüslerde T hücrelerine sunulabilir.

Tablo 2-4. Beyin immün arayüzleri ve immün hücre içerikleri

	Kafa kemik iliği	Dural Venöz sinüs	Paravasküler boşluk	Koroid pleksus
CD4 ⁺ T lenfosit		+	+	+
CD8 ⁺ T lenfosit		+	+	+
B lenfosit	+	+		+
Makrofaj		+	+	+
Nötrofil		+		+
Dendritik Hüc.		+	+	+
MSS Antijeni		+	+	+
Antijen Sunumu		+	+	

Meningeal immün yapılarda baskın olarak bulunan hücreler **T lenfositlerdir**. Dural T lenfositler esas olarak kan kaynaklıdır. Sağlıklı koşullarda BOS'ta bulunan T lenfositler en çok santral hafıza (T_{sh})fenotipindedir. T_{sh} yuvaya dönüş molekülleri de taşıdıkları için MSS'deki görevlerini bitirdikten sonra periferik lenf nodlarına döner.

Kafa kemiğindeki hematopoetik bir nişten kaynaklanan **B lenfositler**, özelleşmiş vasküler yapılar aracılığıyla meninkslere taşınır ve bu bağlantı MSS antijenleri tarafından sürekli eğitilen bir B lenfosit kaynağı oluşturur. B lenfositler kafa kemik iliğinden çıktıktan sonra farklı olgunlaşma evrelerini durada tamamlar. Meninkslerde bulunan farklı evrelerdeki B lenfositlerin oranları kafak kemik iliği ile benzerdir. Dahası, bu oran kan ve dalak ile karşılaştırıldığında da arasında diğer organlar ile olmayan bir benzerlik saptanmıştır [113]. Meninkslerde bulunan ve gelişmekte olan B lenfositler, MSS'e özel olarak kafa kemiğinde üretilir ve başka hiçbir organda saptanmaz. Kan kaynaklı B lenfositler de birey yaşlandıkça meninkslerde görülmeye başlar.

Makrofajlar koroid pleksusta ve MSS’de yer alan bağışıklık hücreleri içinde en büyük grubu oluşturur. Makrofajlar parankim içinde mikroglialar olarak bulunur. Parankim dışında dura, araknoid, pia mater, perivasküler boşluk ve koroid pleksuslarda yer alır. Dural ve leptomeningeal makrofajlar embriyo döneminde yolk kesesinden gelir ve erişkinlik döneminde kandan gelen yeni miyeloid hücrelerle yer değiştirerek sayılarını büyük ölçüde sabit tutar [114]. Bir akut hasarda öncelikle mikroglialar uzantılarını kaybederek aktifleşir. Periferik immün sistemden gelen ilk hücreler nötrofiller olup 2-3 saat içinde MSS’de görünürler. MSS’e göç ettikten sonra nötrofiller mikroglialar tarafından fagosite edilir. İki üç gün içinde periferik makrofajlar gelerek mikroglia aktivitesini baskılar. Devamında T lenfositler MSSdeki inflamasyon alanına göç eder.

2.2.5. MSS’e T-lenfosit Göçü:

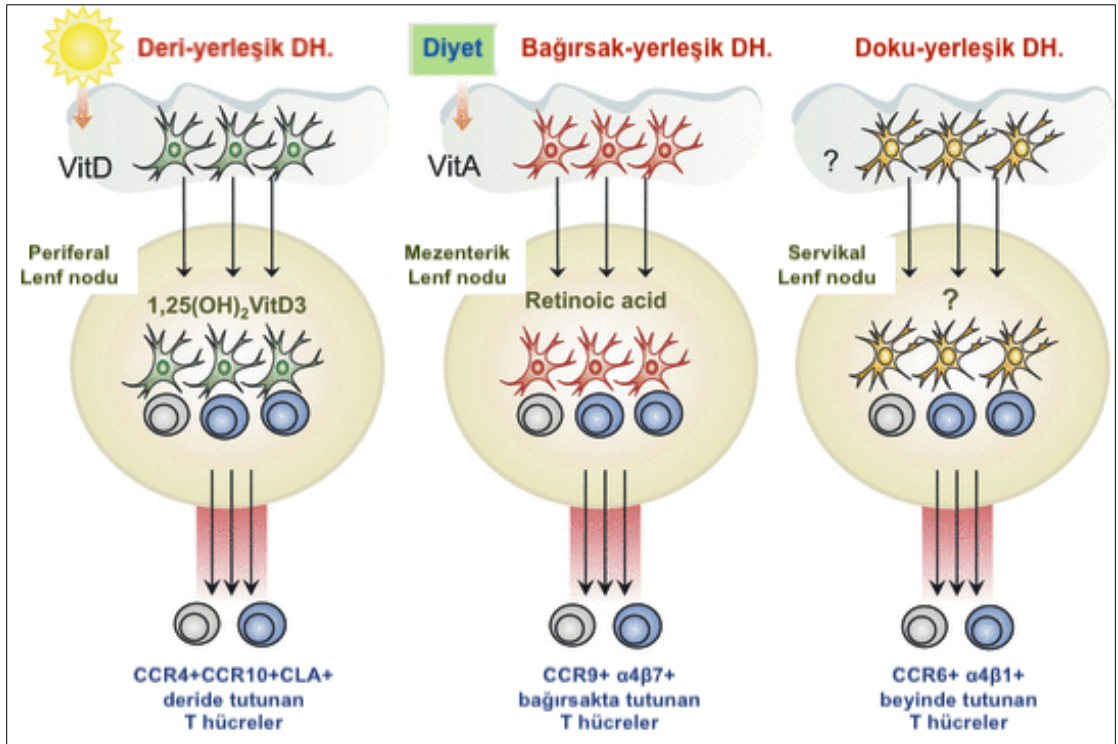
MSS parankimine doğrudan enjekte edilen bir antijen inflamasyon yanıtı oluşturmaz. Ancak beyin ve spinal kordun enfeksiyondan korunmak için çeşitli bağışıklık mekanizmaları ile kuşatıldığı da aşikârdır. Bu nedenle, Multipl Skleroz veya Nöromiyelitis Optika gibi MSS demiyelinizan hastalıklarının patofizyolojisinde periferde aktifleşen immün sistem elemanlarının MSS’e göç ederek inflamasyonu başlattığı fikri doğmuştur. Peki, çok sayıda hendek ve duvarla kuşatılmış MSS kalesi nasıl olur da bağışıklık sistemi saldırılarına açık hale gelebilir?

İnflamatuvar hastalık olmadan T lenfoblastlarının MSS’ye girdiğini gösteren ilk doğrudan kanıt, radyoaktif etiketli T-hücre blastlarının enjeksiyonu ile elde edilmiştir. Devamında yapılan çalışmalar, kan kaynaklı miyeloid hücrelerin hem sağlıklı beynin immün gözetiminde hem de nöroinflamatuvar hastalığın efektör fazında yer aldığını saptamıştır [115]. Hickey ve ark. ise sadece aktifleştirilmiş T lenfositlerin KBB’i geçerek MSS parankimine girebileceğini ve lenfosit subtipi, MHC veya antijen özgüllüğü faktörlerinin göç üzerinde etkili olmadığını göstermiştir [116]. Sonuç olarak, sağlıklı bir merkezi sinir sisteminde, beyin omurilik sıvısına, beyne ve omuriliğe daha çok CD4+ santral hafıza T hücreleri (Tsh) ve düzenleyici alt tiplerindeki yardımcı T lenfositler (Th1 ve Th17) ile daha az miktarda efektör T lenfositler göç eder.

1990’larda Springer ve Butcher, postkapiller venüllerden kana geçen naïve lenfositlerin farklı lenf nodları ve inflame organlara gidebildiğini göstermiştir [117, 118]. Lenf nodlarında belirli antijenlere karşı aktifleştirilen yardımcı T lenfositler (T_H), çekirdeklerindeki farklı transkripsiyon faktörlerinin uyarılması ile çeşitli alt tiplere dönüşür. Örneğin FOXP3 ifadesi ile düzenleyici, T-bet ifadesi ile T_H1, GATA3 ile T_H2 ve ROR- $\gamma\delta$ ile T_H17’ye farklılaşır. Taşıdıkları kemokin, selektin ve integrin reseptörlerine göre güvenliğinden sorumlu oldukları bölgelere yönelir ve o bölgedeki organlara yüksek özgüllükle tutunur. Bununla birlikte bu organların neresinden parankime geçeceklerini de reseptör-ligand etkileşimleri belirler. Dört basamakta tamamlanır: 1.Selektin-reseptör etkileşimi ile adhezyon, 2. Kemokin-reseptör etkileşimi ile integrinlerin aktivasyonu 3. Sıkı bağlanma, 4.Ekstravazasyon. Örneğin L-selektin, Naif T hücreleri, B hücreleri ve bazı hafıza T hücrelerinde bulunur. Peripheral Node Addressin (L-selektin-PNAd) etkileşimi, lenfositlerin yüksek endotelial venüller (YEV) yoluyla lenf düğümlerine girişini sağlayan önemli bir moleküler etkileşimdir. Ayrıca LFA1-ICAM1 etkileşimi ve CCR7-CCL21 etkileşimi de naif T lenfositlerin ve santral hafıza T lenfositlerin lenf düğümlerinde toplanması ile sonuçlanır. Ayrıca CLA-E selektin, CCR4-CCL17 ve CCR10-CCL27 etkileşimleri T lenfositlerin deriye göç etmesini sağlar. Vitamin D deriye, Vitamin A ise bağırsağa göç için gereken proteinlerin ifadesine yardımcı olur. Sonuç olarak CCR4⁺CCR10⁺CLA⁺ özelliğindeki T lenfositler deride, CCR9⁺ α 4 β 7⁺ T lenfositler bağırsakta tutunur. Beyinde birikecek T lenfositlerde ise temel olarak α 4 β 1⁺CCR6⁺ ifadeleri saptanmıştır. Ancak buradaki antijen sunucu hücrelerin bu görevini yapmasını kolaylaştıran koenzimler henüz bilinmemektedir.

Kan kaynaklı miyeloid hücreler beyne farklı yollardan girebilir. Kan beyin bariyeri-parankime ve koroid pleksus-BOS-parankime en çok çalışılan göç yollarıdır. Schmidt ve ark ise, fare ve sıçanlarda yaptığı deneylerle, merkezi sinir sistemine girecek lenfositlerin koroide pleksustan ziyade, öncelikle ön ve orta beyindeki velum interpositum ve cisternae ambiens gibi BOS içeren ekstraventriküler bölgelerde biriktiğini göstermiştir. Lenfositlerin kan-beyin bariyerinden geçişi inflamasyon varlığında ve sağlıklı durumlarda birbirinden farklıdır. Engelhardt ve ekibi, naif T hücrelerinin daha önce beyin antijenleriyle karşılaşmış olsalar bile merkezi sinir sistemine (MSS) giremediğini, ancak aktivasyon sonrası kan-beyin bariyerini (KBB)

geçebildiğini göstermiştir. Kan akımında çok hızlı hareket etmesi nedeniyle, MSS'e girecek lenfositlerin hızı yuvarlanma mekanizması ile azaltılır. Daha sonra, endoteldeki CCL19 ve CCL21 gibi kemokinlerin etkisiyle aktivasyonları artar ve kan beyin bariyerine yapışırlar. P-selektin ve L-selektin'in immün hücrelerin MSS'ye göçünde direkt rol oynamadığı [119], buna karşılık ICAM-1, ICAM-2 ve özellikle $\alpha 4$ -integrin proteinlerinin T lenfosit transendotelial migrasyonunda görev aldığı yine Engelhardt ve ekibinin çalışmaları ile kanıtlanmıştır [120-123]. Endotel hücreleri ve T lenfositler arasında bir iletişim olduğu ve endotel hücreleri T lenfositlere ulaşacak sinyalleri yaysa bile immün sistemin antijen sunan hücreleri gibi bir aktivasyona neden olmadığı gösterilmiştir [124]. Wolburg ve ark. ICAM-1 ve VCAM-1'in hem sağlıklı hem DOE koşullarında koroid pleksus epitel hücrelerinde ifade edildiğini, MAdCAM-1'in ise sadece DOE varlığında ortaya çıktığını göstermiştir. Fenestre kapillerlerin endotelinde bulunmayan bu integrinlerin inflamasyon durumunda koroid pleksusun epitel hücrelerinde artışı, periferal immünite-MSS ilişkisi içinde koroid pleksusa yönelik ilgiye katkı sağlamıştır [125].



Şekil 2-10. T lenfositler ve çeşitli organlara göçlerinde görevli reseptörler

Deneysel alerjik ensefalomyelit ve *Corynebacterium parvum* kaynaklı merkezi sinir sistemi (MSS) inflamasyonunda yer alan T lenfositlerin büyük ölçüde CD4+ olduğu ve belirgin bir aktif/hafıza fenotipi (CD44^{high}/LFA-1^{high}/ICAM-1^{high}/CD45RB^{low}) gösterdiği, α 4 β 7-integrin yerine α 4 β 1-integrin taşıdığı gösterilmiştir. Bunun aksine, periferik organların inflamasyonlarından elde edilen T lenfositler düşük seviyelerde β 1-integrin ifade eder ve MSS'de görülen T lenfositlerin taşıdığı ligandlara sahip değildir. Bu durum, MSS'de bulunan T lenfositlerin fenotipik olarak farklı bir 'MSS-odaklı' T lenfosit popülasyonu oluşturduğu varsayımına yol açmıştır [126]. Röhnelt ve ark. da farelerin periferik lenf düğümleri (PLN), mezenterik lenf düğümleri (MLN) ve periferik kanından (PBL) alınan T lenfositlerinin, uyarılmamış mikrodamar endotelyumu boyunca göç etme kapasitelerini incelemiştir. Göç eden T hücre popülasyonunun, aktifleşmiş ve hafıza fenotipinde çoğunlukla LFA-1/CD44/ICAM-1 veya daha az CD45RB ile LFA-1 ifade eden T-lenfositler içeren özel bir göçmen T-lenfosit kümesinden oluştuğunu göstermiştir [127]. Kraus ve ark. RRMS hastalarında, ICAM-1'in BOS'taki konsantrasyonunun inflamasyon ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğunu göstermiştir [128]. ICAM-3 ve CD45RA ise naif T-lenfositlerin ifade ettiği yüzey proteinleri olup atak halindeki MS hastalarında BOS seviyelerinde artış, sağlıklı gruba kıyasla kan seviyelerinde azalma kaydedilmiştir. Ayrıca nüks yaşayan ve ivmp tedavisi alan hastaların kanlarında CD45RA ve ICAM-3 ifade eden T-lenfositlerin tedavinin 10. Gününden itibaren azaldığı saptanmıştır ve bu nedenle MS tanı ve tedavi sürecinde bir belirteç olarak önerilmiştir [129]. Yine Kraus ve ekibi, kanda çözünebilir ICAM-1 ve ICAM-3 seviyelerinin İnterferon- β _{1b} alan hastalarda stabil kaldığını, tedavi almayan hastalarda düştüğünü göstermiştir [130].

Beyne gidecek yardımcı T lenfositler (T_H17) ve B lenfositlerde CCR6 ile CCR20 ifadesi saptanmıştır. Koroid pleksustan sağlıklı beyne göç eden lenfositler üzerindeki CCR6 ve CCR20 ile hasta beyne göç eden lenfositler üzerindeki CCR20, epitel hücrelerinde bulunan interselüler ve vasküler hücre adezyon molekülleri (ICAM1 ve VCAM1) ile etkileşime girer. Ancak MOG'a karşı aktifleştirilmiş T_H1'ler gibi inflamasyonun devamını getirecek T lenfositler kan beyin bariyerinden CCR6 bağımsız ve çoğunlukla α 4 β 1-integrin ile etkileşime girerek geçer. CCR6 bağımlı giriş sadece beyinde, α 4 β 1-integrin bağımlı giriş beyin ve spinal korddaki geçişlerde

görevlidir. Bu ekstravazasyonda ayrıca LFA-1, $\alpha 1\beta 2$ integrin ve ICAM-1 reseptörleri de görev alır. Ek olarak MSS'de CCL19 sunan endotel hücreleri dolaşımda bulunan ve CCR7 ifade eden hafıza T-hücrelerinin BOS'a geçmesini sağlar. Ancak kan beyin bariyerinin bozulduğu ya da inflamasyonun yer aldığı durumlarda lenfositlerin MSS'e alınmasında temel görev Antijen sunan hücrelere (ASH) aittir. Endotelden interne edilen lenfositler beyin omurilik sıvısı içinde dendrositler gibi ASH tarafından uyarılırsa parankime geçebilir[131-133].

Lökositlerin ekstravazasyonu sadece post-kapiller venüller seviyesinde gerçekleşir ve kan beyin bariyeri endotelini nasıl geçtiği de merak konusudur. Elektron mikroskopi ile yapılan çalışmalarda endotel çevresindeki lökositlerin hücreler arasındaki bağlantılara yakın olması ve endotel hücrelerindeki adherens moleküllerinin lökosit göçü üzerinde etkili olduğunun kanıtlanması, paraselüler geçiş mekanizmasını düşündürmüştür [134]. Bu geçiş, göç eden lökositin endotel bağlantılarında yer alan transmembran proteinlerinin homofilik etkileşimlerini geçici olarak değiştirdiği bir fermuar modeli ile tasvir edilir [135]. Ancak morfolojik çalışmalarda endotel hücreleri ve lenfositlerin hücre göçüne hazırlanırken birbirlerine uzantılar geliştirdikleri ve sıkı bağlantıların intakt kaldığı da gösterilmiştir ve bu transendotelyal geçişi gündeme getirmiştir [136]. İki görüşün de farklı çalışmalarda savunulduğu bilinmekle birlikte paraselüler geçiş en çok kabul edilen mekanizmadır.

2.2.6. MS Patofizyolojisinde Özgü Olmayan T Lenfosit Cevabının Yeri:

Multipl Skleroz (MS) ve diğer otoimmün hastalıklarda, spesifik antijenlere karşı aktive olan T lenfositlerin yanı sıra, daha geniş ve nonspesifik bir T lenfosit aktivasyonunun da rol oynadığı bilinmektedir. MS patofizyolojisinde de önemli yere sahip bu durum ilk zamanlarda, bu durum spesifik T lenfositlerin neden olduğu bir 'çağırma' mekanizması ile açıklanmaktaydı[137]. Ancak, araştırmalar, 'bystander aktivasyonu' olarak adlandırılan patolojik bir fenomenin, otoimmün hastalıkların gelişimine katkıda bulunan bağımsız bir mekanizma olduğunu ortaya koymuştur[138]. Bystander (başkası tarafından) aktivasyon antijene özgü olmayan lenfositlerin T hücre reseptörleri yoluyla (TCR) heterolog aktivasyonu olarak tanımlanır. Bu aktivasyon, ortak sinyal reseptörlerinin ligandları, sitokinler, kemokinler, patojenle ilişkili moleküler desenler ve mikrobiyal parçacıklarla dolu ekstraselüler veziküller gibi

enflamatuvar bir ortamı destekleyen dolaylı sinyallerle sağlanır[139]. Birçok çalışma, yüksek CD44 seviyelerine sahip CD8+ T bellek hücrelerinin başkası tarafından aktivasyon ile aktive edilebileceğini tanımlamıştır[140]. CD4+ T hücrelerinin başkası tarafından aktivasyonu, CD8+ T hücrelerine göre daha az etkilidir. Ancak antijen spesifik CD4+ T hücreler tarafından salıverilen IL-2, yüksek seviyelerde CD25 ifadesine sahip CD4+ T hücreleri heterolog olarak uyarabilir[141]. Martino ve ark, MS hastalarında antijenden bağımsız olarak interferonlar yoluyla kalsiyum kanallarının uyarılması üzerinden gerçekleşen bir özgül olmayan T lenfosit aktivasyonu olduğunu göstermiştir [142]. Lee ve ark. CD4+ bellek hücrelerinin özgül olmayan uyarımının DOE şiddetini artırdığını kanıtlamıştır[143].

2.3. Deneysel Multipl Skleroz Modelleri:

Farklı MS evrelerinden sorumlu farklı hücrel mekanizmalar nedeniyle, hastalığı tek bir modele dayanarak bir bütün olarak açıklamak mümkün değildir. İnsan MS patofizyolojisini anlamak için birbirinden farklı mekanizmalarla hayvan modelleri oluşturulmuştur. Hiçbir mekanizma MS çalışmak için her yönüyle yeterli düzeyde değildir[144, 145].

Sıçan beyninin fare beynine göre daha büyük olması ve laboratuvar ortamında daha sakin davranışlar sergilemeleri nedeniyle farelerden daha avantajlı görülse de, son yıllarda fareler, yapılan çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir.

MS modelleri farelerde şu mekanizmalar ile oluşturulmaktadır:

Virüsle indüksiyon:

Viral hastalıkta gri cevher daha baskın tutulmak üzere, enfekte beyin hücreleri lizise uğrar, sonra hasar yan hücrelere yayılır. Bu patolojik mekanizmada makrofajlar da görev alır ve makrofaj depleksiyonunda hastalık yeteri kadar hasar oluşturmaz. Virüsle deneysel demiyelinizasyon indüksiyonu modellerinde bir pikornavirüs olan Theiler'in Murin Ensefalomyelit Virüsü (TMEV) ve fare hepatit virüsü (koronavirüs) kullanılır. Bu indüksiyon, beyin ve omurilikte inflamatuvar aktiviteye neden olur ve CD4+ ve CD8+ T lenfositler, B lenfositler, mikroglia ve makrofajlar gibi bir karışımın katkıda bulunmasıyla birlikte demiyelinizasyon gelişir[146]. Fonksiyonel defisit ve histopatolojik hasarın devam etme süresi diğer hayvan modellerine göre daha uzun

zaman alır. Bu model genellikle remiyelinizasyon çalışmaları için uygundur. TMEV'ün hastalık oluşturma gücü, hostun türüne ve genetiğine göre farklılık gösterir.

Oligodendrositlerin apoptozunu oluşturan modeller:

Hücre tipine spesifik difteri toksin-A ekspresyonu: Cre-lox-mech tekniği ile sadece oligodendrositlerde, difteri toksininin salt alfa subünitini aktif hale getirme yoluyla oligodendrositlerin apoptoza gitmesi sağlanır. Ancak bu çalışmalarda apoptoza gitmiş oligodendrositlerin miyelini yerel makrofajlar tarafından ortadan kaldırılmasına rağmen, yeteri kadar immün cevap başlamamaktadır. Bu durum, MS'te apoptoza gitmiş hücrelerin, periferden gelen kan hücrelerinin de yardımıyla hızlı bir şekilde temizlenmesi, buna rağmen DT- alfa ekspresyonu ile oluşturulan apoptozda mikrogliaların bu temizliği daha yavaş yapması nedeniyle olabilir.

Hücre tipine göre spesifik difteri toksin reseptörü ekspresyonu: MBP kodlayan genin promoterine bağlı DTR geni yerleştirilir. İntraperitoneal DT verildiğinde oligodendrosit apoptozu oluşturulur. Ancak DT-alfa ekspresyonu ile yapılan modelden daha az demiyelinizasyon cevabı oluşturur. Bu eksik cevabın, DTR ekspresyon modelinde aksonal etkilenmenin daha ağır olup demiyelinizasyon net olarak ortaya çıkmadan farelerin ölmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Oligodendrositlerin apoptozunun doğrudan indüklenmesi: Hücre içinde doğal olarak bulunan ve APAF-1 ile birleştiğinde apoptozu uyaran Caspase 9, modifiye edilerek, FK-506 molekülünün bağlanabileceği yeni bir domain eklenir. Bir hedefe yönelik hücre ölümü çalışması olarak iCP9, oligodendrosit promoterlerine yerleştirilir. Böylece iCP9 taşıyan farelere FK-506 enjeksiyonu yapıldığında spesifik olarak oligodendrosit hasarı başlatılır. Bu modelde demiyelinizasyon 24 saatte başlar ve davranışsal etki göstermeden remiyelinizasyon hızlı bir şekilde gerçekleşir.

İmmün Mekanizma-Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE):

Deneysel Otoimmün Ensefalomyeliti (DOE) indüklemek için miyeline karşı reaktif özellik kazanmış T lenfositler sağlıklı farelere enjekte edilir. Bu T lenfositler ya otoreaktif T hücre reseptörleri taşıyor ya da daha yaygın kullanıldığı gibi belirli peptidlere karşı in vivo uyarılarak elde edilmiş olabilir. DOE indüksiyonunda farelere

T lenfosit yanında bir veya daha fazla miyelin peptidi, bağışıklığı güçlendiren bir adjuvan ve boğmaca toksini de enjekte edilir[145]. Bu uyarıcılar, miyeline ve aksonlara karşı inflamatuvar otoimmün bir yanıtı uyandırır ve periferik immün sistemden merkezi sinir sistemine infiltrasyon yaparak demiyelinizasyon oluşturan hücrelerin çağrılmasını sağlar [147, 148].

Teorik olarak, nöron hücresinin her alt birimine karşı antikor üretilip DOE modellerinde kullanılabilir. En çok kullanılan antijenler Membran oligodendrosit basic protein , Myelin basic protein (MBP), Proteolipid protein (PLP), Myelin Associated Glikoprotein (MAG) olmakla beraber her antijene karşı kullanılan antikor her fare türünde benzer kliniği oluşturmamaktadır. Örneğin SJL/J'lerde antiPLP ile yapılan indüksiyon RRMS'i yordarken, C57BL/6'lerde anti-MOG ile oluşturulan modelde PPMS kliniği oluşmaktadır [149-151].

DOE modelinde, MS'e benzer olarak beyaz cevher gri cevherden daha fazla etkilenir. Spinal kord beyinden daha çok tutulur. DOE oluşturulurken, real MS sürecindeki gibi hangi lokasyonda lezyon oluşacağı ve ortaya çıkacak fonksiyonel defisit çoğunlukla öngörülemez. DOE'nin bu modeli monofaziktir, progresif patoloji ve fonksiyonel kayba sebep olmaz. İnsanda yapılan postmortem çalışmalarda MS plakları CD8⁺ T-lenfosit yönünden daha zengin olsa da, DOE'de CD4⁺ T-lenfositler daha baskın rol alır. B hücrelerinin MS hastalığındaki önemi son zamanlarda giderek daha çok ortaya konmuşsa da, DOE modellerinde B hücre rolü geri plandadır[152].

DOE'nin, RRMS'in lezyon oluşumu ve enflamatuvar hasarını modellediği düşünülmektedir. Bununla birlikte, yoğun bağışıklık yanıtı ve demiyelinizasyon lezyonlarının stokastik görünümü, hastalık ilerlemesi ve remiyelinizasyon üzerinde santral sinir sisteminin lokal bağışıklığının öneminin çözümlenmesini zorlaştırmaktadır Bu nedenlerle, araştırmacılar, lezyon oluşumunun ve çevresel bağışıklık hücre infiltrasyonunun stokastisitesini sınırlayan toksin tabanlı hayvan modellerini kullanabilirler[153].

Toksik demiyelinizasyon modelleri:

Demyelinizasyon basamakları ve ardından gelen remiyelinizasyonu çalışmak için, başlıca toksin tabanlı demiyelinizasyon modelleri kullanılmaktadır. Toksik demiyelinizasyon modellerinde temel olarak oligodendrositler hedef hücre olarak

haraplanır ve innate immün sistem aktivasyonu yardımıyla oluşan fokal inflamasyon, adaptif immün hücreleri de uyarır. Toksik demiyelinizasyon ve sonrasında oluşan remiyelinizasyon süreçleri eş zamanlı olarak birbirinden farklı lokasyonlarda gerçekleştiği için remiyelinizasyon çalışmaları için kullanılmaya uygundur[154, 155].

Lizolesitin ethidium bromid, anti, GalC antikorları fokal, kuprizon ise sistemik toksinler grubuna girmektedir[156, 157]. Lizolesitin ve Etidyum bromid, torasik spinal kord, korpus kallozum, optik sinir, caudal cerebellar pedinkülde demiyelinizasyon oluşturur. MS'e göre daha hızlı remiyelinizasyon süreçlerini gözlemlemek için kullanılan bu ajanlar, çalışmalarda birtakım limitasyonlar nedeniyle MS modelinden uzaklaşmaktadır. Öyle ki, Etidyum bromid bir DNA interkalasyon ajanıdır. Beyaz cevhere enjekte edildiğinde oligodendrositlerle beraber astrositlerin de apoptoza gitmesine yol açar. Böyle bir durumda oligodendrosit progenitor hücreleri (OPH) astrosit rehberliğinden yoksun kaldıklarında Schwann hücrelerine farklılaşmaktadır. Ancak MSte remiyelinizasyon oligodendrositler tarafından oluşmaktadır.

Demiyelinizasyonun alternatif bir toksin tabanlı modeli ise korpus kallosum ve hipokampus gibi belirli beyaz madde bölgelerinin demiyelinizasyonuna neden olan kuprizonun diyetle tüketimidir[158]. Demyelinizasyonu indüklemek için kullanılan toksin tabanlı yöntemler arasında Bis-sikloheksanon-oksaldiazon veya yaygın adıyla kuprizonun, yakın zamanda yapılan bir sistematik inceleme ve meta-analizde en yaygın olarak kullanılan MS modeli olduğu bulunmuştur[157]. Kuprizon, kemirgenler tarafından besin içinde tüketildiğinde belirli beyin bölgelerinde oligodendrositlerin ve bu nedenle miyelinin kaybına neden olan bir bakır şelatörüdür. Kuprizon, sınırlı kan-beyin bariyeri bozukluğu ve çevresel bağışıklık hücre infiltrasyonu ile birlikte belirli beyin bölgelerinde oligodendrosit ve miyelin kaybına neden olur. 1950 yılında ilk kez tanımlanmasına rağmen ve günümüzde demiyelinizasyon ve remiyelinizasyonu çalışmak için bir model olarak yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kuprizonun oligodendrosit popülasyonu üzerindeki toksik etkilerini nasıl ortaya çıkardığı tartışma konusudur.

2.4. Toksik Demiyelinizasyonun Tarihi Ve Kuprizon Modeli Gelişimi

2.4.1. Beyin Ödemi ile İlgili Toksikoloji Deneyleri:

20. yüzyılda, birçok araştırmacı tarafından "beyin ödemi" ve "status spongiosus" üzerine çalışmalar yapılmıştır. 1905 yılında Reichardt yaptığı histopatolojik çalışmaların sonucunda, beyindeki sıvı fazlalığının "beyin ödemi" ve "beyin şişmesi" şeklinde iki farklı patoloji sonucunda ortaya çıkabileceğini ifade etmiştir[159]. Bakay ve Lee ise bu terimlerin tüm patolojiyi ifade etmekte yetersiz kaldığını öne sürmüştür[160]. 138 olguda beyin ödemi ile ilgili makroskopik ve mikroskopik ölçüde özelliklerin tanımlandığı geniş çaplı bir derleme ile, bu tarz çalışmalarda elde edilecek sonuçların beyin ödemi etiyojisi (**Tablo 2.4**) ve deneyde kullanılan yöntemler (**Tablo-2.5**) tarafından etkileneceği bildirilmiştir[161].

Tablo 2-5. Beyinde ödemin tanımlandığı hastalıklar

Referans	Hastalık
Schreinker	Sıcak çarpması
Schreinker	Nefrit
Schreinker	Alerjik Hastalıklar
Schreinker	Trombositopenik purpura
Smith & Jones	Canine Distemper
Feigin & Popoff	Hipertansiyon
Adachi ve ark.	Hipertansiyon
Crome	Hiyalen Pannöropati
Malamud	Fenilketonüri
Gerstl ve ark.	Fenilketonüri
Silberman	Akçaağaç Şurubu Hastalığı
Korey ve ark.	Akçaağaç Şurubu Hastalığı
Cancillia & Barlow II	Koyunlarda görülen ataksi

Markson & Terlecki	Keçi ve Kedilerde kortikal serebral nekroz
Blackwood & Cummings	Diffüz Serebral Skleroz
Sasks ve ark	Kanavan Sklerozu
Kolkman	İnfanil Spogiyöz Nörodistrofi
Globus & Strauss	Progresif Dejeneratif Subkortikal Ensefalopati
Chou & Waisman	Homosistinüri
Jones & Nevin	Subakut Spongiform Ensefalopati
Nevin ve ark.	Spongiform Serebral Atrofi
Gibbs ve ark.	Creutzfeldt-Jacob Hastalığı
Greenhouse & Schneck	Subakut Spongiform Ensefalopati
Crompton	Alper Hastalığı
Meyer ve ark	Heidenhein Sendromu
Banker ve ark.	Spongiyöz Dejenerasyon
Buchanan & Davis	Spongiyöz Dejenerasyon
Wolman	Spongiyöz Dejenerasyon
Zurhein ve ark	Spongiyöz Dejenerasyon
Canavan	Spongiyöz Dejenerasyon
Van Bogaert & Bertrand	Spongiyöz Dejenerasyon
Feigin ve ark.	Spongiyöz Dejenerasyon
Ule	Spongiyöz Dejenerasyon
Gambetti ve ark.	Spongiyöz Dejenerasyon
Adachi ve ark.	Spongiyöz Dejenerasyon

Papin ve ark.	Spongiyöz Dejenerasyon
Jellinger & Seitelberger	Spongiyöz Dejenerasyon
Gonatas ve ark.	Subakut Spongioform Ensefalopati
Marin & Vial	Subakut Spongioform Ensefalopati
Sluga & Seitelberger	Subakut Spongioform Ensefalopati
Crompton iki kaynak	Subakut Spongioform Ensefalopati
Schreinker iki kaynak 156,157	Tümör ilişkili
Greenfield	Tümör ilişkili
Perret & Kernohan	Tümör ilişkili
Stewart-Wallace	Tümör ilişkili

Stern, ödemi oluşturan sıvının çoğunlukla hücreler arası sıvıda biriktiğini göstermiştir[162]. Devam niteliğindeki çalışmalarda ödemin ekstrasellüler alanda değil, miyelin tabakalarının arasında olduğu kanıtlanmıştır. Klatzo ve ark, toksik kimyasallara maruz bırakma ve dondurma yollarıyla oluşumu indüklenen ödem sıvısında PAS pozitif materyal gözlemlemiştir. Tümör hücrelerinin implantasyonu ya da trietiltin zehirlenmesiyle indüklenen ödem sıvısında PAS pozitif boyanma veya sudanofilik özellik bulunmamıştır. Geleneksel hücre boyamaları ile yapılan deneylerde ödem nedeniyle miyelinli lifler içeren beyaz cevherin daha soluk boyandığı, subkortikal arkuat liflerin korunduğu gözlenmiştir. Beyin ödemi, periventriküler gri madde, serebral ve serebellar korteks, dentat çekirdek, bazal ganglia, hipotalamus ve talamus ile beyin sapında daha az sıklıkla bulunmuştur.

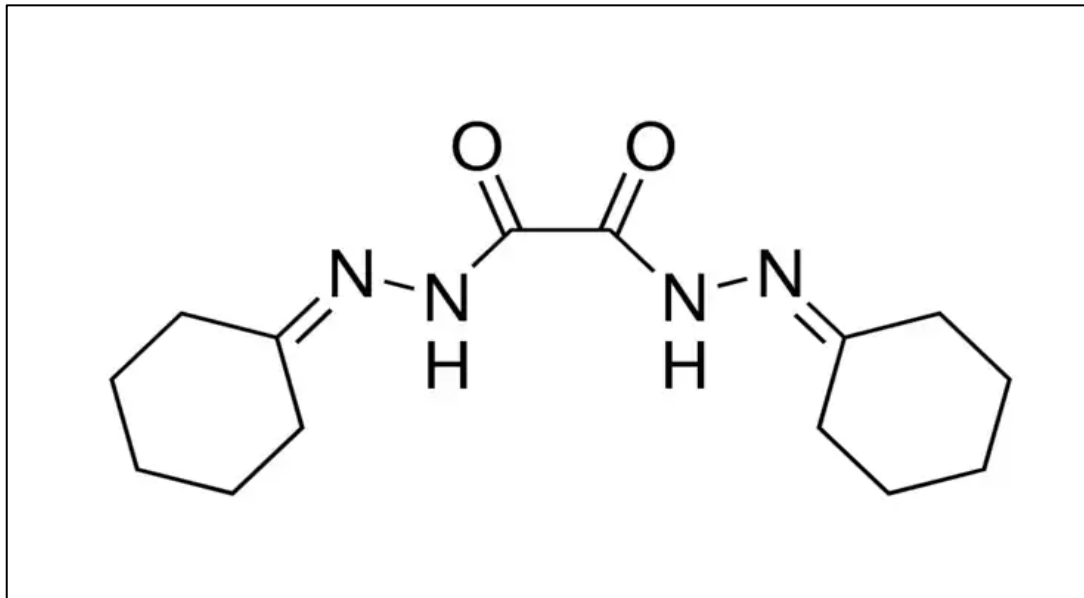
Beyaz madde glial hücreleri, beyin ödemi durumunda şişerler ve çoğalırlar[160]. Astroglial hücrelerde görülen hipertrofi, hiperplazi ve fibriller gliozis

gibi değişiklikler, ödemin akut aşamasında ortaya çıkar[159, 163, 164]. Oligodendroglialarda akut dönemde görülen değişiklikler ise şişme, asidofilik değişim ve nükleer homojenizasyonu şeklindedir. Geç dönemde ise oligodendroglial hücrelerin sayısı azalmaktadır. Damar duvarlarının kalınlaşması ve hiyalinizasyonu beyin ödeminin geç dönemlerinde gözlemlenmiştir [159, 165-167].

Yukarıda bahsedilen deneylerde beyin ödemi oluşturmak amacıyla uygulanan yöntemler glial tümör implantasyonu, radyasyon (alfa parçacıkları) maruziyeti, dehidratasyon, hipotermi ve toksik bileşikler (ouabain, metrazol-pentylene tetrazol, tiyofen, B-B' iminodipropionat, trietiltin sülfat, gümüş nitrat, hidrojen siyanür) şeklindedir [168-183]

2.4.2. Kuprizon Modelinin Evrimi:

Kuprizon (Bis-sikloheksanon-oksalhidrazon) ile yapılan ilk toksikolojik çalışmalar, bakır şelasyonunun sistemik etkileriyle ilgiliydi (Şekil 2.10). Kuprizon 1950 yılında Gustav Nilson tarafından ilk kez tanımlanmıştır. Nilson, kuprizonun bakır için hassas bir gösterge olduğunu ve bakır varlığında renk değişimi meydana getirdiğini bulmuştur [184]. Peterson ve Bollier, 1955 yılında[185], serum bakırını ölçmek amacıyla yaptıkları deneylerde 1 mol oksaldihidrazid ve 2 mol



Şekil 2-11. Bis-sikloheksanon-oksalhidrazon

sikloheksanondan sentezledikleri bir tür bakır şelatörü olan kuprizonun kullanılabilirliğini bulmuştur.

1965 yılında, Carlton bakır şelatörü olarak sodyum dietil-ditiyokarbamat, benzoinksim ve kuprizon kullanarak farelerde bakır şelasyonunun etkilerini araştırmıştır [186]. Dietil-ditiyokarbamat ve benzoinksim farelere oral yoldan uygulandığında, büyümeyi engelleme, gebe farelerde düşüklere yol açma, makroskopik ya da mikroskopik lezyonlar oluşturma gibi toksik etkilerde bulunmamıştır. Kuprizonlu beslenme ise gebeliği kesintiye uğraticı, büyümeyi azaltıcı etkilere ve pareziye neden olmuştur[187]. Ayrıca sinir sisteminde makroskopik ve mikroskopik lezyonlar meydana getirmiştir. Sıklıkla medulla oblongata, mezensefalon ve serebellar kortekste yer alan lezyonlarda astrogliazis, non-inflamatuar demiyelinizasyon ve hidrosefali yaygın olarak görülen bulgular arasındadır.

0,5% kuprizon diyetine sırayla 25, 50 ve 100 ppm bakır takviyesi yapılmış ve diyete eklenen bakırın şelatör tarafından indüklenen sinir lezyonlarını önemli ölçüde değiştirmedeği görülmüştür. Üçüncü gününde başlayarak %0,5 ve %0,3 kuprizon ile beslenen gebe fareler düşük yapmıştır. Gebeliğin daha erken döneminde (dokuzuncu gününde) beslenmeye başladığında, yavrulardaki ölüm oranı artmıştır. %0,1 kuprizon ile beslemenin, üçüncü veya dokuzuncu günde yapılması gebeliğe zarar vermedi. %0,5 kuprizon diyeti gebeliğin 9. gününde uygulandığında, diyete eklenen 130 ppm bakır takviyesi sonucunda canlı yavru sayısı arttığı ve kuprizonlu beslenme gebeliğin 3. gününden itibaren verilmeye başladığında diyete eklenen 130 ppm bakır takviyesinin canlı yavru doğumu için yeterli olmadığı görülmüştür. Carlton'un sonuçlarına göre[188] kuprizon toksiktir ve etki mekanizması salt bakır şelasyonu aracılıklı değildir. Carlton, kuprizonun belirli enzimleri inhibe edebileceğini öne sürmüştür.

Kuprizonun kimyasal öncülleri de (sikloheksanon ve oksaldihidrazid) olası toksik etkileri açısından araştırılmıştır. Bu öncüllerin %0,5 diyet yoluyla verilmesi, oksaldihidrazid alan grupta hafif büyüme kısıtlaması dışında toksisiteye ilişkin histopatolojik veya klinik kanıt oluşturmamıştır.

Carlton, kuprizonla beslenen farelerde hidrosefalinin ve süngerimsi dejenerasyonun indüksiyonunu çalışmış ve toksisiteye karşı panzehir denemiştir [187].

Bu çalışmalarda, günlük gereksinim duyulan miktarın 1000 katı kadar tiamin, B12 vitamini ve folik asit ile diüretik (Diuril) takviyesi denenmiş ancak önemli bir panzehir etkisi göstermemiştir. Çoklu vitamin solüsyonu, riboflavin ve A vitamini, deney süresince mortaliteyi azaltmış ancak hidrosefali insidansını düşürememiş veya süngersi dejenerasyonun lezyonlarını önleyememiştir. Yemdeki 130 ppm ve 260 ppm bakır seviyeleri, %0,2 kuprizon ile beslenen farelerde hidrosefali insidansını azaltmada etkili olmuştur. Bakır takviyesi, beyin ödemi, süngersi dejenerasyon ve astrogliazis lezyonları üzerinde etkisiz kalmıştır.

Kuprizon beslemesinin başlama yaşı arttıkça, farelerin hidrosefali geliştirme olasılığının azaldığı gösterilmiştir. Beslemenin sekizinci haftasında hidrosefali insidansı, beş haftalık farelerde %100, altı haftalık farelerde %75 ve sekiz haftalık farelerde %37.5 bulunmuştur.

%0,3 kuprizonla beslenen farelerde ikinci haftada süngersi dejenerasyon, 4 hafta sonunda glial proliferasyon ve beşinci haftada hidrosefali gözlemlenmiştir. Miyelin kaybı ise geç dönemde ve sadece dokuz hafta beslenen farelerde kaydedilmiştir [187]

Carlton, sıçanlarda ve kobaylarda kuprizonun neden olduğu bir süngerimsi ensefalopati tanımlamıştır. Bu türlerde, kuprizon ile toksik maruziyette paraparezi veya hidrosefali gözlenmemiş, histopatolojik değişiklikler (Alzheimer tip II glia gibi) farelerde indüklenenlere benzer görülmüştür. Kuprizon toksisitesine kobayın sıçandan, sıçanın fareden daha yatkın olduğu gösterilmiştir. Kobayda hidrosefalinin olmaması, bu türün beyinlerinin doğumda bile görece gelişmiş olmasına atfedilmiştir.

Kuprizonun sığır karaciğer mitokondriyal amin oksidaz aktivitesi üzerindeki etkisine ilişkin biyokimyasal çalışmalar Nara ve Yasunobu tarafından yapılmıştır. Kuprizon, sığır plazma amin oksidazının parsiyel yarışmalı-inhibitörüdür. Suzuki, kuprizon verilen farelerde dev karaciğer mitokondrisi tanımlamıştır [189, 190]. Merkezi sinir sisteminde benzer şekilde etkilenen mitokondriler gözlenmemiştir. Bu durumun, kan beyin bariyerinin etkisi veya beyin ve karaciğerdeki farklı metabolik aktivitelerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Karaciğer ve sinir lezyonları aynı anda ortaya çıkmıştır. Kuprizonun zar bütünlüğünde bozulmaya neden olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, kuprizonun hepatik mitokondriyal bakır metabolizmasını

değiştirdiği öne sürülmüştür. Kuprizonun mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu gösterilmiştir [190].

Suzuki ve Kikkawa, kuprizon tarafından indüklenen santral sinir sistemindeki spongios lezyonlar ve hepatik değişikliklerle ilişkili ultra yapısal ve histolojik çalışmalar gerçekleştirmiştir[191]. Tripan mavisi enjekte edilen farelerin beyinleri, yüksek demiyelinizasyon nedeniyle, yoğun perfüzyon sonrasında bile boyanmamıştır. Histolojik lezyonlar, Carlton tarafından tanımlananlara benzer özelliklerdedir. Vakuollerin hematoksilin-eozin, periyodik asit-Schiff, Bodian, Heidenhain ve Sudan IV boya ile boyanmadığı gözlenmiştir. Büyük çekirdekli şişmiş glial hücreler, dağılmış kromatin ve küçük veziküller, yoğun cisimler ve miyelin figürleri koleksiyonları, diğer histopatolojik yapılarıdır.

Farelerde kuprizon zehirlenmesini çalışanların çoğu bu bileşik tarafından indüklenen astrositoz ve spongiosus durumuna odaklanmış ve geniş çaplı dejeneratif miyelin kaybı bildirmemiştir [191-194]. Yalnızca Carlton (1966), Suzuki ve Kikkawa (1969) kuprizona maruz bırakılan farelerde dejeneratif oligodendrositlerin varlığını göstermiş ancak demiyelinizasyona değinmemiştir [188, 191]. 1972'de W.Blakemore, kuprizonun öncelikle oligodendrositler üzerinde etkili olduğunu ve miyelin vakuolizasyonunun oligodendrosit dejenerasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir [195, 196]. Demiyelinizasyonun gerçekleştiği 13 hayvanın 10'unda remiyelinizasyon ilişkili oligodendrositler görülmüştür. Önemi bildirilmemiştir.

SK Ludwin (1973), normal bir diyetle iyileşmelerine izin verildiğinde, farelerde remiyelinizasyonun bir hafta içinde başladığını ve tüm aksonların miyelinle kaplanana kadar devam ettiğini bildirmiştir[197]. Remiyelinizasyon mekanizmaları ve başarısız remiyelinizasyon durumunda gerçekleşen olaylar kuprizona demiyelinizasyon deneyleri yoluyla daha da incelenmiştir[198-204]. Remiyelinizasyon mekanizması, normal gelişimde gözlemlenen spiral sarma mekanizmasına benzer görülmüştür. Demiyelinizasyonun erken aşamalarında, mitotik bölünme makrofajlar ve astrositlerde, sonraki aşamalarında olgunlaşmamış oligodendrositlerde görülmüştür. Bu oligodendrositler farklılaşarak aksonların remiyelinizasyonundan sorumludur[205]. Aksonlardaki remiyelinizasyon kapasitesi kronik dönemde akut demiyelinizasyona göre azalmıştır[206]. Santral sinir sisteminde

kronik toksik demiyelinizasyon, remiyelinizasyona rağmen akson hasarına neden olur[207, 208].

1987'de Ludwin ve Baker kuprizona maruz kalan farelerde yaptıkları deneyler demiyelinizasyon esnasında ekstravasküler boşluğa veya subendotelyal bazal membrana protein sızıntısının olmadığını göstermiştir. Kuprizonlu hayvanlarda, daha önce bildirilmiş immün-aracılıklı hastalıklarda görüldüğü şekilde bir kan beyin bariyeri hasarının gösterilememesi nedeniyle, bu hastalıklardaki kan beyin bariyeri hasarının gelişigüzel değil ve patojenik otoimmünitenin sonucu olarak ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir 52,[209].

Hiremath ve ark. mikroglia/makrofajın demiyelinizasyon sürecine aktif olarak katkıda bulunduğunu savunmuştur. Bunun üzerine CD45 ekspresyon analizi ve Green Fluorescent Protein pozitif (GFP+) kemik iliği kimerik fareler kullanarak, periferik makrofaj ve küçük bir lenfosit popülasyonunun kuprizon ilişkili demiyelinizasyon sırasında beynin bazı bölgelerinde daha baskın olmak üzere infiltrasyonunu göstermişlerdir. Fornix, superior serebellar pedinkül, hipokampus ve corpus callosum gibi beyin bazı bölgelerinin diğer bölgelere (örneğin bazal ganglia, servikal ve torasik omurilik gibi) göre daha erişilebilir olabileceği için periferik hücre infiltrasyonunun bölgesel özgüllük taşıdığı düşünülmüştür[209, 210].

Bazı yazarlar, kuprizon ile oluşturulan dejenerasyonun histopatolojik paterninin Multipl Skleroz'un tip III lezyonlarına benzediğini belirtmişlerdir[211]. Gerçekten de, her iki form arasında bazı benzerlikler vardır. Ancak, kuprizon modelinde tip III lezyonlarının inflamasyonlu vasküler elemanları gibi diğer özellikleri gözlenmemiştir. Lezyonlarda CD3+T hücrelerinin görülmemesi veya az bir miktar halinde bulunması, kuprizonun T hücre fonksiyonu üzerinde doğrudan bir baskı etkisi yapması nedeniyle olabilir [212-214]. 2020 yılında, Mohammed S. M. Almuslehi ve ark. kuprizon toksisitesi ilişkili üç parçalı bir deney gerçekleştirmiştir. Çalışma 1, kısırlaştırmanın timus ve dalak atrofisini tersine çevirdiğini ve her iki bağışıklık organında da CD4/8 sinyal yoğunluğunu koruduğunu, böylelikle gonadal hormonların lenfositler üzerine negatif etki yaptığını göstermiştir. Çalışma 2'de, KUPRIZON-beslenmesi ve kan beyin bariyerinin bozulması (PT kullanılarak) birleştirildiğinde kısırlaştırmanın, serebrum, serebellum, beyin sapı ve omurilikte dejenerasyon, gliozis

ve CD8+ T hücre infiltrasyonuna neden olduğu görülmüştür. Dişi farelerde (Çalışma 3), KUPRIZON-beslenmesinin kan beyin bariyerinin bozulması ile birleştirilmesi, santral sinir sisteminde dejenerasyon ve gliozise neden oldu, ancak beyin veya omurilikte CD8+ T hücre infiltrasyonuna neden olmamıştır. Tüm bu sonuçlar, periferik bağışıklık sistemi kısırlaştırma gibi yöntemlerle desteklendiğinde, merkezi sinir sisteminde kuprizon ile oluşan dejenerasyonun bir CD8+ T hücresi aracılı santral yanıtı tetikleyebileceğini göstermektedir[215].

Oligodendrosit apoptozisi, kuprizon uygulamasından birkaç gün sonra başlar. Son yıllarda, Hesse ve ark, oligodendrosit hücre ölümünün ve miyelin geninde supresyonun kuprizon uygulamasından birkaç gün sonra başladığını, ancak demiyelinizasyonun ancak birkaç hafta sonra açık bir şekilde görülebildiğini göstermiştir[216]. Son kanıtlar, kısa süreli kuprizon maruziyetinin (3 hafta) demiyelinizasyonu indüklemek için yeterli olduğunu göstermiştir[217]. Astrogliazis ve olgun oligodendrositlerin tükenmesi, beşinci haftada gözlenir. Kuprizon maruziyeti ile benzer histolojik değişiklikler beş haftada gözlenebilir. Bu nedenle, olgun oligodendrositler bozulduğunda, ek maruziyet gerektirmeden demiyelinizasyon aktivitesinin ilerlediği görünmektedir. İlginç bir şekilde, kuprizonun erken çekilmesi iyileşme sürecini hızlandırmamıştır, bu da hafif bir beyaz cevher hasarının, sonraki haftalarda bir dizi demiyelinizasyon olayını tetiklediğini düşündürmektedir.

2.4.3. Kuprizon Modelinin Etki Mekanizması:

Kuprizon uygulaması, mitokondriyal büyümeye neden olur, metabolik hızları ciddi şekilde değiştirir ve monoamin oksidaz [218] ve sitokrom c (Cyt c) oksidaz [219, 220] gibi bakır içeren mitokondriyal enzimleri azaltarak oksidatif fosforilasyonu bozar. Kuprizon tedavisi hepatosit mitokondriyal fonksiyonunu bozmuştur ve bunun bakır eksikliğinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Ancak, kuprizonun sonuçlarının doğrudan bakır şelasyonu ile ilişkili olup olmadığı belirsizdir, çünkü bakır takviyesi farelerin CNS'sindeki kuprizon toksisitesini azaltmada sınırlı kapasiteye sahiptir [221]. Farelerin BBB'sinin büyük ölçüde sağlam olduğu ve kuprizon kaynaklı demiyelinizasyonun periferik katılım olmaksızın meydana geldiği bulunmuştur. Bu bulgu, mitokondrinin metabolik bozulmasının oligodendrosit ölümü ve miyelin kaybının ana nedeni olduğunu düşündürmektedir [209].

Kuprizon ile oral beslenme, Multipl Sklerozu taklit etmek üzere oluşturulmuş deney modellerinde demiyelinizasyonu indükler. Altı dekadı aşkın süredir kuprizon demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon çalışmalarında kullanılmasına rağmen demiyelinizasyona yol açan patofizyolojik mekanizmalar ayrıntılarıyla aydınlatılamamıştır. Konuya açıklık getiren çalışmalar temel iki yaklaşım üzerinde yoğunlaşmıştır:

1. Oligodendrositlerdeki mitokondriyel hasar hücreyi apoptoza sürükler ve demiyelinizasyon için 'intrinsik' etkiyi sağlar.

2. Periferik immün sistem hücreleri veya dokuya yerleşmiş astrositler ve mikroglialar oligodendrosit hasarını artırıcı yönde immünolojik reaksiyonları tetikler. Bu da 'ekstrinsik' etkiye neden olur [222].

Kuprizon toksisitesinin etki mekanizmaları, üç farklı patoloji formuna daha ayrılabilir: **1.Primer oligodendrositopati:** kuprizonun oligodendrosit popülasyonu üzerindeki doğrudan etkisi sonucu oligodendrosit hücre ölümü. **2.Toksik doğal bağışıklık:** oligodendrosit hasarına yanıt olarak aktiveleşen astrositler ve mikroglialar tarafından neden olunan oligodendrosit hücre ölümü. **3.Primer immünositopati:** kuprizonun doğrudan etkisi sonucu astrositler ve mikroglialar tarafından neden olunan oligodendrosit hücre ölümü[222].

2.4.4. Kuprizon Modeli ve Deney Hayvanları

Kuprizon modeli ilk olarak Swiss farelerinde kurulmuştur[195, 223] ancak daha sonra yaygınlar C57BL / 6 suşunda yoğunlaşmıştır. C57BL/6 farelerinde demiyelinizasyon için ilk kuprizon modeli 1998'de oluşturulmuştur[224]. İlk kanıtlar, Kuprizon ile indüklenmiş demiyelinizasyonun cinsiyetle ilgili bazı farklılıklarının olduğunu göstermiştir. Bu konuda, Ludwin, Swiss ve SJL/J dişi farelerin erkeklere kıyasla demiyelinizasyon göstermediğini bildirmiştir. Bununla birlikte, C57BL/6 fare suşunda önemli bir cinsiyet arası farklılık gözlenmemiştir[158].

Kuprizonun erken deneylerinin çoğu farelerde yapılsa da sıçanlar[225-229], kobaylar [225] veya hamsterlar[230, 231] gibi diğer kemirgenlerin beyinlerinde farelerdeki gibi olumsuz etkilerin gözlemlendiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. İlginç bir şekilde, hamsterlar kullanılarak yapılan deneylerde beyin değişiklikleri

indüklemek için kuprizon konsantrasyonunun fare veya sıçan deneylerinde olduğu gibi %0,2-0,5 değil, %3 veya hatta %5'e çıkarılması gerekmektedir. Cynomolgus makaklarda yapılan çok küçük bir çalışmada, genç bireylerin bile %3 kuprizon diyetiyle 18 hafta boyunca demiyelinizasyon tespit edilmemiştir[232]. Demiyelinizasyonun olmaması, makaklarda demiyelinizasyonu indüklemek için daha yüksek, ancak denenmemiş dozlara ihtiyaç duyulabileceği anlamına gelebilir.

Farelerdeki kan beyin bariyerinin büyük ölçüde dayanıklı olduğu, periferal immün bileşenlerin kuprizona mağruz kalmış sinir sistemine infiltrasyon durumunun sınırlı olduğunu gösteren çeşitli testlerle (horseradish peroksidaz[208, 209], immünohistokimya[208, 233] ve radyoaktif izleyiciler[233]) doğrulanmıştır. Bu nedenle, uzun süre kuprizonun periferik katılım olmaksızın demiyelinizasyona neden olduğuna inanılmıştır. Bu erken bulgular nedeniyle mitokondri metabolizması bozukluğunun oligodendrosit ölümü ve miyelin kaybının ana nedeni olduğu uzun süre düşünülmüştür.

2.5. Modern Kuprizon Modeli

Kuprizon toksisitesinin erken dönem çalışmaları farklı soy, cinsiyet ve yaşlardaki fareler kullanılarak yapıldığı için deneyler arasındaki bulguların yorumlanmasını zorlaştırmıştır, bu da daha standartlaştırılmış bir yaklaşımın gerekliliğini vurgulamaktadır.

Kuprizon modelini standartlaştırmak için, Hiremath ve meslektaşları 1998 yılında C57BL/6 farelerinde düşük dozda kuprizon uygulaması için bir protokol oluşturmuştur (%0,2'lik kuprizon ile sağlıklı farelerde)[211, 224], bu protokol günümüzde hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Şu anda, akut demiyelinizasyonu çalışmak için genellikle 4-6 hafta boyunca kuprizon uygulanırken, kronik demiyelinizasyonu çalışmak için 12 haftaya kadar uygulanır ve fareler bazen kuprizon çekilmesinden sonra demiyelinizasyonu çalışmak için takip edilir. İlginç bir şekilde, kuprizon tüketimine rağmen endojen onarım süreçleri meydana gelir[234]. Örneğin, spontan demiyelinizasyon, kuprizona devam edilmesine rağmen 6 hafta sonra görülebilir ve miyelinli aksonların %50'sine kadar artış ve olgun oligodendrosit sayısında artış görülür[235, 236].

Hiremath tarafından standartlaştırılan kuprizon modelinin histopatolojik belirtisi korpus kallosum, superior serebellar pedinküller, hipokampus [[196, 224, 236-243]] ve fare beyninin birkaç diğer bölgesinde oligodendrosit ölümü ve ardışık demiyelinizasyondur. Bu modelde, miyelinin destabilizasyonu ve kaybı, kuprizon uygulamasının 2-3. haftalarında başlar ve 4-5. haftada zirveye ulaşır[224], sürekli kuprizon beslenmesine devam edilmesi halinde miyelin seviyeleri en azından 12. haftaya kadar düşük kalır[207]. Bu ilerleyici demiyelinizasyon güçlü astrogliozis ve mikrogliozis ile birlikte görülür. Astrogliozis, kuprizon diyetinden 2 hafta sonra başlar. Astroglia yoğunlukları 5-6 haftada zirveye ulaşır ve 12 hafta boyunca yüksek seviyede kalır. Mikroglia da 2 hafta sonra proliferasyon ve genişleme gösterir ve yoğunlukları 5-6 haftada zirveye ulaşır[207, 235, 244]. Kuprizon diyeti yaygın demiyelinizasyona neden olurken, kuprizonun kaldırılması korpus kallosum ve serebellar pedinküllerin remiyelinizasyonunu mümkün kılar.

Beyaz madde demiyelinizasyonu davranışsal değişiklikler ve bilişsel ve motor fonksiyon kaybı ile aynı döneme denk gelir. Ancak klinik bulguların görülmesi, MSS'de gerçekleşen demiyelinizasyon miktarı ile orantılı değildir [245, 246].

3. KAPSAM ve AMAÇ:

Bu tezin konusu, merkezi sinir sistemi demiyelinizan hastalıklarının etiopatogenezinin araştırılmasında prototip olarak kullanılan deneysel demiyelinizasyon modellerinden biri olan toksik demiyelinizasyon modelinin oluşturulması ve periferel bağışıklık sistemi hücrelerinin infüzyonunun merkezi sinir sistemindeki toksik demiyelinizasyona katkısının değerlendirilmesidir.

Kuprizon modellemeleri ile yapılan çalışmaların çıktıları, histopatolojik değişiklikler üzerinden ifade edilmektedir. Ancak histopatolojik değişikliklerle eş zamanlı olarak faredeki kliniğin nasıl etkilenmiş olduğunu gösteren skorlamalara ihtiyaç vardır. Çalışmalardaki klinik değerlendirmelerin, histopatolojik çalışmaların ikinci planında kaldığı görülmüştür. Çalışmada bu nedenle klinik DOE skorlamasına da yer verilmiştir. İkinci olarak, adjuvan antijenler kullanılmamış, tek başına kuprizonun "inside-out" fenomenini başlatmasıyla ortaya çıkan etkiler ve Thücre+kuprizon kombinasyonu ile ortaya çıkan etkiler hem klinik hem histopatolojik olarak karşılaştırılmıştır. Literatürde daha önce bu kombinasyonun çalışılmadığı görülmüştür. Farklı zamanlarda uygulanan T hücre indüksiyonunun patofizyolojiye nasıl katkı yaptığına gösterilmesi, bir sonraki basamağı oluşturmuştur. Merkezi sinir sistemi demiyelinizasyonunda T hücrelerinin dominant rolü bilinmektedir. Bu nedenle kesitsel olarak farklı zamanlardaki T hücre davranışının nasıl olacağını gözlemlenmesi, hastalığın farklı aşamalarının birbirine göre histopatolojik ve klinik açıdan farklılık gösterip göstermediğinin ortaya konmasına olanak tanımıştır. Bu hedefin son kazanımı, ileri çalışmalarla desteklendiği takdirde farklı sürelerde hastalık geçmişi olan Multipl Skleroz hastalarının yönetiminde farklı stratejilerin geliştirilmesi olabilir. Bu çalışmadaki her bir basamak, bu alanda yapılacak sonraki çalışmalar için, kendi bünyemizdeki laboratuvar koşullarında bu yöntemlerin ne düzeyde etkin olduğu ve nasıl modifiye edilmesi gerektiği ile ilgili kaynak niteliğinde olacaktır.

Bu çalışmada, şimdiye kadar toksik madde maruziyeti ve kan beyin bariyerini aşan adjuvanlar beraber kullanılarak oluşturulan Kuprizonlu toksik demiyelinizasyon modeline daha fizyolojik bir alternatif olarak toksik madde ile T hücre indüksiyon kombinasyonu önerilmektedir. Oluşturulması hedeflenen bu yeni çifte indüksiyon modelinin başarısının değerlendirilmesi birinci hedefdir. İkinci olarak, böyle bir

modelde periferel bağışıklık sistemi hücresinin merkezi demiyelinizasyona katkısının değerlendirilmesi, hastalığın erken ve geç safhalarında lenfositlerin durak noktalarının gözlemlenmesi hedeflenmiştir.

Bu bağlamda çalışma basamakları aşağıdaki gibi planlanmıştır:

1. Basamak: %0,2'lik kuprizon ile beslenen farelerde demiyelinizasyonun gösterilmesi
2. Basamak: Sağlıklı farelerde ve %0,2'lik kuprizon ile beslenen farelerde T lenfosit biyodağılım özelliklerinin incelenerek model tasarımı
3. Oluşturulan 'Kuprizonlu Toksik Demiyelinizasyon ve Periferel T Lenfosit Etki Modeli'özelliklerinin klinik, immünolojik ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi

4. MATERYAL VE YÖNTEM:

4.1. Kullanılan Materyaller:

RPMI-1640 medyum, Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin-Streptomisin (Biological Industries), Fosfat Tamponlu Salin tozu (Phosphate buffered Saline- PBS, Advansta-USA), anti-fare CD4 antikor, anti-fare CD8 antikor, anti-fare CD25 antikor, anti-fare CD44 antikor, anti-fare CD69 antikor, anti-fare CD3 antikor, anti-fare 90,2 mikrobuncukları, %0,4'lük Trypan mavisi, Doku dondurma medyum (OCT, Leica,Germany), Ficol Çözeltisi, %0,9'luk NaCl çözeltisi, 96 kuyucuklu tabaka, Hematoksilen, Eozin boyaları, Anti-fare Miyelin Basic Protein, Anti-fare CD11b, Anti-fare CD19, Anti-fare PAX5, Anti-fare LY6G, Hücre bölünmesi takip boyası (carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester, CFSE), MACS yıkama tampon çözeltisi, Kuprizon tozu.

Tablo 4-1. Çalışmada kullanılan antikorlar

İsim	Klon	Florokrom	Üretici Firma
CD3	SK7	PE Cy7	BioLegend
CD4	RM 4-5	FITC	BioLegend
CD8	53-6.7	PE	BioLegend
CD25	PC61	APC	BioLegend
CD44	IM7	BV510	BioLegend
CD69	H1.2F3	APCCy7	BioLegend
CD45	SK7	PERCP	BioLegend

4.2. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler:

Fosfat Tamponlu Salin (PBS): Ticari olarak alınan toz PBS karışımı, 1X PBS çözeltisi elde etmek için 500 ml damıtılmış su (dH₂O) içinde çözülür. Bu çözelti 150 mM sodyum klorür ve 10 mM sodyum fosfat içerir.

Tam RPMI besiyeri: L-glutamin (1 mM) içeren RPMI 1640 üzerine; son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS (ısı-inaktif) ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklenerek tam RPMI besiyeri yapılır. Hazırlanan besiyeri +4 C°'de saklanır. Besiyerinin raf ömrü +2-8 C°'de 4 haftadır.

Trypan mavisi: Trypan mavisi (40 mg), 0,4% çözelti elde etmek için 1X PBS içinde çözülür ve 0,22 µm steril filtrelerden süzülür.

Hücre bölünmesi takip boyası (carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester, CFSE): Liyofilize CFSE (100 µg), üzerine 36 µl DMSO eklenerek, final konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde çözülür ve alikotlanarak -80°C'de, karanlıkta saklanır. Çözölmüş CFSE boyasının raf ömrü 80 C°'de bir aydır.

MACS (magnetic-activated cell sorting) yıkama tamponu çözeltisi: PBS (1X) içerisinde final konsantrasyonları %0,5 w/v BSA ve 2 mM EDTA olacak şekilde hazırlanarak ve +4 C°'de saklanır. Çözeltinin raf ömrü +2-8 C°'de 4 haftadır.

PEB tamponu: %5 bovine serum albumin ve 2mM EDTA, 0,01 M PBS içinde çözülür.

4.3. Deney Hayvanları:

Bu çalışmada, yaklaşık 18-20 gram ağırlığında ve 6-7 haftalık yaş aralığında olan, aynı soydan üretilmiş dişi C57BL/6 fareleri kullanılmıştır. C57BL soyu siyah kürklü farelerden oluşur ve C57BL/6, bu soyun altıncı alt soyunu ifade eder. Fareler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (HÜDHAM) üretilmiştir ve tüm çalışma süresince HÜDHAM'da barındırılmıştır. Hayvanların bakımı steril ve hava filtreli kafes sistemlerinde gerçekleştirilmiştir. 5 tanesi bir kafeste olmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Laboratuvar ortamı, 23±1°C sıcaklık ve %55 ± 5 nem oranı ile sabit tutulmuştur. Barınakta ışıklandırma, sabah 08:00'de başlayan 12 saatlik aydınlık ve 12 saatlik karanlık döngüsü şeklinde ayarlanmıştır. Standart fare yemi, kuprizonlu yem ve su hazır bulunmuş, fareler

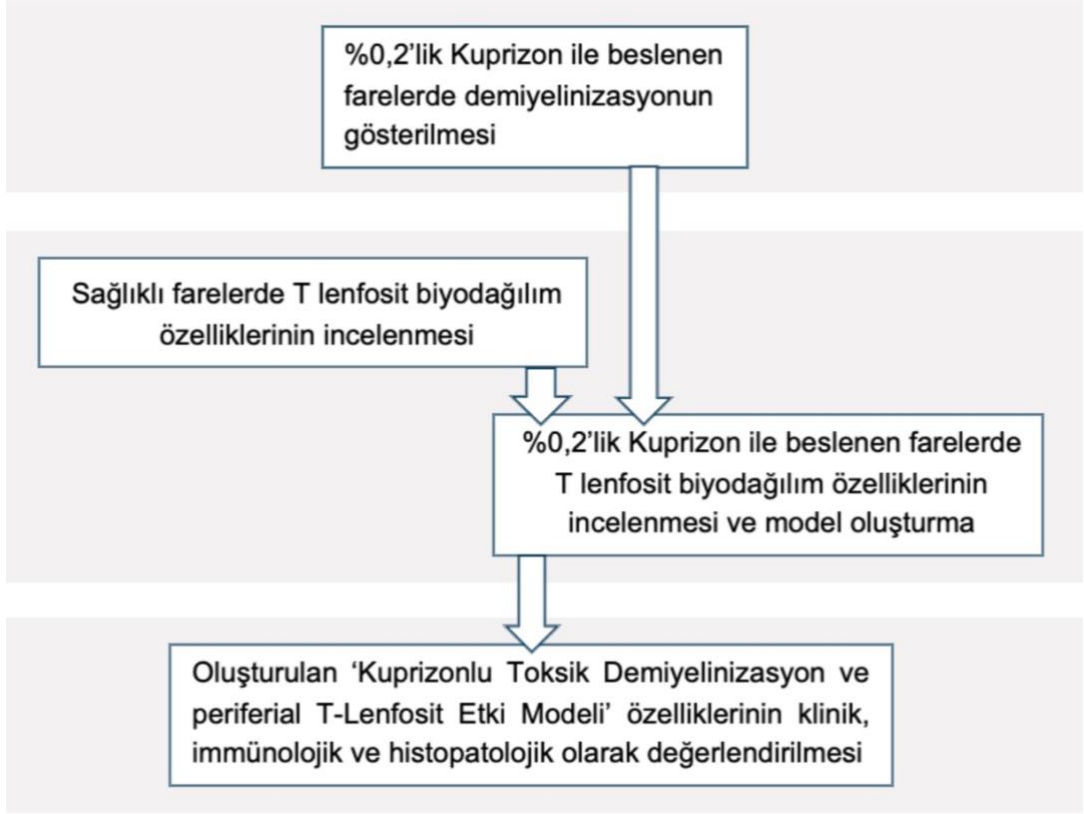
yeme/içme konusunda kısıtlanmamıştır. Fare yemleri tartılarak kafeslere yerleştirilmiş ve ölçülerek fare başına tüketilen miktar hesaplanmıştır. Fareler, deneye başlamadan önce ve haftada bir, son olarak sakrifikasyondan önce tartılmıştır.

Araştırma ve deney hayvanlarının gözetilmesi ile ilgili olarak, Hacettepe Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2022/03-01 numaralı onay alınmıştır. Çalışmanın tüm raporlanma sürecinde *ARRIVE guidelines* (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) rehberlerinin önerilerine uyulmuştur.

4.4. Deney Protokolü ve Grupları:

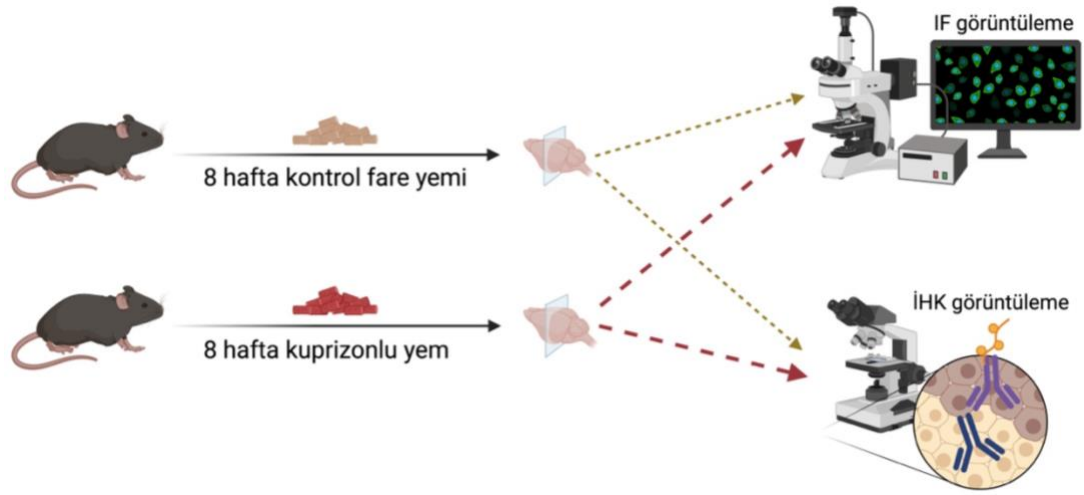
Bu çalışma boyunca yapılan deneyler üç basamakta ele alınabilir. İlk basamakta, kuprizon kullanılarak toksik demiyelinizasyonun oluşturulduğu gösterilmiştir. İkinci basamak, model oluşturma ve T hücrelerinin biyodağılımını araştırma basamaklarını içermektedir. Üçüncü basamakta ise, bu modelin klinik, immünolojik ve histopatolojik özellikleri detaylandırılmıştır. Şekil 4-1'de deneylerin akış şeması gösterilmiştir. Bu başlıkta deney akışı ana hatları ile anlatılacak ve uygulanan protokollerin detaylarına ilgili başlık altında yer verilecektir.

Birinci basamakta temel amaç kuprizonlu yemle beslenme durumunda farelerde meydana gelen toksik demiyelinizasyonun derecesini saptamaktır. Başarı kriterleri, farelerde motor kuvvet kaybı ve yürüyüş bozukluğu gibi klinik etkilerin gözlemlenmesi ve histopatolojik düzeyde demiyelinizasyonun kanıtlanması olarak belirlenmiştir. Toplamda 10 fare (n=5 kontrol ve n=5 kuprizonla beslenen) iki kafes halinde gruplandırılmıştır. Kuprizonun maksimum demiyelinizasyon etkisini göstermesi beklenen sekizinci haftaya kadar fareler düzenli olarak gözlemlenmiştir. Bu süreçte, günlük olarak DOE skorları hesaplanmış, farelerin ağırlıkları haftada iki kez ölçülmüştür.



Şekil 4-1. Çalışmanın genel akış şeması.

Kuprizonlu yem ile beslenen farelerin kafeslerindeki yem miktarları ilk bir hafta boyunca tartılarak, günlük ortalama yem tüketimi ve dolaylı olarak alınan kuprizon miktarı hesaplanmıştır. Sekizinci haftanın sonunda fareler sakrifiye edilmiş ve beyinleri diseke edilmiştir. Alınan beyin kesitleri, immüofloresan (IF) ve immünohistokimya (İHK) teknikleri kullanılarak boyanmıştır. IF görüntüleme, hücre çekirdeklerini boyamak için 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ve miyelini boyamak için anti-Miyelin Basic Protein (MBP) kullanılmıştır. İHK için birincil antikor olarak anti-fare MBP, ikincil antikor olarak ise primer antikorla uyumlu bir antikor kullanılmıştır. Bu yöntemlerle dokuların miyelin dansiteleri değerlendirilmiştir (Şekil 4-2).

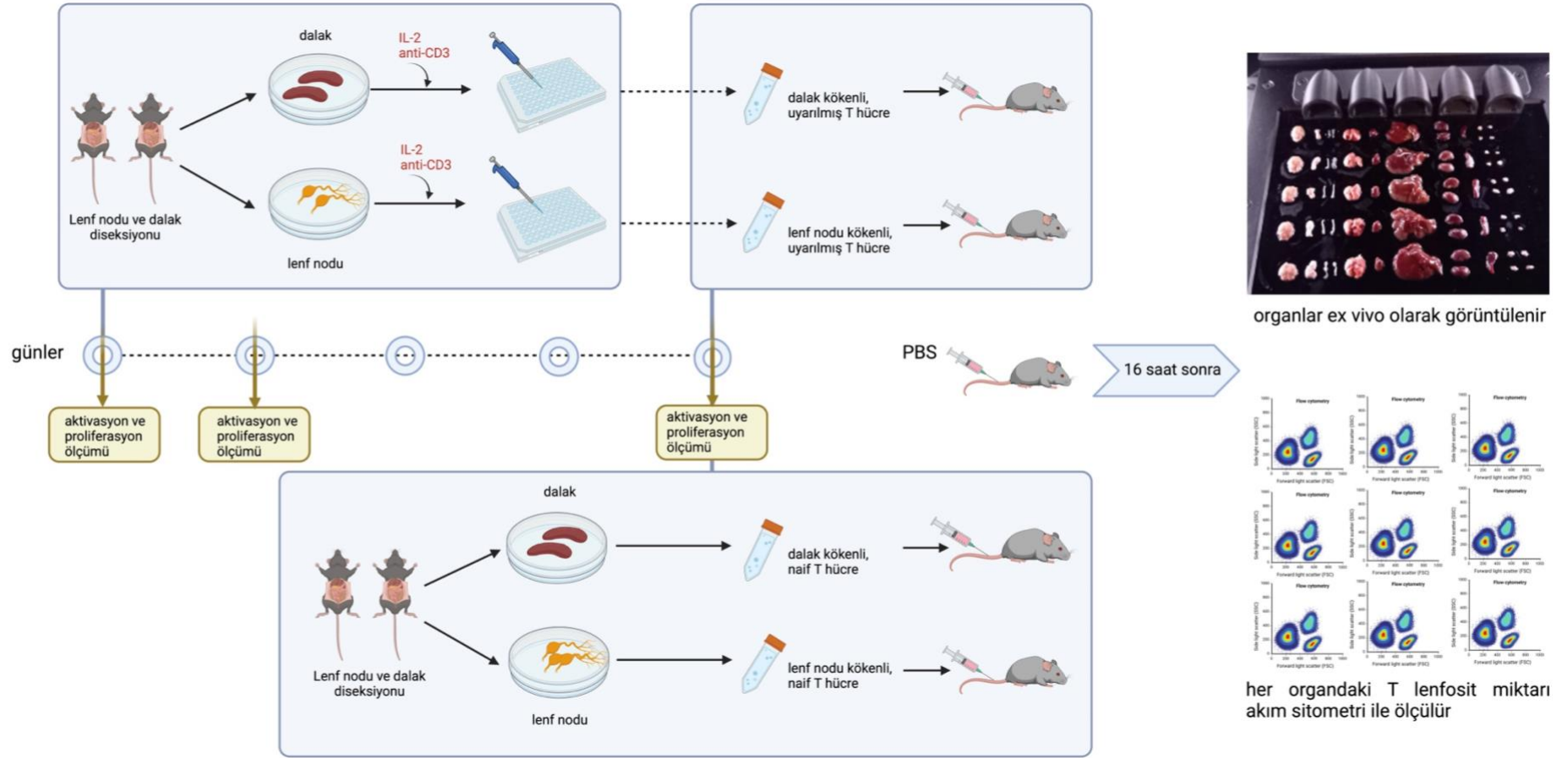


Şekil 4-2. Kuprizonla indüklenmiş toksik demiyelinizasyonun değerlendirilmesi (IF: İmmünofloresan, İHK:İmmünohistokimya görüntülme).

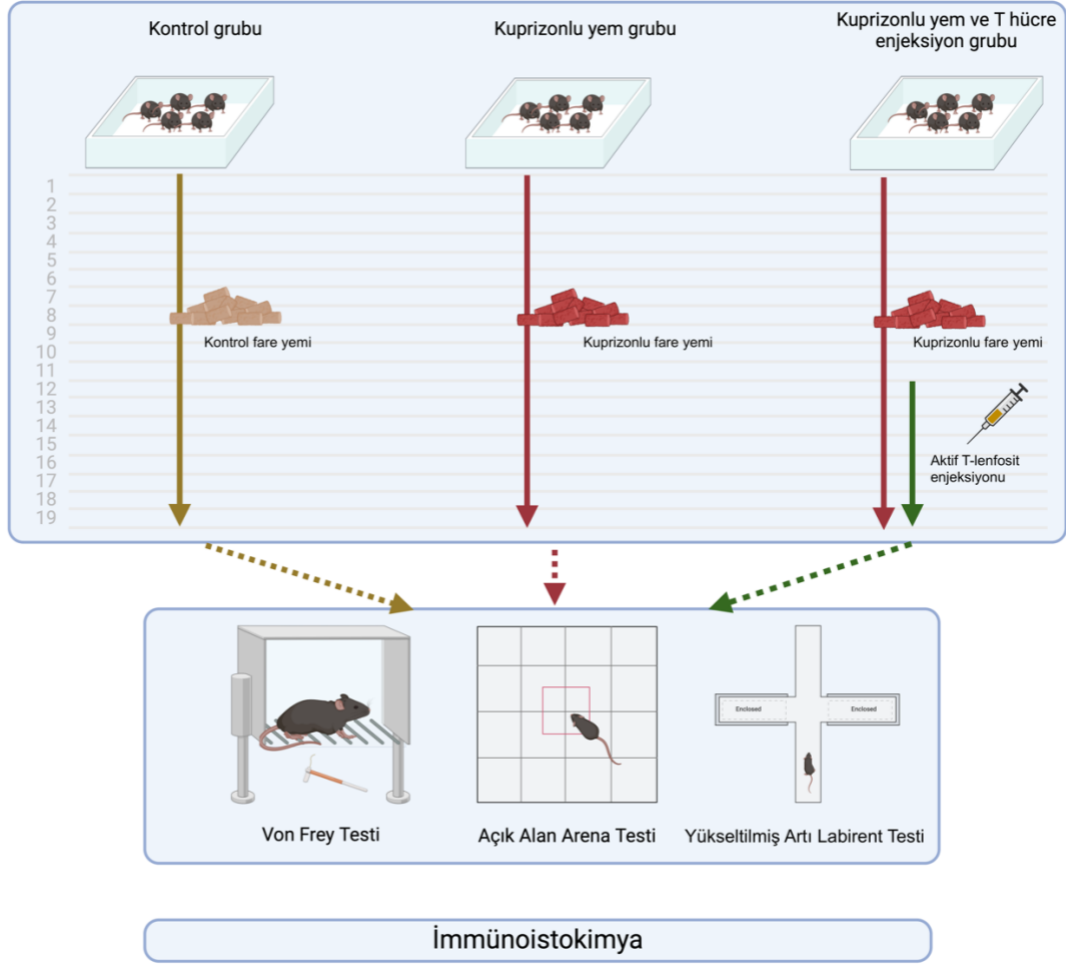
Kuprizonla indüklenmiş toksik demiyelinizasyona 'uyarılmış T-lenfosit enjeksiyonu' eklemek için, öncelikle bir dizi optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4-3). Optimizasyon süreci, enjeksiyona hazır hale gelene kadar T-lenfositlerin donör fareden eldesi ve aktivasyonu için kullanılacak yöntemler ile her bir alıcı fare için tek seferde enjekte edilecek lenfosit miktarının belirlenmesi amacıyla tasarlanmıştır. T-lenfosit kaynağı olarak dalak ve lenf nodları seçilmiştir. Her bir fare için gereken 10^6 T lenfositini sağlamak üzere, tek seferde 2 fareden dalak ve lenf nodları diseksi edilmiştir. Elde edilen T-lenfositler, 'dalak kaynaklı' ve 'lenf nodu kaynaklı' olarak iki ayrı koldan işleme alınmıştır. T lenfositler, in vitro ortamda, anti-CD3 antikor ve IL-2 kullanılarak 96-kuyucuklu plakada inkübe edilmiştir. Ekimden hemen önce lenfositler kırmızı hücre etiketi ile işaretlenmiştir. Ekimin 0., 24., ve 96. saatlerinde hücrelerin çoğalma ve aktivasyon belirteçleri ölçülmüştür. Hücre sayımı, mikroskopta thoma lamı kullanılarak yapılmıştır. Ardından, hücre aktivasyonunu belirlemek için akım sitometri cihazında CD25, CD49 ve CD44 ifadeleri, çoğalma durumunu belirlemek için kırmızı hücre etiketi yoğunluğu ölçülmüştür. T-hücre enjeksiyonu yapıldıktan 16 saat sonra fareler sakrifiye edilmiştir. Farklı organlara olan T-lenfosit infiltrasyonu hem *ex vivo* görüntüleme hem de akım sitometri ile ölçülmüştür. Bu ölçüm naif ve uyarılmış T-lenfositler arasındaki infiltrasyon

farklılıklarını değerlendirmek için yapılmıştır. Şekil 6.3'te tarif edilen deney seti, 8 hafta boyunca %0,2'lik kuprizonlu yem ile beslenen fareler üzerinde tekrar edilmiştir.

Üçüncü basamakta (Şekil 6.4) fareler (n=10) 12 hafta boyunca %0,2'lik kuprizon içeren yem ile, n=5 fare kontrol yem ile beslenmiştir. Kuprizon tüketen 10 fareden 5 tanesine 13. haftanın ilk gününden başlanarak 4 günde bir T lenfosit enjeksiyonu yapılmıştır. Bu 5 fare enjeksiyonlar süresince de kuprizonlu yem ile beslenmeye devam etmiştir. Diğer 5 fare kuprizon ile ve kontrol grubu fareler kontrol yem tüketmeye devam etmiştir. DOE skorunda belirgin artış olmayan hayvanlar 12. Enjeksiyondan sonra fonksiyonel bozuklukları değerlendirmek amacıyla davranış deneylerine alınmıştır. Davranış deneyleri tamalandıktan sonra tüm fareler sakrifiye edilmiştir. Bu farelerin beyin, omurilik, dalak ve lenf nodları diseke edilerek parafin bloklara gömülmüştür.



Şekil 4-3. Naif ve Aktif T Lenfositlerin Sağlıklı Farelerdeki Biyodağılım Çalışmaları



Şekil 4-4. Oluşturulan modelin klinik ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi

Tablo 4-2. Deney Grupları ve Uygulamalar

1. Basamak: Kuprizonla Toksik Demiyelinizasyonun Gösterilmesi								
Grup	N	DOES	İHK	İF	EVG	Akım sit.	Davranış D.	Süre ¹
Kontrol	5	√	√	√				8 hafta
KPZ grubu	5	√	√	√				8 hafta
2. Basamak: Farelerde T lenfosit Biyodağılım Özelliklerinin İncelenmesi								
1. Grup	N	DOES	İHK	İF	EVG	Akım sit.	Davranış D.	Süre ²
Sağlıklı kontrol	1				√	√		16 saat
Sağlıklı+Aktif Dalak kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
Sağlıklı+Naif Dalak kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
Sağlıklı+Aktif Lenf nodu kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
Sağlıklı+Naif Lenf nodu kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
2. Grup	N	DOES	İHK	İF	EVG	Akım sit.	Davranış D.	Süre ²
KPZ grubu	1				√	√		16 saat
KPZ+Aktif Dalak kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
KPZ+Naif Dalak kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
KPZ+Aktif Lenf nodu kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
KPZ+Naif Lenf nodu kökenli T hücre	2				√	√		16 saat
3. Grup	N	DOES	İHK	İF	EVG	Akım sit.	Davranış D.	Süre ²
Sağlıklı kontrol	1				√	√		16 saat
Sağlıklı+Aktif T hücre	5				√	√		16 saat

Sağlıklı+Naif T hücre	5				√	√		16 saat
KPZ kontrol	1				√	√		16 saat
KPZ+Aktif T hücre	5				√	√		16 saat
KPZ+Naif T hücre	5				√	√		16 saat

3. Basamak:Kuprizon ve Uyarılmış T lenfosit Çifte İndüksiyon Modeli Değerlendirme

Grup	N	DOES	İHK	İF	EVG	Akım sit.	Davranış D.	Süre ³
Sağlıklı kontrol	5	√	√				√	20 hafta
KPZ grubu	5	√	√				√	20 hafta
KPZ + Aktif TL	5	√	√				√	20 hafta

N: Fare sayısı, DOES: Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit Skoru, İHK: İmmünohistokimya, İF:İmmünofloresan, EVGS: Ex-vivo görüntüleme ile biyodağılım çalışması, Akım sit: Akım sitometri ile biyodağılım çalışması, Davranış D:Von-Frey, Yükseltmiş Artı Labirent ve Açık Alan Arena Testleri, KPZ: Kuprizon, TL: T Lenfosit

süre¹: Farelerin sakrifikasyon öncesi takip edildiği süre, *süre²*: T lenfosit enjeksiyonundan sakrifikasyona dek geçen süre, *süre³*: 12 hafta kuprizonla beslenme, 7 hafta T Lenfosit enjeksiyonu, 1 hafta davranış deneyi

4.5. Kuprizonlu Yem Uygulama:

% 0,2 ve % 0,3'lük kuprizon (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazone) ihtiva eden yem kullanılmıştır. % 0,2'lik kuprizon içeren yem için 1000 gr yem içine 2 gr kuprizon eklenmiştir. **Tablo 6.1**'deki içeriğe göre gerekli malzemeler karıştırılarak hazırlanan yem makinede pellet haline getirilmiştir. Yemler +4°C'de muhafaza edilmiştir (**Şekil 6.1**). Akut demiyelinizasyon 5 haftada gerçekleşirken, 12. Hafta sonrasında kronik süreç başlamaktadır. Bu bağlamda hayvanların yaklaşık 8 (veya 12) haftalık yem alması planlanmıştır.

Tablo 4-3. Kuprizonlu yem İçeriği

Hammadde içeriği:	
<p>Tane mısır, tam buğday, buğday kepeği, tane yulaf, soya unu (kabuksuz), soya kősgesi, tam yağlı soya, balık unu, mısır glüteni, kurutulmuş bira mayası, ayçiçek kősgesi, Őeker, sığır don yağı, Ayçiçek yağı, vitamin A asetat, kolekalsiferol, dl-alfa tokoferil asetat (E vitamini formu), menadion sodyum bisülfid (K vitamini kaynağı), tiamin mononitrat, Riboflavin 5-fosfat, piridoksin hidroklorür, vitamin B12, niasinamid, kalsiyum pantotenat, folik asit, D- biotin, L-askorbik asit, kolin klorür, kalsiyum karbonat, dikalsiyum fosfat, tuz, mangan oksit, çinko oksit, demir sülfat, bakır sülfat, kalsiyum iyodat, kobalt sülfat, sodyum selenit.</p>	
Katkı maddeleri:	
Sepiolite (E562):10000 ppm, kalsiyum silikat(E552):5000 ppm, Kuprizon %0,2	
Taahhüt edilen besin değerleri:	Kimyasal kompozisyon: (hesaplanmış)
Ham protein..... % 22,00	Protein..... % 22,30
Ham yağ..... % 6,00	Yağ..... % 7,10
Ham selüloz..... % 4,00	Selüloz..... % 3,70
Ham kül..... % 8,00	Mineraller..... % 6,00
Nem..... %12,00	Nem..... % 10,00
Metabolik enerji..... 3200 kkal/kg	Metabolik enerji..... 3300 kkal/kg
Kalori dağılımı;	
Protein % 27,00	Karbonhidratlar % 53,50
Yağ% 19,5	



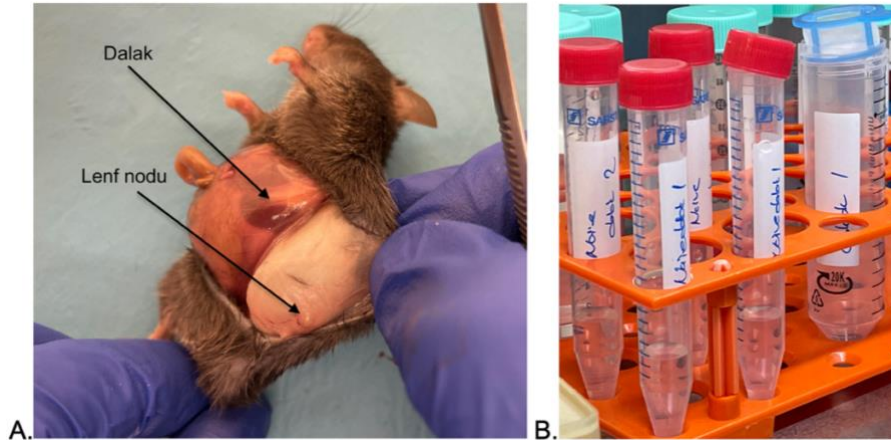
Şekil 4-5. %0,2 Kuprizon İçeren Peletler

4.6. İmmünolojik Yöntemler:

4.6.1. Naif T-Lenfosit Eldesi

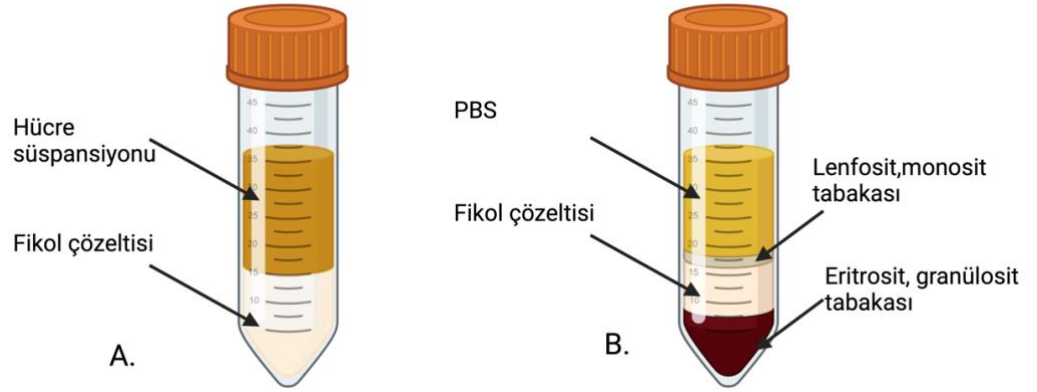
Donör farelerden (n=2) naif T-lenfosit izolasyonu ve enjeksiyonuna yönelik prosedür aşağıdaki adımları içermektedir:

1. Fareye, intraperitoneal yolla 0,1-0,5 ml arasında 10 mg/kg dozunda Ksilazin uygulanır. Anestezi etkisinin başlaması beklenir. Fare supin pozisyona getirilir ve arka patiyeye ağırlı uyarın verilerek anestezi derinliği değerlendirilir.
2. Fare diseksiyonuyla dalak ve yüzeysel lenf nodları çıkarılır ve ayrı falkon tüplerine konur. Üzerini örtecek kadar PEB tamponu eklenir. (Şekil 6-8A).



Şekil 4-6. Lenf Nodu Ve Dalak Diseksiyonu A. Diseksiyon B.Süspansiyon halinde lenf nodu ve dalaklar

3. Bir bisturi ile parçalanmış dalak ve lenf nodları, 0,70 µm gözenek çapına sahip filtreler kullanılarak beta-merkaptolu RPMI içerisine süzülür (**Şekil 6-8B**).
4. Her bir falkon tüpüne, süspansiyon hacmi 10 ml olacak şekilde PBS eklenir.
5. Kollejenaz II enzimi ilavesiyle örnekler, 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilir.
6. İnkübasyondan sonra, süspansiyonlar tekrar 0,70 µm gözenek çapına sahip filtrelerden PBS ile süzülür. Süzgeçte kalan debris atılır.
7. İçindeki eritrositleri elimine etmek amacıyla süspansiyon Fikol solüsyonu ile muamele edilir. Bu amaçla süspansiyonlar Fikol-Paque çözeltisi üzerine katman halinde dökülür
8. Süspansiyon ve Fikol çözeltisi 5 dk 1800 RPM'de santrifüj edilir. Santrifüjden çıkarılan tüplerde aşağıdan yukarıya pellet, fikol çözeltisi, lenfosit/monosit tabakası, PBS şeklinde katmanlar oluştuğu görülür ve pastör pipeti ile yavaşça lenfosit tabakası toplanır (**Şekil 6-9**).



Şekil 4-7. Fikol Çözeltisi İle Kan Hücrelerinden Lenfomononükleer Hücrelerin Ayrılması Santrifüj öncesi (A) ve sonrası (B) ayrılmış lenfosit /monosit tabakası

9. Toplanmış lenfosit süspansiyonu PBS içinde tekrar 5 dk 1800 RPM'de santrifüj edilir. Pellet RPMI'da çözülür.
10. T lenfositler, başlık 4.6.3'te anlatıldığı şekilde izole olarak elde edilir.
11. Enjeksiyondan hemen önce, 'kırmızı hücre etiketleyici' (Cardigreen-red cell-tracker) ile hücreler işaretlenir.

12. Her bir fare için 150 µl PBS içinde 10^6 T-lenfosit iv enjeksiyon yapılmak üzere hazırlanır.
13. T lenfositler 26G insülin iğnesi ile farenin lateral kuyruk veninden enjekte edilir.

4.6.2. Aktif T-Lenfosit Eldesi ve Enjeksiyonu

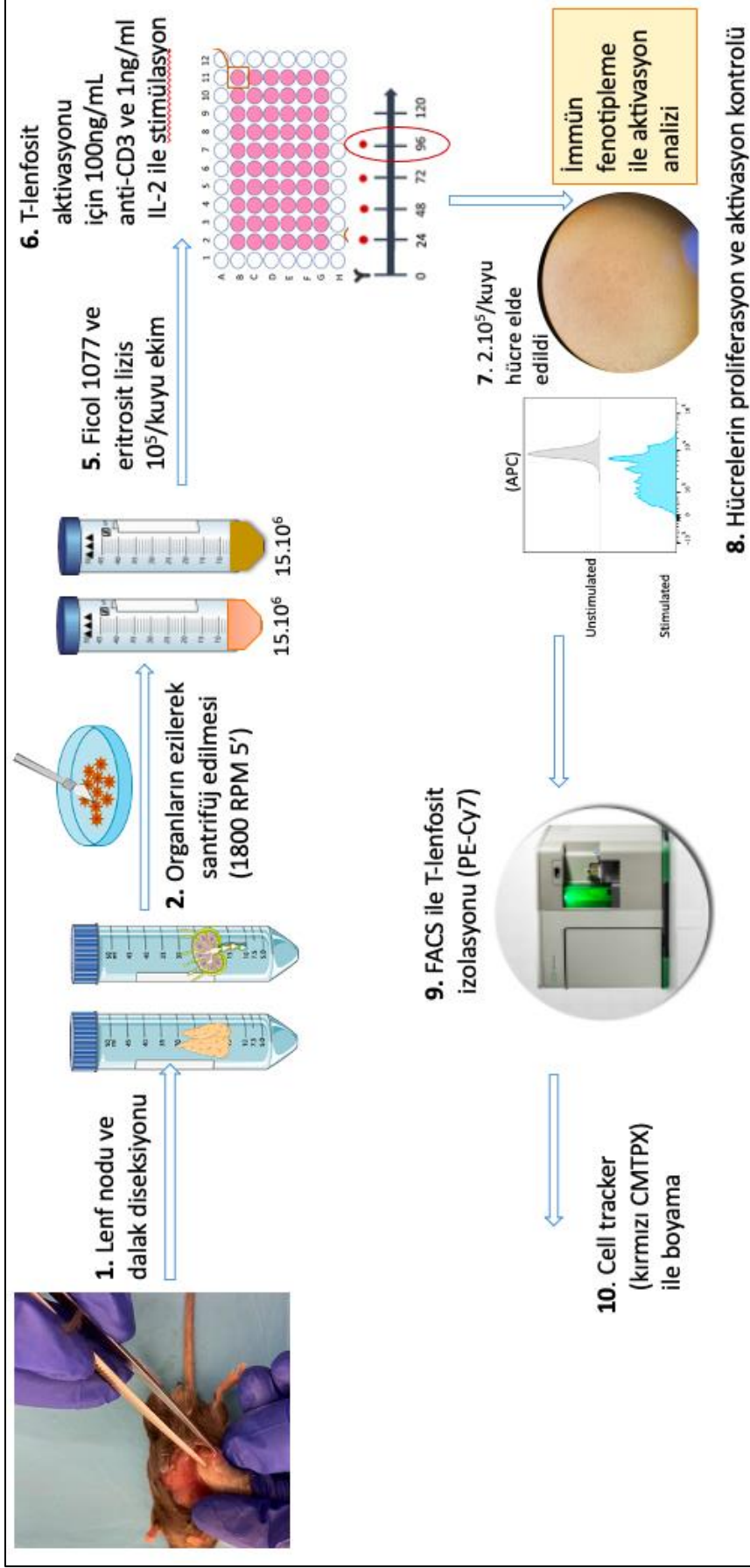
Donör farelerden (n=2) aktif T-lenfosit eldesi ve enjeksiyonuna yönelik prosedür aşağıdaki adımları içermektedir:

1. Fareye, intraperitoneal yolla 0,1-0,5 ml arasında 10 mg/kg dozunda Ksilazin uygulanır. Anestezi etkisinin başlaması beklenir. Fare supin pozisyona getirilir ve arka patiye ağırlı uyarın verilerek anestezi derinliği değerlendirilir.
2. Fare diseksiyonuyla dalak ve yüzeysel lenf nodları çıkarılır ve ayrı ayrı iki falkon tüpüne konur. Üzerini örtecek kadar PEB tamponu eklenir.
3. Bir bisturi ile parçalanmış dalak ve lenf nodları, 0,70 µm gözenek çapına sahip filtreler kullanılarak beta-merkaptolu RPMI içerisine süzülür.
4. Her bir falkon tüpüne, süspansiyon hacmi 10 ml olacak şekilde PBS eklenir.
5. Kollejenaz II enzimi ilavesiyle örnekler, 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilir.
6. İnkübasyondan sonra, süspansiyonlar tekrar 0,70 µm gözenek çapına sahip filtrelerden PBS ile süzülür. Süzgeçte kalan debris atılır.
7. İçindeki eritrositleri elimine etmek amacıyla süspansiyon Fikol solüsyonu ile muamele edilir. Süspansiyonlar Fikol-Paque çözeltisi üzerine katman halinde dökülür.
8. Süspansiyon ve Fikol çözeltisi 5 dk 1800 RPM'de santrifüj edilir. Santrifüjden çıkarılan tüplerde aşağıdan yukarıya pellet, fikol çözeltisi, lenfosit/monosit tabakası, PBS şeklinde katmanlar oluştuğu görülür ve pastör pipeti ile yavaşça lenfosit tabakası toplanır.
9. Toplanmış lenfosit süspansiyonu PBS içinde tekrar 5 dk 1800 RPM'de santrifüj edilir. Pellet RPMI'da çözülür.
10. RPMI'lı süspansiyonlardan 10 µl alınarak PBS ile bir kez 1:1 bir kez 1:9 seyreltilir.
11. Süspansiyondan 100 µl alınarak thoma lamına yayılır ve üzerine lam kapatılır. Lam ve lamel arasında Trypan mavisi solüsyonundan 100 µl mikropipetle yayılır. Trypan

mavisi ölü hücrelerin membranlarından girerek boyanmalarını sağlar, canlı hücreler ise boyanmaz. Bu şekilde ayırt edilerek mikroskop altında canlı hücreler sayılır. Toplam hücre sayısı belirlenir.

12. Ekim esnasındaki aktivasyon markerlarını kontrol etmek için yaklaşık 500,000 hücre ayrılır.
13. Kalan miktar, 96 kuyucuklu plakaya, 10^5 hücre-200 μ l süspansiyon/kuyucuk şeklinde dağıtılmak üzere harcanacak toplam kuyucuk miktarı (n) hesaplanır.
14. 'n' sayıda kuyucuğa dağıtılacak toplam süspansiyon miktarı $200n$ μ l olarak hesaplanır. 'V:hacim' olmak üzere;
$$200n \mu\text{l} = (V_{\text{lenfosit}}) + (V_{\text{IL-2}}) + (V_{\text{antiCD3}}) + (V_{\text{RPMI}})$$
15. T lenfositlerin aktivasyon ve proliferasyonunu uyarmak üzere kuyucuk başına 0,2 μ l interlökin-2 ve 1 μ l CD3 antikor eklemek gerekmektedir. Bu doğrultuda toplam $0,2n$ μ l interlökin-2 ve n μ l CD3 antikor süspansiyona eklenir.
16. Hücrelerin proliferasyon durumunu tayin edebilmek için, CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) boyası kullanılır. Bu boya hücrelerin yüzeyini kaplar ve başlangıçta çoğu hücrelerin büyüklüğü benzer olduğu için akım sitometride ölçülen floresan yoğunluğu tek pik halinde elde edilir. Ancak proliferasyon durumunda ortaya çıkacak hücreler çeşitli boyutlarda ve başlangıçtan daha küçük olacaktır. Bu durumda daha düşük yoğunluklu birden fazla pik görülecektir. Grafik sola kayma gösterecek ve pik sayısı artacaktır. Boyama için süspansiyonda hücre yoğunluğu 10^6 hücre/ml olmalıdır.
17. Toplamda $200 n$ μ l'ye tamamlanmak üzere RPMI eklenir.
18. Hücre işaretleyici-kırmızı-CFSE stok solüsyonu, ürün kullanım kılavuzundaki önerilere uygun olacak şekilde toz halindeki CFSE'ye DMSO (Dimetilsülfoksit) eklenerek hazırlanır. Her 1 ml hücre süspansiyonunu boyamak için 1 μ M CSFE solüsyonu eklenir ve karışım 20 dakika karanlık ortamda 37°C 'de inkübasyona bırakılır.
19. Tüm süspansiyon mikropipet yardımıyla n kuyucuğa dağıtılır. Plaka 37°C 'de inkübatöre yerleştirilir.
20. Doksan altıncı saatte hücreler kuyucuklardan toplanır ve bir falkon tüpüne aktarılır.
21. Tüpteki süspansiyon 5 dk 1800 RPM'de santrifüj edilir.
22. 6.6.3'te anlatıldığı şekilde T lenfositler izole şekilde elde edilir.

23. Enjeksiyondan hemen önce, 'kırmızı hücre etiketleyici' (Cardigreen-red cell-tracker) ile hücreler işaretlenir.
24. Her bir fare için 150 µl PBS içinde 10^6 T-lenfosit iv enjeksiyon yapılmak üzere hazırlanır.
25. T lenfositler 26G insülin iğnesi ile farenin lateral kuyruk veninden enjekte edilir.



Şekil 4-8. Aktif T Lenfosit Eldesi

4.6.3. T-lenfositlerin diğer hücrelerden ayrılması:

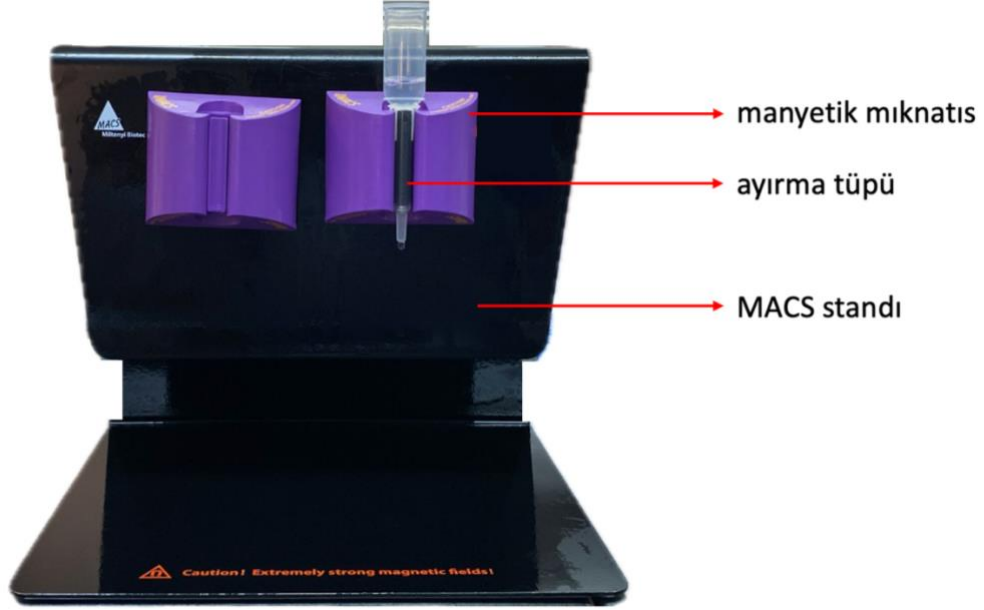
Hücre süspansiyonunda yer alan T lenfositler, diğer tüm hücrelerden 2 farklı yöntemle ayrılabilir. Bu iki yöntem için uygulanan protokoller aşağıdaki gibidir:

A. Manyetik Aktivite ile Hücre Ayırma (Magnetic Activated Cell Sorting-MACS)

Hücre süspansiyonunda yer alan T lenfositler, diğer tüm hücrelerden T lenfosit (90,2) MACS kiti kullanılarak ayrılır (**Şekil 4.8**). Bu yöntem için antijen spesifik antikolar manyetik mikro-boncuklara bağlanmış halde kitler içinde kullanıma sunulur. Her bir kitte farklı hücrelere yönelik antikolar yer alır. Çalışmamızda T-lenfosit izolasyonu amacıyla, mikro boncuklara bağlanmış anti-CD90,2 antikolar içeren kit kullanılmıştır. MACS standında güçlü manyetik alan oluşturan mıknatısların içindeki oyuklara oturtulan iki ayırma sütunu bulunur. Ayırma sütunlarının çeperinde yer alan materyal, manyetik alan içinde kalınca aktifleşir. Sütunun üstünden dökülen süspansiyon yer çekimine karşı hareket ederken, içindeki hücrelerle birbirine tutunmuş mikro boncuklar güçlü manyetik etki nedeniyle sütunun çeperine yapışır. Tüm solüsyon aktıktan sonra sütun manyetik alan etkisinden çıkarılır ve tampon ile yıkanır. Bu şekilde T hücreler diğer hücrelerden ayrılmış olur.

1. Süspansiyonda yer alan her 10^6 hücre için 1 μ l antikorlu mikro-boncuk eklenir ve 10 dakika $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilir.
2. Bu sırada ayırma sütunları paketlerinden çıkarılarak mıknatısların ortasına yerleştirilir. MACS tamponundan 3 ml alınarak sütundan geçirilir.
3. Süspansiyon, anti-CD90,2 ile 10 dk boyunca inkübe edilir.
4. MACS ayırma sütunlarının altına, süspansiyonun istenmeyen kısmını toplamak için boş bir kap yerleştirilir.
5. İnkübe edilmiş süspansiyon sütunlar içinden geçirilir. Bu esnada manyetik alan ve non-kovalent bağlanma kuvvetleri sayesinde izole edilecek hücreler süspansiyondaki diğer tüm hücrelerden ayrılarak sütunların çeperine yapışır. Yer çekimi sayesinde süspansiyonun geri kalanı sütun altında kalan kaptan toplanır ve atılır. Ayırma sütunları mıknatıslardan çıkarılarak manyetik alan etkisi ortadan kaldırılır. Daha sonra sütunların duvarına yapışan hücreler

MACS tamponu ile yıkanarak ayrı bir tüpte toplanır. Oluşan süspansiyonda istenen hücreler izole halde elde edilmiş olur. (Bu çalışma dahilinde T-hücreler izole edilmiştir.)



Şekil 4-9. MACS kiti manyetik mıknatıs, ayırma tüpü ve MACS standından oluşur.

B. Floresan-aktif hücre ayırma (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*):

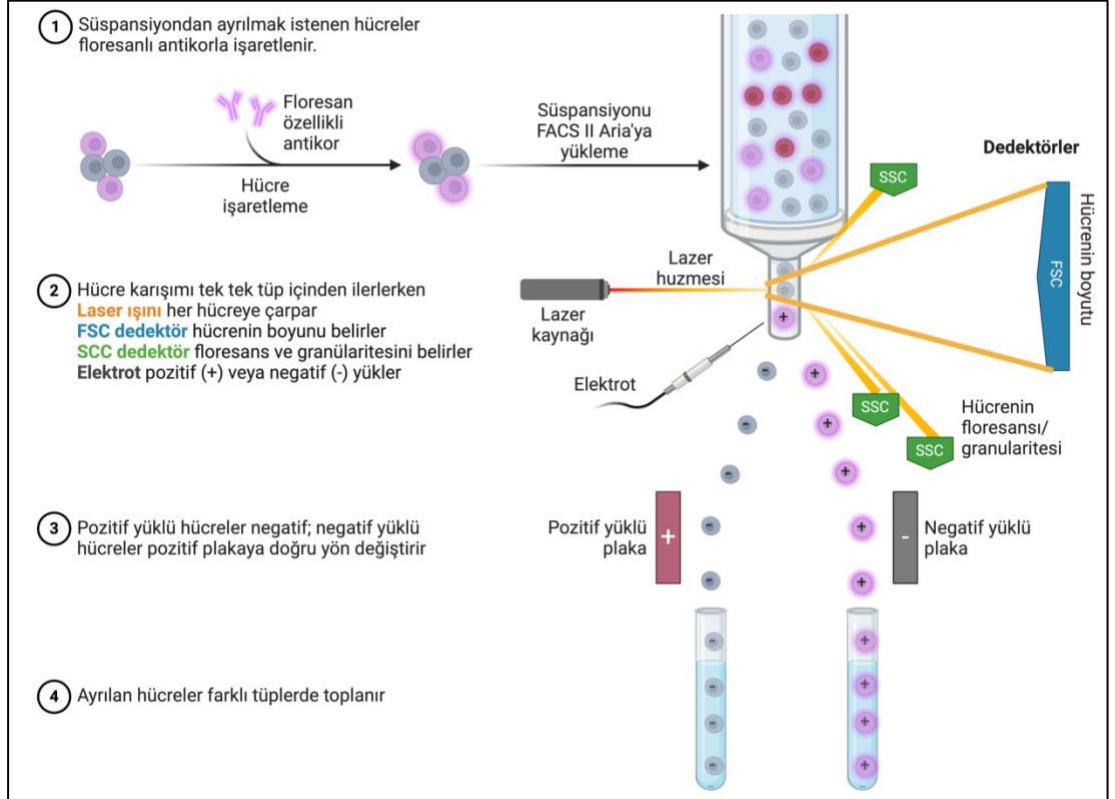
Bu yöntem için laboratuvarımızda bulunan akım sitometri (BD FACS Aria II) cihazının hücre ayırma ünitesi kullanılmıştır. FACS yöntemi esas olarak organların parçalanmasıyla oluşturulan tek hücre süspansiyonundan naif T lenfositleri ve 96 saat boyunca uyarılma sinyallerine mağruz bırakılmış aktif T lenfositleri izole etmek amacıyla kullanılmıştır. Bunun yanında MACS yöntemiyle toplanan hücrelerinin saflığının düşük olduğu durumlarda, FACS yöntemiyle hücre saflığının artırılması da sağlanmıştır.

1. Süspansiyon 5 dk 1800 RPM'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
2. Pellet 50 ml'lik falkon tüpüne alınır ve üzerine 1 ml PBS eklenir ve süspansiyon oluşturulur.

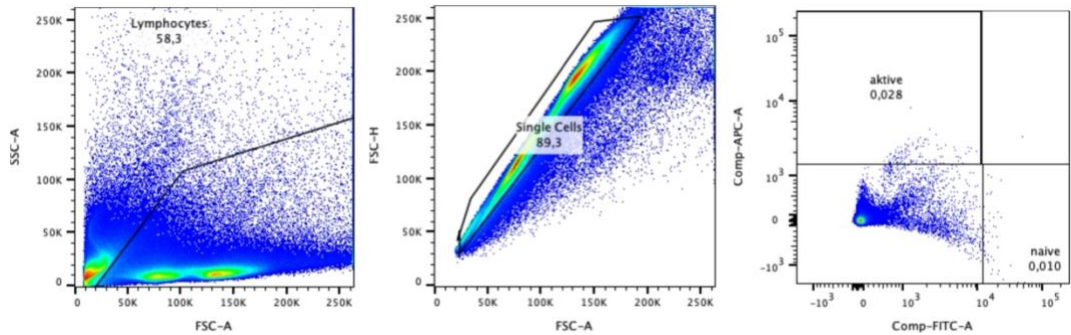
3. Süspansiyon, Anti-CD4 ve Anti-CD8 antikorları ile boyanarak +4°C'de 40 dk inkübe edilir (Süspansiyon derişimi ve eklenecek olan antikor miktarı antikor ürün kataloğuna göre belirlenir)
4. İnkübasyon sonunda süspansiyonlara 2 ml PBS eklenerek hücreler santrifüjle yıkanır.
5. Yıkama sonrasında hücreler 2 ml PBS içinde çözümlenerek akım sitometriye hazırlanır.
6. Cihazın hücre ayırma işlemi için kullanılan akışkan sistem parametreleri optimize edilir. 2 µm ve 3 µm çaplı polistiren boncuklar (*Accudrop beads*, BD Biosciences, ABD) cihaza yüklenir, deneme ayırması yapılır. Cihaz ayarları için ayırma ünitesinde bulunan defleksiyon plakaları arasına giriş zamanı, uygun frekans ve voltaj değerleri belirlenir. Lazer seçimi ve filtre/detector ayarı, floresan işaretleyicinin özelliklerine göre belirlenir
7. Ayrılacak örneği içeren tüp makineye yerleştirilir ve ayırma işlemi başlatılır.

Akım sitometri cihazına yüklenen süspansiyondaki hücreler, hidrodinamik odaklama yöntemiyle bir tüp boyunca tane tane düşürülerek akım tüpünden geçirilir. Tüpün inferiorunda lazer kaynağı ve oradan çıkan ışınların üzerine düştüğü dedektörler karşılıklı olarak yerleşmiştir. Bu, hücrelerin karşılaşacağı birinci lazer ışığıdır. Tüp boyunca akarken bir noktada lazer ışığın önünden geçen hücreler, büyüklüklerine ve dansite özelliklerine göre iki farklı saçılıma neden olur. Lazer kaynağından çıkıp hücrelere teğet geçerek ya da hücreden 10-18° saparak lazer kaynağının tam karşısındaki dedektöre düşen saçılım 'ileri saçılım' (*Forward Scatter*, FSC) olarak adlandırılır. Hücreye çarparak hücrenin içeriğine göre doğrultusunu değiştiren ve tam karşındaki dedektör yerine yanlardaki dedektör tarafından kaydedilen saçılıma 'yana saçılım' (*Side Scatter*, SSC) adı verilir. Genelde bu amaçla yaklaşık 90° açı yapan saçılımlar hesaplanır. Bu aşamaya kadar toplanan değerler, hücrenin boyut ve granülaritesinin bir fonksiyonu olarak değerlendirilir. Hücrenin üzerine antikor vasıtasıyla iliştirilen floresan özellikteki işaretleyici ise, ikinci bir lazer kaynağıyla uyarılır ve işaretleyiciye has bir dalga boyunda ışımaya yapar. Bu da üçüncü tipte dedektörler tarafından kaydedilir. Tüpü terk eden bir hücre bu seviyede elektrodlar tarafından static olarak yüklenir ve

yoluna yüklü plakalar arasından devam ederken üzerindeki yüke göre yön değiştirir ve farklı kaplara düşer (Şekil 6-9). Hücre ayırma için kullanılan kapılama stratejileri (Şekil 6-10) hücrelerin boyutsal ayrımları, granüler ayrımları ve floresan konjuge antikor işaretlemeleri kullanılarak FACS Diva yazılımıyla oluşturulur. FACS aracılığıyla hücre saflığının %96'nın üzerinde olması sağlanır.

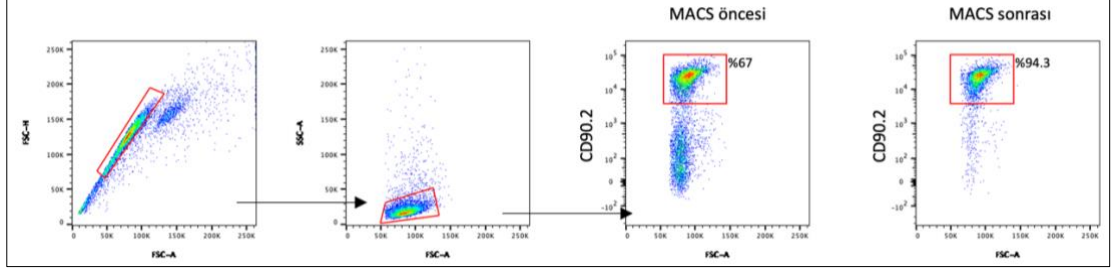


Şekil 4-10. Akım sitometri ve akım sitometride hücrelerin ayrılması



Şekil 4-11. Kapılama stratejileri- Lenf nodundan aktive ve naif lenfosit ölçümü

MACS kullanılarak izole edilen bir süspansiyonda bu tekniğin ne kadar efektif olduğunu değerlendirmek amacıyla FACS kullanılarak kontrol yapılmıştır. Bu amaçla, karışık hücre süspansiyonunun T lenfosit yüzdesi MACS'tan önce ve sonra akım sitometride ölçülmüştür.



Şekil 4-12. MACS etkinliğini değerlendiren akım sitometri çalışması

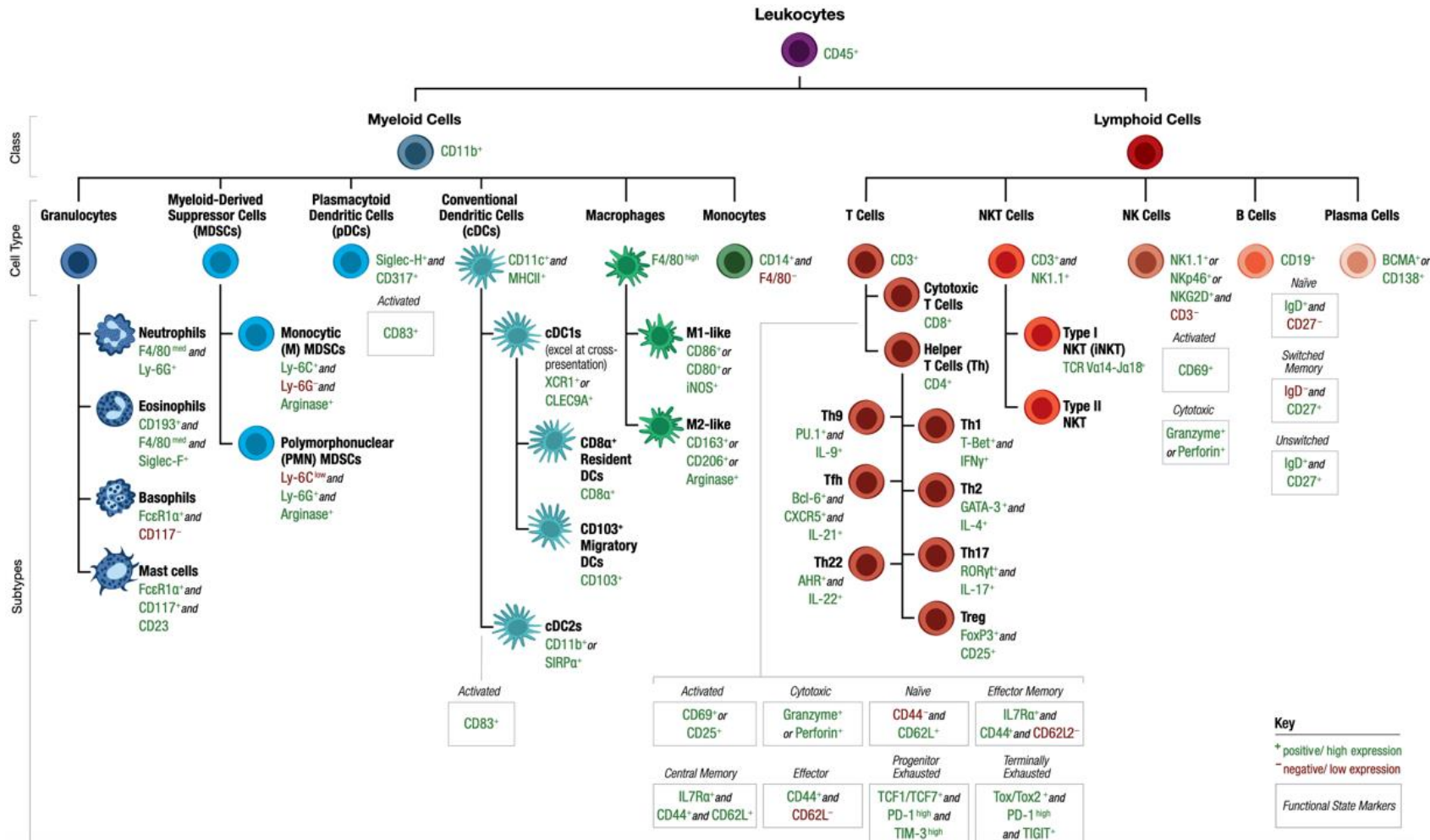
4.6.4. Hücrelerin Proliferasyon ve Fenotip Değerlendirmesi:

Bağışıklık sistemi hücreleri, matürasyon ve aktivasyon durumlarına göre farklı yüzey molekülleri ifade eder (Şekil 6-10). Bu çalışmada T lenfositlerin CD-3 antikorunu ve IL-2 ile ekildiği saatte, ekimin 24. ve 96. saatlerinde aktivasyon durumu ve proliferasyon kabiliyetlerini değerlendirmek amacıyla CD25, CD44 ve CD69 ifadeleri incelenmiştir.

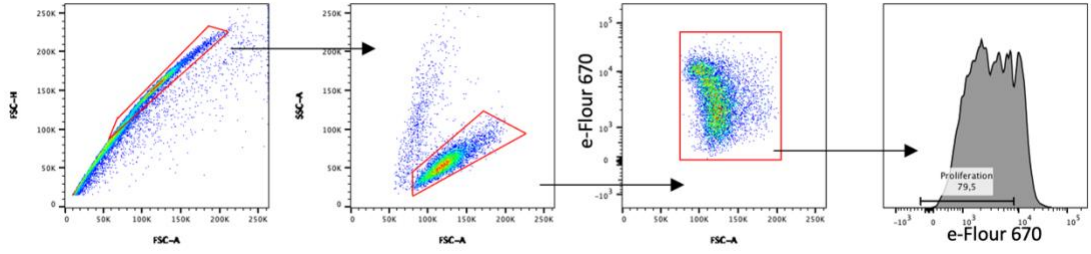
CD69 hücre migrasyonu ve dokularda tutunmayı düzenler. CD69, erken aktivasyon döneminde hızla artar ve pozitif saptanması, lenfositlerin olası bir immün aktivite içinde ya da bu şekilde bir uyarıyla efektör yanıt oluşturmaya hazır olduğu anlamına gelir. CD25, IL-2 reseptörünün bir bileşenidir ve aktivasyonun görece geç döneminde ifade edilir. CD25'in pozitif saptanması hücrenin proliferasyon halinde olduğunu ve efektör ya da düzenleyici T lenfositlere dönüştüğünü gösterir. CD44, antijenle daha önce karşılaşarak aktifleşmiş uzun ömürlü T lenfositlerde ifade edilir. Pozitif saptanması, hücrenin aktif otoimmün rol üstlendiği ya da hafıza rolünde olduğu şeklinde yorumlanabilir [247, 248].

Aktivasyon ve proliferasyon için fenotip değerlendirme protokolü:

- 1- T lenfositler, anti-CD3 antikor ve IL-2 ile ekildikleri kuyucuklardan toplanır.
- 2- Hücreler 100 µLPBS içinde süspanse edilir. Üzerlerine CD25, CD44 ve CD69'a özgül floresan konjuge antikorlar, uygun kombinasyon ve ideal konsantrasyonlarda eklenip +4C°'de, karanlıkta, 40 dk inkübe edilir.
- 3- İnkübasyon sonunda örneklere 2 mL PBS tamponu eklenir,
- 4- Örnekler 1800G'de 5 dk santrifüjlenerek yıkanır.
- 5- Yeniden 150 µL Cell Wash tamponu ile süspanse edilen hücreler akım sitometri ile okunur (Şekil)ve veri dosyaları .fcs (*flow cytometry standard*) dosya formatında FlowJo yazılımına (Tree Star, ABD) aktarılır.
- 6- Yüzey molekül ifadeleri analiz edilir. Ortalama floresan yoğunlukları (OFY) değerlendirilirken, kullanılan floresan ve cihaz voltaj farklılıklarını dışlayabilmek için yapılan analizdeki OFY değerleri aynı analizde bakılan otofloresan OFY değerlerine bölünür.



Şekil 4-13. Bağışıklık sistemi hücrelerinde yüzey molekülleri (Cell Signaling Technology Inc.'den izin alınarak eklenmiştir. www.cellsignal.com)



Şekil 4-14. Proliferasyon Kapılama protokolü

4.7. Hücre sayımı:

Hücre sayma işlemi için aşağıdaki adımlar uygulanır:

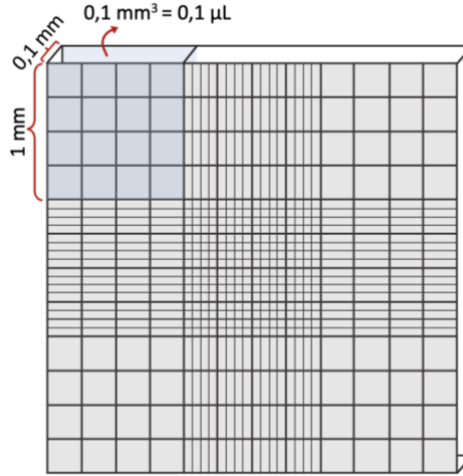
- 1- Süspansiyondan 10 µl alınarak PBS ile bir kez 1:1 ve bir kez 1:9 oranda seyreltilir.
- 2- Seyreltilen kısımdan 10 µl alınarak thoma lamına yayılır ve üzerine lamel kapatılır. Lam ve lamel arasında (kapiller kuvvetten faydalanarak %0,4'lük Trypan mavisi çözeltisinden 10 µl mikropipetle yayılır. Trypan mavisi ölü hücrelerin membranlarından girerek boyanmalarını sağlar, canlı hücreler ise boyanmaz. Daha sonra, bir ışık mikroskobu altında (40x), kalın ızgaralarla bölünmüş on altı karenin dört tanesi seçilir ve bu karelerin içindeki hücreler sayılır. Lam ile sayım odası arasındaki mesafe 0,1 mm ve odanın boyutu 0,1 mm x 0,1 mm'dir (Celeromics, Fuchs-Rosenthal Odası Formülleri, İngiltere). Ayrıca, on altı karenin her birinin kenarı 1 mm'dir. Buna göre, hücrelerin sayımı verilen

$$\text{Alan} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$$

Formül 4 1

$$\text{Hacim} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$$

$$\text{Hücre derişimi (hücre/mL)} = \frac{\text{Sayılan toplam hücre sayısı} \times 10,000}{\text{Sayılan toplam kare sayısı}} \times \text{dilüsyon faktörü (20)}$$



Şekil 4-15.Thoma lamının şematik görseli.

4-14. *Ex vivo* Görüntüleme ile T lenfosit Dağılımının İncelenmesi

Enjeksiyondan hemen önce T lenfositler, floresan özellik gösteren ‘kırmızı hücre etiketleyici’ ile işaretlendiği için organlarda biriktikleri miktar, floresans ölçümü ile belirlenebilir. Bu amaçla farelerin enjeksiyondan sonraki 16. Saatte sakrifiye edilmesi ve T lenfositlerin biyodağılımının incelenmesine yönelik prosedür aşağıdaki adımları içermektedir:

1. Fareye, intraperitoneal yolla 0,1-0,5 ml arasında 10 mg/kg dozunda Ksilazin uygulanır. Anestezi etkisinin başlaması beklenir. Fare supin pozisyona getirilir ve arka patiye ağırlı uyarın verilerek anestezi derinliği değerlendirilir. Sakrifiye edilir.
2. Beyin, servikal spinal kord, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve yüzeysel lenf nodları diseke edilerek ayrı tüplere konur.
3. Newton 7.0 (Vilber, Fransa) cihazı ve bu cihaza bağlı bilgisayardaki Vilber yazılımı açılır (Şekil 6).
4. Organlar, cihazın tablasına önceden belirlenen sırada yerleştirilir ve cihazın kapağı kapatılır.
5. Yazılım arayüzünden “Yeni Görüntüleme” seçilir.
6. Kullanılan etiketleyicinin uyarım ve emisyon dalga boyu ayarlaması (CellTracker™ Red CMTPX Dye için 577/602 nm) yapılır.
7. Görüntü kalitesi için ISO ve kazanç ayarlamaları yapılır ve görüntü alınır.

8. Arayüzdeki 'Bölge işaretleme' (Range of Interest-ROI) seçilir. Aktifleşen işaretleme şekillerinden biri kullanılarak floresansı ölçülmek istenen alanlar tek tek işaretlenir.
9. Cihaz tarafından kaydedilen tüm görüntülerde, florokrom bir işaretleyici enjekte edilmemiş olsa bile dokunun kendi floresans özelliği nedeniyle bazal bir parlama (otofloresans-OF) görülür. Bu nedenle kontrol hayvanlardan alınan organlardaki ofloresans deney grubunda hesaplanan değerlerden çıkarılmıştır. Böylece T lenfositlerdeki işaretleyiciden gelen net ortalama floresan (foton) yoğunluğu (OFY) $\text{foton/cm}^2/\text{saniye/pr}$ cinsinden elde edilmiştir. Birim, belirli bir alana (cm^2), belirli bir süre boyunca (saniye), belirli bir yönde (steradyan) düşen foton sayısını ifade eder. OFY, toplam floresans miktarının alana bölünmesi ile elde edilir. Bu nedenle her organın alanı cm^2 cinsinden hesaplanmış ve OFY ile çarpılarak toplam floresans(TF) elde edilmiştir. Toplam floresans ve OFY organ ağırlıklarına bölünerek, ağırlığa normalizasyon uygulanmıştır. OFY ve TF T lenfosit sayısı ile orantılı olduğu için biyodağılım çalışmalarında temel olarak bu iki parametre üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Organların T hücre tutulumu fokal olabildiği için TF ve OFY'nin arasındaki fark paralel olmayacağından değerlerin ikisi de değerlendirmeye katılmıştır.



Şekil 4-16. Biyodağılım çalışmasında ex vivo görüntüleme. A. Newton 7.0 hayvan görüntüleme cihazı B.Organların tablaya dizilmiş hali C.Yazılımda alınan görüntü

4.8. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) Skoru:

Hayvanlardaki motor kuvvet kaybı aşağıdaki **Tablo 4.4**'e göre skorlanmıştır.

Tablo 4-4. DOE Skorlama tablosu

Skor	Klinik Gösterge
0	Klinik olarak normal (Kuyruğun tabanından tutulduğunda, kuyruk gergin ve dik durur. Arka bacaklar genellikle ayrılmıştır. Fare yürürken, yürüyüşünde veya başında eğilme yoktur).
0,5	Zayıf kuyruk (Fare kuyruk kökünden tutulduğunda, kuyruğun sadece ucunda güçsüzlük vardır. Kuyruğu tutarken kaslarda gerilme hissedilir, ancak kuyruk hareket etmeye devam eder).
1,0	Paralize kuyruk (Fare kuyruk kökünden tutulduğunda, kuyruk yer çekimine karşı hareket edemez. Arka bacaklar genellikle ayrılmıştır. Kuyruğun hareket ettiğine dair bir işaret gözlemlenmez).
1,5	Zayıf arka bacaklar ve paralize kuyruk (Kuyruk kökünden tutulduğunda, tüm kuyruk parmağın üzerine dökülür. Fare tel bir rafa bırakıldığında, arka bacaklardan en az biri sürekli olarak aradan düşer. Yürüyüşü çok hafif sallantılıdır).
2,0	Zayıf arka bacaklar (Kuyruk kökünden tutulduğunda bacaklar birbirine yakın durur. Fare yürütüldüğünde belirgin bir şekilde sallantılı yürüme gözlemlenir. Bir bacağın ayak parmakları sürüklenirken, diğer bacakta hareket kısıtlılığı gözlemlenmez).
2,5	Her iki arka bacakta da bir miktar hareket vardır, ancak her iki bacak da ayaklar da sürüklenir (Fare arka ayaklarına takılır). VEYA - Bir bacakta hiç hareket yok/ bir bacak tamamen sürüklenirken, diğer bacakta hareket vardır. VEYA - Fare kuyruk kökünden tutulduğunda DOE şiddeti 0-1.5 arası görünür. Ancak farenin zaman zaman düşmesine neden olabilecek baş düşüklüğü vardır.
3	Paralize arka bacaklar (Kuyruk ve arka bacakların tamamen felci (en yaygın). VEYA -

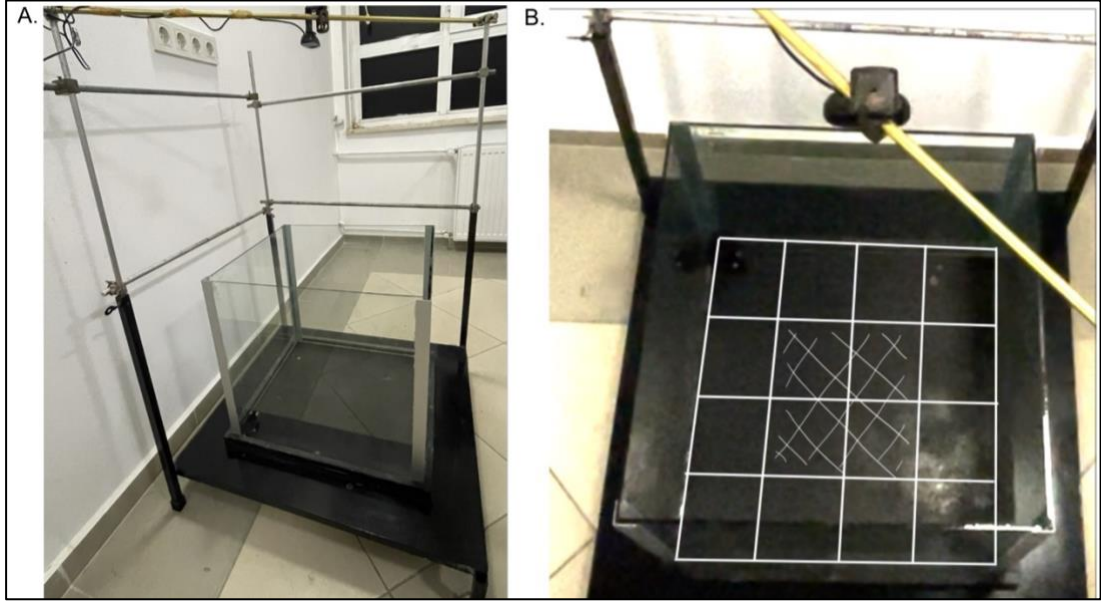
	<p>Kuyruk ve arka bacakların neredeyse tamamen felci. Bir veya her iki arka bacak palet hareketi yapabilir, ancak kalçanın önüne geçecek kadar hareket edemez.</p> <p>VEYA -</p> <p>Kuyruğun tamamı ile bir ön ve bir arka bacağın felci.</p> <p>VEYA -</p> <p>Aşağıdakilerin tümü:</p> <p>Şiddetli baş düşüklüğü,</p> <p>Kafesin kenarları boyunca yalnızca yürüme,</p> <p>Kafes duvarını itme,</p> <p>Kuyruk kökünden tutulduğunda spin şeklinde dönme.</p>
3,5	<p>Kuyruk ve arka bacakların tamamen felci. Ek olarak:</p> <p>Fare kafes etrafında hareket eder, ancak sırt üstü bırakıldığında kendini doğrultamaz. Arka bacaklar vücudun bir yanında birleşmiştir.</p> <p>VEYA -</p> <p>Fare kafes etrafında hareket eder, ancak arka kısımlar düzleşmiş gibidir, ön ekstremiteler bir tümsek görünümündedir</p>
4	<p>Zayıf ön bacaklar ile birlikte paralize arka bacaklar (Kuyruğun ve arka bacakların tam, ve ön bacakların kısmi felci. (Fare minimum hareketle kafes etrafında dolaşır ancak uyanık görünür ve beslenir. Fare 4.0 puanını 2 gün aldıktan sonra genellikle ötenazi önerilir. Ancak, günlük s.c. sıvılarla çoğu C57BL/6 faresi 3.5 veya 3.0 puanına düşebilir, Fare ciddi felç nedeniyle ötenaziye tabi tutulduğunda, deneyin geri kalanı için bu fare için 5.0 puan girilir.)</p>
4,5	<p>Paralize ön ve arka bacaklar (Arka bacak ve kuyruğun tam, ön bacakların kısmi felci. Kafes etrafında hareket yoktur. Fare uyanık değildir, temasla zor tepki verir. Fare, ön bacaklarda minimum hareket gösterebilir.</p> <p>Ötenazi önerilir. Fare ciddi felç nedeniyle ötenaziye tabi tutulduğunda, deneyin geri kalanı için bu fare için 5.0 puan girilir.)</p>
5	<p>Ölüm Hareketsiz;+/+ zorlukla nefes alabiliyor</p> <p>Fare, kafeste kendiliğinden yuvarlanır (ötenazi önerilir).</p> <p>VEYA -</p> <p>Fare, felç nedeniyle ölü bulunur.</p> <p>VEYA -</p> <p>Fare, şiddetli felç nedeniyle ötenaziye tabi tutulur.</p>

4.9. Davranış Deneyleri:

DOE skoru, özellikle inflamasyonun hızla pik yaptığı ve motor kuvvet kaybı ile sonuçlanan bir hayvan modeli için geliştirilmiştir. Ancak, kuprizonla indüklenen toksik demiyelinizasyon modelinde motor kuvvet kaybı belirgin olmadığı için DOE skoru kullanılarak yapılan değerlendirmelerde klinik etkilenme şiddeti net olarak belirlenememektedir. Bu nedenle, kuprizon uygulaması ve T lenfosit transferi sonucunda ortaya çıkan hastalık bulgularının daha doğru bir şekilde değerlendirilmesi için çeşitli davranış deneyleri uygulanmıştır. Bu deneyler, progresif demiyelinizasyonun klasik etkileri olan lokomasyon bozukluğu, allodini (ağrıya duyarlılıkta artış) ve psikolojik etkilenme gibi parametreleri inceler. Bu parametrelerin değerlendirilmesinin, dejenerasyon ve yer yer inflamasyonla ilerleyen progresif demiyelinizasyon sürecinin klinik etkilerini daha net bir şekilde ortaya koyacağı düşünülmüştür.

4.9.1. Açık Alan Arena Testi:

Bu test, farelerin lokomotor aktivitelerini ve anksiyete ile ilgili davranışlarını ölçmek için kullanılabilir, fakat bu çalışmada farelerin hareket kabiliyetlerini değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır [249]. Testte, bir kenarı 45 cm olan, üstü açık cam bir küp kullanılmıştır. Kare zeminin %24'lük orta kısmı 'merkez' olarak, kalan kısmı ise 'çevre' olarak nitelendirilmiştir. (**Şekil 6.6**). Fareler her seferinde aynı yöne bakacak şekilde platforma bırakılmış ve zemin üzerindeki hareketleri 60 dakika boyunca video izleme sistemiyle kaydedilmiştir. Bu süre içerisinde, farenin kat ettiği toplam mesafe, ortalama hızı, maksimum hızı, dönüş sayısı ile küpün kare zemininde 'merkez'de ve 'çevre' alanda geçirdiği süreler ölçülmüştür.



Şekil 4-17. Açık alan arena testi A. Test platformu B. Merkez ve çevre ayrımı

4.9.2. Von Frey Filamanı Testi:

Farelerin ağrı benzeri davranışlarını değerlendirmek amacıyla mekanik allodini testi olarak Von Frey Filamanı Testi kullanılmıştır (X). Test aparatı, yerden 20 cm yükseklikte ayakları olan, bu yükseklikteki alt zemini 0,5 cm'lik kare delikli sert fileden oluşan ve üzerinde yüksekliği, eni ve boyu sırasıyla 22 cm, 15,5 cm ve 19,5 cm olan üstü açık cam kısımdan oluşmaktadır (Şekil 6.7A). Fareler test aparatına alındıktan sonra 10 dakika alışmaya bırakılmıştır. Ardından farelerin arka patilerini çeşitli filamanlara (Aesthesio®, DanMic Global, LLC, ABD) göre çekme durumları kayıt edilmiştir (Şekil 6.7B). Farelerin ilk olarak sağ arka patisi ve 2 dk ara sonrasında aynı protokolle sol arka patisi incelenmiştir. Teste 0,4 g'lık filaman ile başlanmış, sırayla artırılarak farenin patisini ilk çektiği filamandan sonra “artırma-ve-düşürme (*up-and-down*)” metoduna göre 4 filaman daha uygulanmış ve test sonlandırılmıştır. Farelerin mekanik allodini durumlarının değerlendirilmesi % 50 geri çekme eşik değerleri olarak “*up-and-down*” metodu ile açık erişimli ‘https://bioapps.shinyapps.io/von_frey_app/’ web sitesi üzerinden hesaplanmıştır [250].



Şekil 4-18. Von Frey Filamanı testi. Taktil duyu vermek için filamanlar telin altından farenin patisine dokundurulur

4.9.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi:

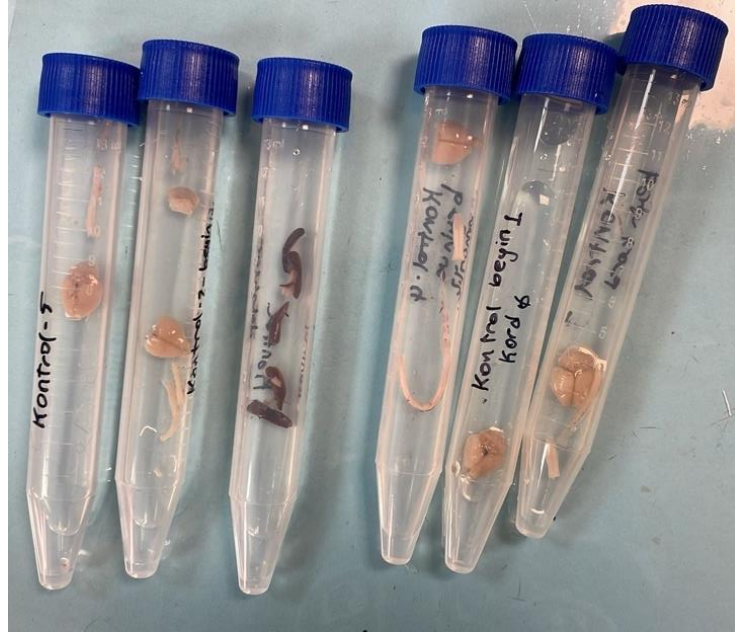
Bu test, farelerin anksiyete düzeylerini ölçmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneği, birbirine dik olarak yerleştirilmiş ve artı şeklini alan dört koldan oluşmaktadır; bunlardan ikisi açık, diğer ikisi kapalıdır. Zemin ve duvarlar siyah renklidir. Kolların her birinin genişliği 15 cm, uzunluğu 45 cm ve kapalı kolların duvar yüksekliği 40 cm'dir. Düzenek, ayaklar vasıtasıyla zeminden bir metre yükseltilmiştir [251]. Test esnasında, fareler açık olan bir kola doğru yüzleri dönük halde bırakılmış ve beş dakika boyunca video izleme sistemi ile takip edilmiştir. Farelerin açık kollarda geçirdiği süre, bu kollarda kat ettiği mesafe ve açık kollara kaç kez geçtiği gibi veriler toplanmıştır.

4.10. Histopatolojik değerlendirme:

4.10.1. Doku Toplama:

Diseksiyon işlemi Vincenzo Covelli'nin Fare Nekropsi Kılavuzu'na göre basamaklandırılmıştır:

1. Fareye, intraperitoneal yolla 0,1-0,5 ml arasında 10 mg/kg dozunda Ksilazin uygulanır. Anestezi etkisinin başlaması beklenir. Fare supin pozisyona getirilir ve arka patiye ağırlı uyarın verilerek anestezi derinliği değerlendirilir. Sakrifikasyon yapılır.
2. Pubis bölgesindeki cilde bir kesi atılır. Karın ve toraks bölgesindeki tüm cilt pubis-çene hattında açılır. Kesi arka bacaklara doğru genişletilir ve proksimal kaslar arasından siyatik sinir çıkarılır.
3. Ksifoid kemikten kesmeye başlanarak kostalar iki yana açılır ve perikarddan, plevradan serbestlenir.
4. Diyafram pens ile tutularak bisturiyle kostalardan ve iç organlardan serbestlenir.
5. Dalak ve karaciğeri diyaframa bağlayan ligamanlar kesilir. Karın iç organlar bir tarafa itilerek önce dalak ve sonra karaciğeri dorsal vücut duvarına bağlayan damar ve dokulara erişilir. Önce dalak ve sonra karaciğer çıkarılır.
6. Bağırsaklar, pelvise mümkün olduğunca yakın kesilerek kadavradan çıkarılır.
7. Abdomen arka duvarında bulunan böbrekler damar ve dokulardan ayrılarak çıkarılır.
8. Trakea takip edilerek nazikçe akciğer çıkarılır.
9. Beynin çıkarılması için fare pron pozisyona alınır ve kafa derisi açılır. Makasla nazal septum ve ardından sırayla oksipital ve parietal kemikler kesilir. Pens ile frontal lobun altına nazikçe girilir ve beyin kaldırılır. Beyin sapı omurilikten ayrılarak beyin çıkarılır.
10. Cilt kesisi dorsal yüzde kuyruğa kadar ilerletilerek omurga üzeri açılır. Önce paraspinal kaslar ve ardından kemikler açılarak omurilik çıkarılır.
11. Organlar 10:1 formalin içine alınır (**Şekil 6.15**).
12. Toplanan dokular tamponlu paraformaldehit içerisinde 72 saat +4 °C'de fiksasyona maruz bırakılır (**Şekil 6-16**).

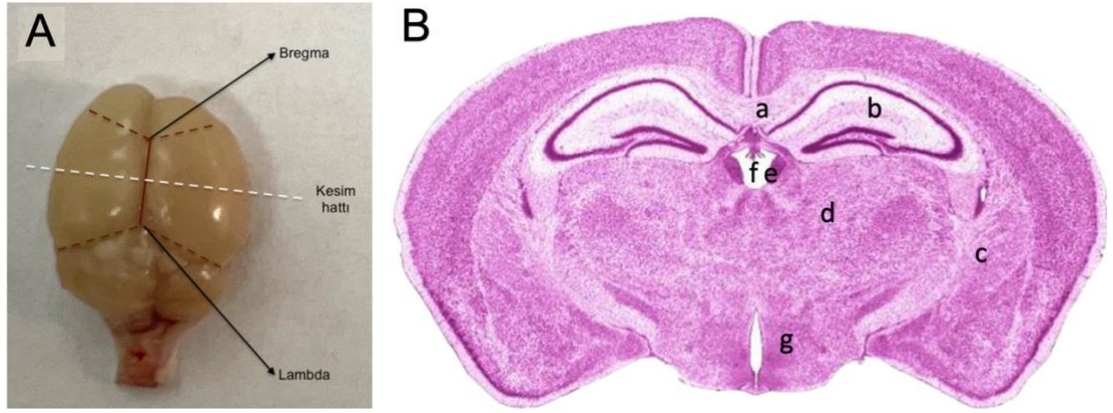


Şekil 4-19. Farklı etiketlenmiş tüplerde formalin içinde beyin, spinal kord ve dalak



Şekil 4-20. Fiksasyon yapılmış spinal kord ve beyin

Beyin, histopatolojik çalışmalarda kullanılmak üzere bisturi ile ikiye ayrılır. Bunun için çalışmamızda Harvard Fare Beyni Atlası kullanılarak hipotalamus, talamus, hipokampus, amigdala, korpus kallozum, habenular çekirdek, koroid pleksus ve subpial korteksin görülebileceği bir kesit belirlenmiştir. Bu kesit için bregma ve lambda arasında hayali bir çizgi çizilir. Bu çizginin tam ortasından koronal düzlemde kesim yapılır (Şekil 4-20). Servikal spinal kord proksimalden 1 cm uzunlukta alınır. Transvers şekilde parafin bloklara gömülür.



Şekil 4-21. Beyin kesit hazırlığı **A.** Koronal kesi hattı. **B.** Hematoksilen & Eozin boyalı kesit **a.** Korpus kallozum **b.** Hipokampus **c.** Amigdala **d.** Talamus **e.** Habenula **f.** Üçüncü ventrikül **g.** Hipotalamus

4.10.2. Doku Takibi ve Kesit Hazırlığı

İmmüno Floresan incelemeler dışındaki histopatolojik boyamalara hazırlık amacıyla yapılan doku takip işlemleri:

1. Dokular sırasıyla %50 - %70 -%96 ve %100 alkol serilerinde birer saat bekletilir.
2. Ksilen istasyonunda bir kez 30 dk bir kez 45 dk bekletilir
3. Ksilen ve parafin'den oluşan 1:1'lik karışımda 45 dk bekletilir.
4. Parafin istasyonunda iki kez 45'er dk bekletilir.

Çalışmamızda dokuları parafine gömme işlemi sırasında ısıtıcı tabla (Leica Biosystems, HI 1220 Flattening table, Illinois, ABD) ve sıvı parafin sağlayıcısı (Leica Biosystems, EG1120 Paraffin Wax Dispenser, Illinois, ABD) kullanılmıştır. Parafin bloklara gömme adımları:

1. Dokular, takip kasetlerinden çıkarılarak incelenecek yüzeyleri alta gelecek şekilde metal bloklara yerleştirilir.
2. Üzerlerine takip kasetlerinin kapaksız halleri konur.
3. Bloklar soğumak üzere soğutucu tabla (Maxotech, Cooling plate, İstanbul, Türkiye) üzerine bırakılır.
4. Parafinin tamamen katılaşmasının ardından, parafin bloklar metal bloklardan çıkarılır.

5. Parafin bloklardan, tam motorize mikrotom (Leica Biosystems, RM2255, Illinois, ABD) kullanılarak 3 veya 5 µm kalınlığında kesitler alınır.
6. Kesitler, 48 °C'ye ayarlı su banyosuna (Leica Biosystems, HI 1210 Water bath, Illinois, ABD) aktarıldıktan sonra pozitif yüklü lamlar üzerine yerleştirilir.
7. Lamalar, en yüksek sıcaklığı 56 °C olan etüvde 3 saat boyunca tutulur.

4.10.3. Histopatolojik Boyama ve Değerlendirme:

Çalışmamızda parafine gömülmüş beyin ve spinal kord kesitleri; *Hematoksilen&Eozin (H&E)* ile histokimyasal yolla boyanarak inflamatuvar hücre dağılımı ve doku morfolojisi değerlendirilmiştir. Hematoksilen&Eozin boyama protokolü:

1. Kesitler, deparafinizasyon için 10'ar dakika sürelerle iki kez ksilende bekletilir.
2. Rehidrasyon için absöü alkol, %95, %70 ve %50'lik alkol çözeltilerinde ve distile suda 5'er dakika bekletilir.
3. Kesitler Harris hematoksileni boyasına daldırılarak 5 dakika bekletilir.
4. Kesitler çeşme suyunda yıkanır. Lityum karbonat solüsyonunda dekolorize edilerek çeşme suyunda tekrar yıkanır.
5. Kesitler 30 saniye boyunca asit alkole batırılarak sitoplazma görünür hale getirilir.
6. Kesitler, çekirdekleri boyamak için 1 dakika süreyle eozin boyasına daldırılır.
7. Dehidratasyon için sırasıyla %50 - 70 - 80 - 90 - 100 alkolde 5'er dakika bekletilir.
8. Kesitler ksilene alınarak iki kez 5'er dakika bekletilir.
9. Kesitlere entellan/mounting medium damlatılarak lamel kapatılır.

İmmünoperoksidaz testler otomatize immün boyama cihazıyla (Leica Biosystems, BOND-MAX Fully automated IHC staining system, Illinois, ABD) gerçekleştirilmiştir. MBP boyaması için primer antikor olarak poliklonal tavşan antikor (BSB5779, Bio SB, Santa Barbara, ABD) kullanılmıştır. Kullanıma hazır formdaki antikor geri çekme (*retrieval*) solüsyonu olarak etilen diamin tetra asetik asitte (EDTA) 20 dk kaynatılmış ve 45 dk inkübasyon süresi uygulanmıştır. Sekonder elemanlar için cihaz ile uyumlu kullanıma hazır kitten (Leica Biosystems, DS9800, BOND Polymer Refine Detection, Illinois, ABD) yararlanılmıştır. Bu kit içerisinde

peroksit bloğu, post primer, polimer reaktifi, diaminobenzidin (DAB) kromojen ve hematoksilin karşı boyasını içermektedir. İmmünoperoksidaz test ile boyama protokolü:

1. Kesitler ksilen ile 3 kez, her biri 5 dakika sürecek şekilde yıkanır.
2. Kesitler artan alkol derecelerinin her birinde (100%, 90%, 70%, 50%) 5 dakika bekletilirve son olarak distile su ile durulanır.
3. Kesitler sodyum sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde basınçlı kapta 95-100°C'de 20 dakika ısıtılır. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılır.
4. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler %3 H₂O₂ içeren metanol ile 10 dakika inkübe edilir.
5. Kesitler %5'lik keçi serumu ile inkübe edilerek yanlış pozitifliği önleyecek protein blokajı yapılır.
6. Kesitler MBP, LY6G, CD19, CD3 ve CD68 için uygun primer antikorlarla inkübe edilir.
7. İlgili sekonder antikor (biyotinitle edilmiş veya poliklonal) uygulanır ve oda sıcaklığında bir saat inkübe edilir.
8. Diaminobenzidin (DAB) kullanılarak kesitler 1-10 dk süre ile boyanır.
9. Çekirdekleri belirginleştirmek için kesitler Hematoksilin ile boyanır.
10. Kesitler sui le yıkanır
11. Alkol ile dehidratasyon uygulanır.

MBP boyama ile demiyelinizasyon açısından değerlendirme yapılırken İHK boyama yanında immünofloresan boyama ve görüntüleme işlemlerine de başvurulmuştur. Bu kapsamda çalışmamızda MBP ve DAPI boyamalarına yer verilmiştir. İmmünofloresan boyama protokolü:

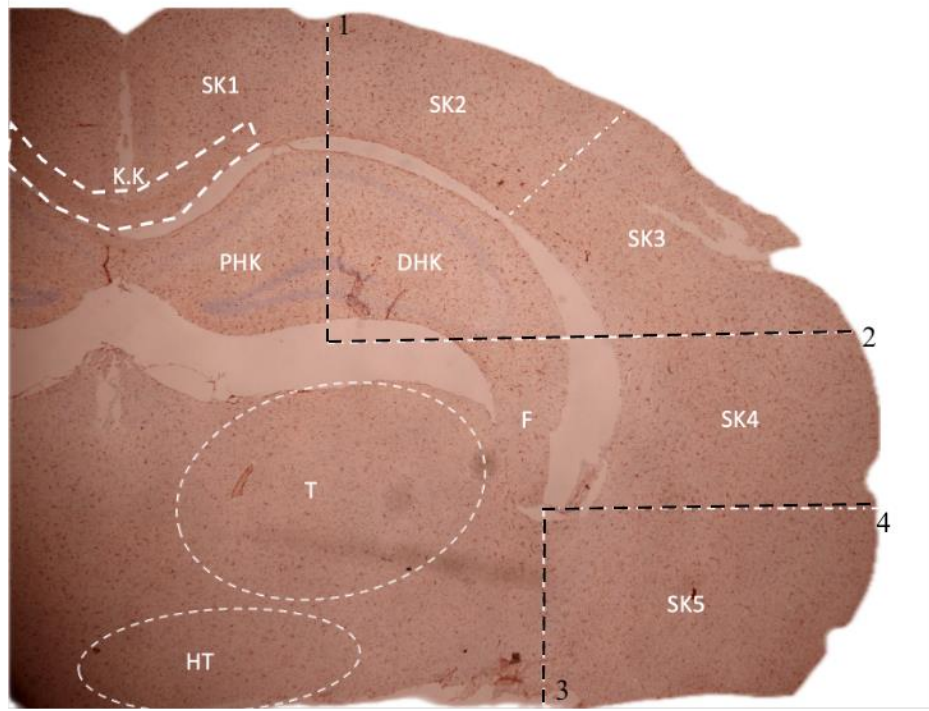
1. Beyin, lenf nodu, dalak ve timustan elde edilen dokular +4 C^o %4'lük paraformaldehidde 72 saat bekletilir.
2. Yetmiş iki saat sonra organlar sonunda %0,02'lik (0,01 M PBS ile hazırlanmış) sodyum azid içinde 2 saat bekletilir.
3. Bütün beyin dokusu, sırayla %10, %20 ve %30'luk PBS ile hazırlanmış sükröz çözeltilerinde 2'şer saat tutulur ve %30'luk sükröz içinde toplamda 48 saat oda sıcaklığında bekletilir.

4. Kırk sekiz saat sonunda doku %4'lük jelatine bulanır.
5. Jelatine gömülmüş materyal, Tissue-Tek optimal kesitleme bileşimine batırılarak -20 C°'de yaklaşık 1 saat bekletilir.
6. Kriyostat ile -20 C°'de 50 µm kalınlıkta kesitler elde edilir.
7. Kesitler %0,3 Triton X-100 içeren PBS çözeltisinde 10-15 dakika inkübe edilerek hücre zarları geçirgen hale getirilir. PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanır.
8. Nonspesifik bağlanmayı engellemek için kesitler %10 normal keçi serumu (NGS) içeren PBS çözeltisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanır.
9. Kesitler anti-MBP birincil antikor içeren PBS çözeltisinde bir gece boyunca 4°C'de inkübe edilir. PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanır.
10. Kesitler, fluoresan konjuge ikincil antikor içeren PBS çözeltisinde 1-2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilir. PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanır.
11. DAPI boyası (0,1-1 µg/mL) içeren PBS çözeltisinde 5-10 dakika inkübe edilir.
12. Kesitler lam üzerine yerleştirilir ve montaj ortamı olarak DPX damlatılarak kurumaya bırakılır.
13. Floresan mikroskopta DAPI mavi, miyelin kırmızı renkte gözlenir.

Preparatlar ışık mikroskobu ile incelenmiş ve MBP, CD11b, CD68 değişiklikleri skorlanmıştır(**Tablo 4-5**). Ayrıca, değerlendirme yapılacak alanların standardize edilmesi amacıyla koronal kesitler **Şekil 4.21**'de gösterildiği gibi bölümlere ayrılmıştır. Bu bölümlerde, 20X büyütmeyle alınan görüntüler üzerinden CD11b+ mikroglialar manuel olarak sayılmış ve ImageJ yazılımı kullanılarak MBP boyanma yoğunluğu % alan olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4-5. Hücre artışı ve demiyelinizasyon için kullanılan skora sistemi

Skor	Açıklama
0	Hiç boyanan hücre/ demiyelinizasyon görülmedi
1	Tek alanda birkaç tane boyanan hücre / demiyelinizasyon görüldü
2	Birden fazla alanda hafif artmış hücre / demiyelinizasyon görüldü
3	Hemen her alanda artmış sayıda hücre / demiyelinizasyon görüldü



Şekil 4-22. İmmünohistokimya ile boyanmış beyin kesitinde incelenen alanlar **KK:** Bilateral hipokampus orta hattı arasında yer alan korpus kallozum, **PHK/DHK:** parasagittal düzlem ile hipokampüsün hayali bir çizgi ile bölünmesi ile ortaya çıkan proksimal hipokampus ve distal hipokampus, **F:** hipokampusun distal komşuluğunda yer alan fimbria. **SK1-5:** Hipokampusu parasagittal düzlemle ikiye bölen siyah çizgi (1), bu çizgiye dik çizilmiş hipokampusun alt kenarından geçen ikinci bir siyah çizgi (2), bu iki çizgiye paralel olarak fimbrianın en distalinden geçen iki siyah çizgi (3,4) kullanılarak subkortikal alan 4 parçaya ayrılmıştır. SK2 ve SK3'ü içeren alan da hipokampusun subkortikal dokuya en yakın geçtiği yerden çizilen 5. siyah çizgi ile ikiye bölünmüştür. **T:** Talamus, **HT:** hipotalamus ventrikülle komşuluk referans alınarak belirlenmiştir. Korpus kallozum dışındaki alanlar bilateral olarak görüntülenmiştir.

Her inceleme bölgesi için, 20X büyütme ile alınan görüntüler, açık erişimli ImageJ yazılımı (<https://imagej.net/ij/>, NIH ImageJ software, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Öncelikle, ImageJ'de görüntü açıldıktan sonra 'Image → Color → Color Deconvolution' seçeneği ile görüntü H&DAB renk kanallarına ayrılır. MBP ile boyanmış kanal seçilir. Görüntü ayarlarından, MBP boyanmış alanların doğru bir şekilde tanımlanabilmesi için eşik değeri ayarlanır. Eşik değeri, MBP ile boyanmış

orijinal görüntü ile karşılaştırılarak, alanların kırmızıya dönene kadar ayarlanır. Eşik değeri ayarlandıktan sonra 'Apply' butonuna basılarak siyah ve beyaz görüntü elde edilir. Eğer ilgi alanı resmin tamamını kaplamıyorsa, bu alan öncelikle manuel olarak işaretlenir. Daha sonra 'Analyze → Set Measurements' seçeneği ile ölçüm yapılacak parametreler belirlenir ve 'Measure' seçeneği ile ölçüm gerçekleştirilir (Şekil 4-22).

4.11. İstatistiksel yöntem:

Proje kapsamında planlanan tüm deneyler en az 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veri analizi sürecinde GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, ABD) ve SPSS Statistics 25 (IBM, New York, ABD) yazılımları kullanılmıştır. Veriler, ortalama \pm standart hata (Standart Error of the Mean, SEM) şeklinde ifade edilmiş ve anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Deney gruplarının analiz öncesinde normallik dağılımı “Shapiro-Wilk testi” ve “Kolmogorov-Smirnov testi” kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplardan en az birinin normal dağılım göstermediği durumlarda non-parametrik testler, tüm grupların normal dağıldığı durumlarda ise parametrik testler tercih edilmiştir. İki grubun sayısal ölçümlerinin karşılaştırılmasında “Bağımsız Örneklem t Testi” veya “Mann-Whitney U Testi” kullanılmıştır. İki'den fazla grubun sayısal ölçümlerinin karşılaştırılmasında ise “Tek Yönlü ANOVA (Varyans Analizi) Testi” veya “Kruskal-Wallis Testi” uygulanmıştır. Tek Yönlü ANOVA testi sonrasında çoklu karşılaştırmalar için “Tukey Testi”, Kruskal-Wallis testi sonrasında ise “Dunn Testi” post hoc test olarak kullanılmıştır. İki'den fazla grubun en az iki değişkenli karşılaştırılmasında “İki Yönlü ANOVA Testi” uygulanmış ve bu testlerin ardından çoklu karşılaştırmalar için “Tukey Testi”, “Dunnett Testi” veya “Bonferroni Testi” post hoc test olarak seçilmiştir.

İki sayısal ölçüm arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla parametrik test olarak “Pearson Korelasyon Testi”, non-parametrik test olarak ise “Spearman Korelasyon Testi” kullanılmıştır. Bu testlerin sonuçlarına göre elde edilen korelasyon katsayısı (r) değerleri; 0,2-0,4 aralığında düşük, 0,4-0,6 aralığında orta, 0,6-0,8 aralığında yüksek ve 0,8-1 aralığında ise çok yüksek düzeyde ilişki olarak yorumlanmıştır.

5. BULGULAR:

5.1. Kuprizonlu Diyetin Genel Klinik ve Histopatolojik Etkileri

5.1.1. Vücut Ağırlığı ve Sistemik Etkilenme:

Kuprizonun klinik ve histopatolojik etkilerinin araştırıldığı ilk deney grubunda, farelerin $4,5\pm 0,3$ gr/gün yem tükettiği görülmüştür. Hayvanların ağırlıklarındaki değişimleri değerlendirmek amacıyla fareler 4 günde bir tartılmıştır. Kuprizon diyeti uygulanan farelerin ilk ölçümdeki kütlesi $17,5\pm 1,45$ gram (ortalama \pm standart sapma, SD) olarak, kontrol grubunun kütlesi ise $17,74\pm 1,09$ gram olarak ölçülmüştür. Bağımsız örneklem t-testi ile yapılan karşılaştırmada iki grubun kütleleri ilk ölçümde benzer bulunmuştur ($t:0,29$ $p=0,76$). Kuprizonla beslenen farelerin ve kontrol grubunun 14. ölçümde kütle ortalamaları sırasıyla $22,27\pm 0,48$ gr ve $24,14\pm 1,68$ gr'dır. Son ölçümde bağımsız örneklem t-testi ile yapılan karşılaştırma kuprizonlu diyetle beslenen farelerin daha düşük kütleyle sahip olduğunu göstermiştir ($t:2,38$ $p=0,044$).

Fare ağırlıklarındaki değişime zaman ve kuprizonlu diyet faktörlerinin etkisini belirlemek amacıyla genel doğrusal model (Generalize Lineer Models, GLM) kullanılmıştır. Sonuçlar **Tablo-5.1**'de ve **Şekil-5.1**'de gösterilmiştir. Bu analizde, zaman ve kuprizon faktörleri bağımsız değişkenler olarak, farelerin ağırlıkları ise bağımlı değişken olarak belirlenmiştir. Kuprizon faktörü, kontrol grubu ($n=5$) ve kuprizon ile beslenen ($n=5$) fareler arasındaki farkları temsil etmektedir. Omnibus testi bu modeldeki bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenleri önemli derecede açıkladığını saptamıştır (Olabilirlik Oranı Ki-Kare = 177,926; serbestlik derecesi (sd) = 29, $p < 0,001$).

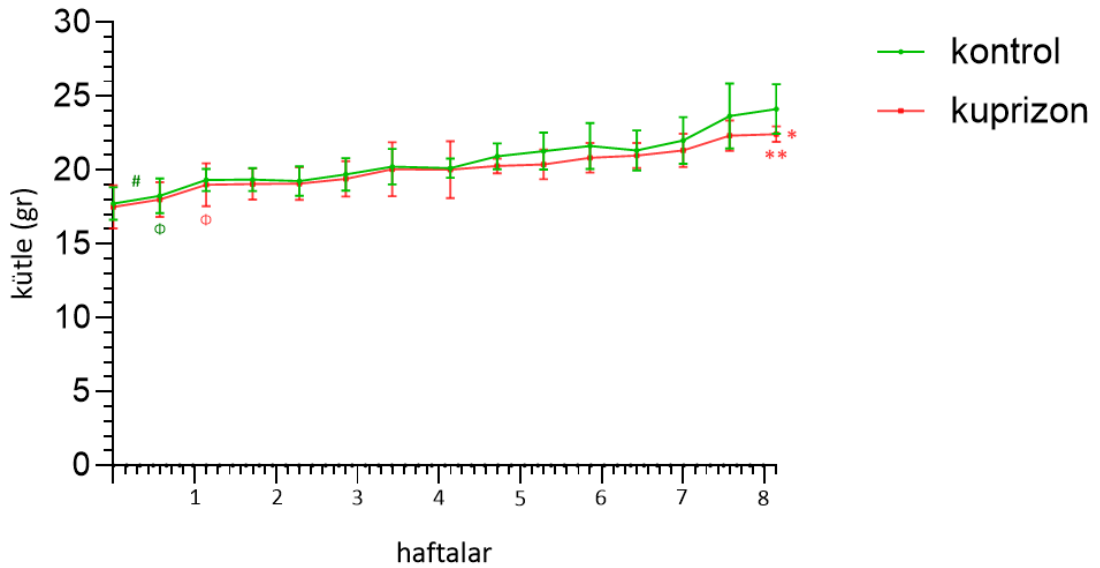
Analiz sonuçları, zaman faktörünün fare ağırlıkları üzerinde anlamlı bir etkisi olduğunu göstermiştir (Wald $\chi^2:321,393$; df:14, $p < 0,001$). Bu, zamanla farelerin ağırlıklarının önemli ölçüde değiştiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, kuprizon faktörünün de fare ağırlıkları üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu bulunmuştur (Wald $\chi^2: 10,053$; df:1, $p = 0,002$). Bu sonuç, kuprizonlu diyetle beslenen fareler ile kontrol grubu fareler arasında anlamlı bir fark olduğunu doğrulamaktadır. Ancak, zaman ve kuprizon faktörlerinin etkileşimi anlamlı bulunmamıştır (Wald $\chi^2: 9,734$; df:14, $p = 0,781$). Bu, kuprizon maruziyetinin zamanla değişmediğini, her ölçüm zamanında benzer etki gösterdiğini ifade etmektedir.

Gruplar arasındaki farkları daha detaylı incelemek için post-hoc analizlerde Tukey testi kullanılmıştır. Kuprizonlu diyet altındaki grubun en belirgin kilo değişimleri 1-2. ölçümler ile 5-6. Ölçümler arasında saptanmıştır (sırasıyla $p=0,065$, $p=0,055$).

Tablo 5-1. Kuprizonla beslenme ve zaman faktörlerinin kütle üzerine etkisi

Faktör	Wald Ki-Kare	Serbestlik Derecesi (df)	p*
Zaman	321,393	14	< 0,001
Kuprizon	10,053	1	0,002
Zaman-Kuprizon	9,734	14	0,781

*: Genel Lineer Model analizi ile elde edilmiştir.



Şekil 5-1. Fare kütlelerinin zamana göre değişimleri Grafikte, kuprizon diyeti uygulanan fareler (kırmızı çizgi) ile kontrol grubundaki farelerin (yeşil çizgi) ortalama kütle değişimleri gösterilmektedir. Ölçümler, 8 haftalık bir periyot boyunca dört günde bir yapılmıştır. Her veri noktasındaki hata çubukları, standart sapma değerlerini temsil etmektedir. (*) Kuprizon ile beslenen farelerin kütlelerinin kontrol grubuna göre ortalama olarak 0,568 gr daha düşük olduğu bulunmuştur (gruplar arası fark için 95% CI: 0,22 – 0,92 g ; Std. hata = 0,179; $p=0,002$). Analiz sonuçları, kuprizon diyeti uygulanan farelerin kütle artışının kontrol grubundaki farelere kıyasla daha az

olduğunu göstermektedir. Kuprizonlu diyetle beslenenler ve kontrol grup arasında kütle farkı olan ölçüm günü/günleri ‘***’ ile belirtilmiştir. Belirgin kütle değişimi görülen intervaller ‘#’ ve bazal ağırlığa göre belirgin farkın görüldüğü ilk ölçüm ‘Φ’ simgesi ile işaretlenmiştir. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın *p* değeri derecesine göre yerleştirilmiştir.

Kuprizonun sistemik toksik etkileri 4. haftadan itibaren gözlemlenmiştir. Beş farenin 3'ünde, progresif olarak artan yamalı tarzda düzensiz tüy dökülmesi görülmüştür (Şekil 5-2.A,B) . Bu tüy dökülmesinin baş ve boyun bölgesinde başladığı, sırta yayılarak sınırlandığı tespit edilmiştir. DOE skoru açısından yapılan muayenelerde, skor 0 olsa bile 6. haftadan itibaren hörgüç şeklinde bir omurga eğriliği fark edilmiştir (Şekil 5-2.C). Ayrıca, son deney basamağında kuprizonlu diyet alan grupta 12. haftadan sonra rektal prolapsus ortaya çıkmıştır.

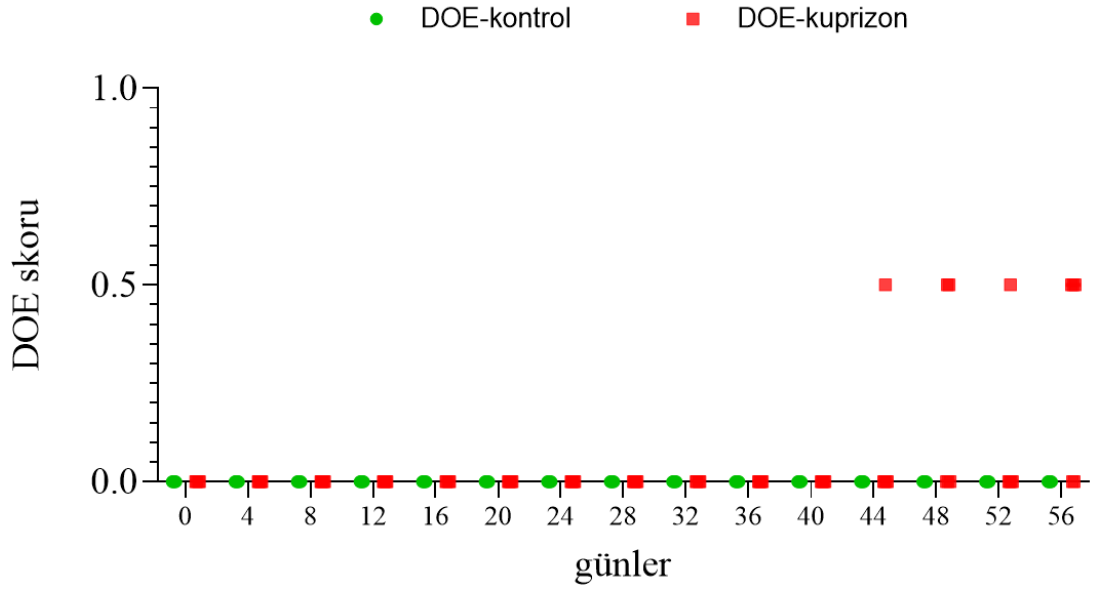


Şekil 5-2. Kuprizonun sistemik yan etkileri-inpeksiyon bulguları A. İki kulak arasından başlayan **B.** Sırta yayılan yamasal desende tüy dökülmesi **C.** Kuyruk ve arka patilerinde motor kuvvet defisiti olmayan farelerde zamanla ortaya çıkan hörgüç görüntüsü

5.1.2. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit Skoru:

Kuprizonla beslenme ve zaman faktörlerinin farelerin DOE skorlarına etkisini değerlendirmek amacıyla Genel Lineer Model (GLM) analizi kullanılmıştır. Modelin uyumluluğu testine göre, modelin bilgi kaybının minimal olduğu ve küçük örneklem boyutlarına uyum sağladığı saptanmıştır (sapma:1200, Pearson Ki-Kare:1200, df:120, AIC:-236,566 ; AICC:-219,752; BIC:-143,236). Model etkileri için yapılan Tip III

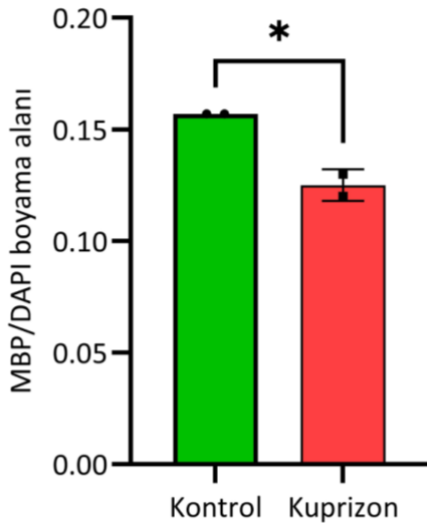
Wald Ki-Kare testlerine göre, hem kuprizonla beslenme ($\chi^2 = 7,500$; $p = 0,006$) hem de zaman ($\chi^2 = 36,667$, $p = 0,001$) faktörlerinin DOE skorlarını anlamlı şekilde etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, kuprizonla beslenme ve zaman etkileşimi de önemli bulunmuştur ($\chi^2 = 42,500$, $p < 0,001$). Parametre tahminlerine (parameter estimates testleri) göre, kuprizonla beslenen farelerin DOE skoru kontrol grubundaki farelere kıyasla yüksektir ($B = 0,300$; $p < 0,001$). Ancak, kuprizonla beslenmenin zaman faktörüyle ilişkisi 11. ve 12. ölçümler gibi geç dönemlerde önemli bulunmuştur (sırasıyla $p < 0,001$; $p = 0,012$). Son ölçümde kuprizonlu diyet altındaki farelerin DOE skor ortalamasının kontrol grubuna göre daha yüksek olma eğilimi gösterdiği görülmüştür (bağımsız örneklem t testi; $t: 2,41$; $p = 0,07$) (**Şekil 5-3**).



Şekil 5-3. Grupların DOE skorunun zamansal değişimi. DOE skoru kontrol grubu (yeşil çizgi) ve kuprizonlu diyet altındaki (kırmızı çizgi) farelerde ilk 6 hafta boyunca 0 olarak kaydedilmiştir. 11. Ölçümden itibaren kuprizonla beslenen farelerde en yüksek 0,5 olacak şekilde DOE skorunda artış saptanmıştır. Her ölçümde her gruptan $n=5$ fare değerlendirilmiş olup kuprizonlu diyet ve zamansal değişimin etkileri GLM ile analiz edilmiştir. İki grup arasında $p < 0,05$ olacak şekilde fark saptanan ölçümler ‘*’ simgesi ile belirtilmiştir.

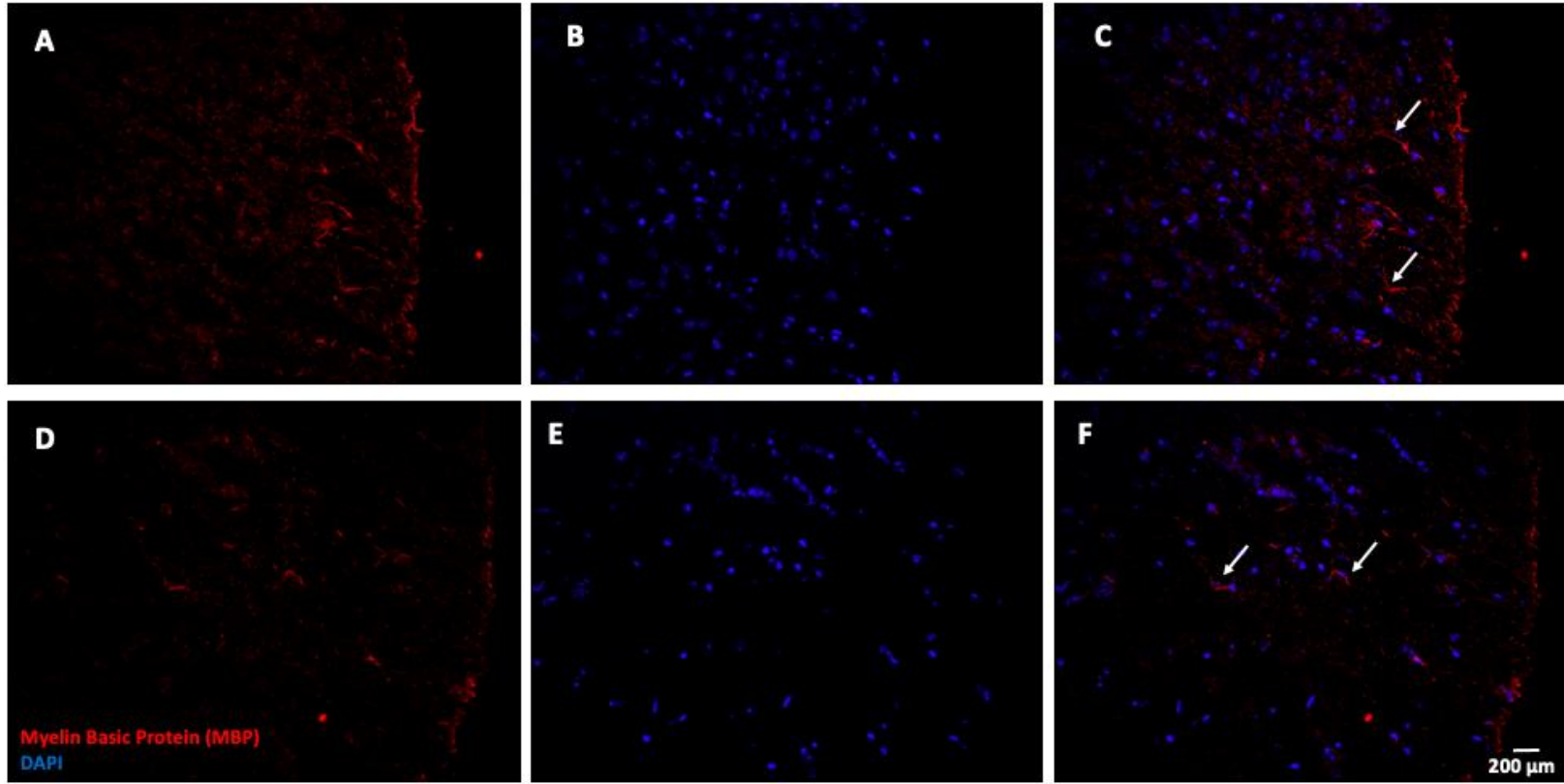
5.1.3. Histopatolojik Düzeyde Toksik Demiyelinizasyon

Demiyelinizasyonun etkilerini değerlendirmek amacıyla, sol hemisferin subkortikal beyaz cevherinden alınan 200 µm kalınlığındaki kesitlerde immüno Floresan boyama yapılmıştır. Bu kesitler, miyelini ve çekirdekleri görselleştirmek için sırasıyla kırmızı renkte MBP ve mavi renkte DAPI ile boyanmıştır. Mikroskop altında bu kesitlerin fotoğrafları çekilmiştir. ImageJ yazılımı kullanılarak DAPI ve MBP boyanan alanların toplam alana oranları hesaplanmıştır. Bağımsız örneklem T testi ile karşılaştırıldığında kuprizonlu fare grubunda MBP/DAPI oranı daha düşük bulunmuştur ($t=6.4$; $df=2$; $p=0.023$). **Şekil 5-5'te** boyamaların mikroskop görüntüleri ayrı ayrı ve birleştirilmiş şekilde yer almaktadır. Kontrol grup (A) ve kuprizonla beslenen fare grubu (D) karşılaştırıldığında, MBP sinyalinin kuprizonlu diyet alan fare beyinlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma seyrinde olduğu görülmüştür. Kuprizonla beslenen farelerin (E) DAPI ile boyanan çekirdek miktarı, kontrol grubuna (B) göre minimal olarak daha düşük saptanmıştır ($p>0.05$). Kontrol grubunda (C) ve kuprizonla beslenen farelerde (F) MBP ve DAPI boyamasının birleştirilmiş görüntülerinde, oklarla miyelın işaretlenmiştir. Kontrol grubunda (C) miyelın sağlam iken, kuprizonla beslenen grupta (F) miyelın kaybı gözlenmektedir.



Şekil 5-4. IF görüntülemesinde DAPI ve MBP boyanma yüzdeleri. A. Kontrol (n=2) ve kuprizon diyeti uygulanan farelerin (n=2) subkortikal korteks kesitlerinde DAPI ve

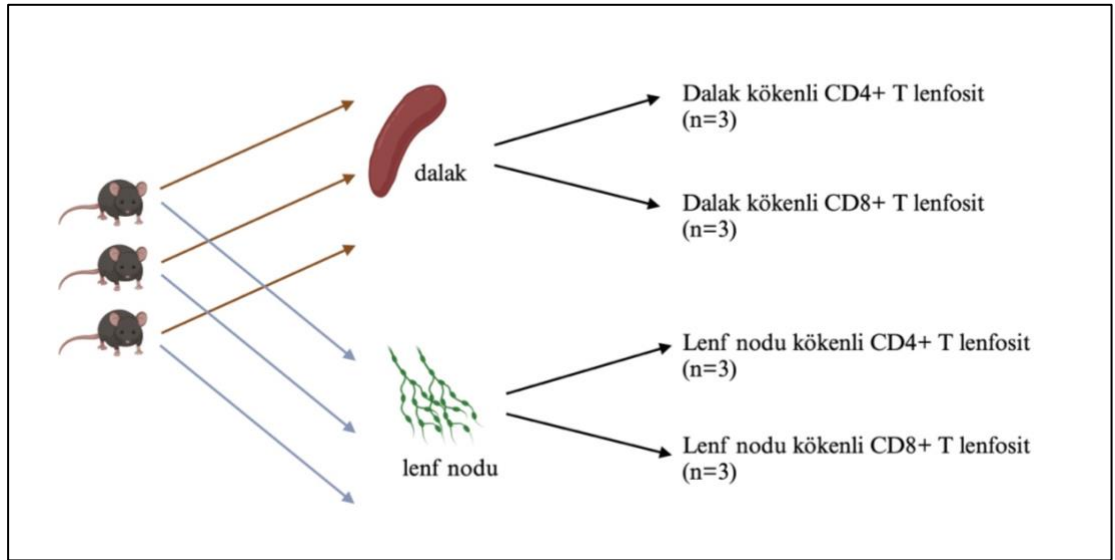
MBP boyama yüzdeleri karşılaştırılmıştır. Arka plan hücre yoğunluğundan bağımsız bir demiyelinizasyon değerlendirmesi için her örnekte MBP/DAPI oranı hesaplanmıştır. Kuprizonlu yem verilen grupta (kırmızı) kontrol gruba (yeşil) göre miyelin miktarının azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 5-5. Kuprizon ile indüklenen demiyelinizasyonun immünfloresan görüntüleme bulguları. A, B, ve C panelleri kontrol grubunu;D,E ve F panelleri kuprizonlu diyet grubunu göstermektedir. A ve D panelleri Myelin Basic Protein (MBP) boyaması ile, B ve E panelleri DAPI boyaması ile işaretlenmiştir. C ve F panelleri ise MBP (kırmızı) ve DAPI (mavi) boyamalarıyla birlikte gösterilmiştir. Oklarla işaretlenen bölgeler, kuprizon ile beslenen farelerde demiyelinizasyonun (F paneli) kontrol grubuna (C paneli) göre belirgin olduğunu vurgulamaktadır.

5.2. T lenfosit Aktivasyon ve Proliferasyonunun İndüksiyonu:

Aktif T lenfosit elde etmek için öncelikle optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerin amacı, ilerleyen aşamalarda kullanılacak T lenfositlerin hangi organdan izole edileceğini ve toplanan hücrelerin hangi koşullarda ne kadar süreyle uyarılacağını belirlemektir. Bu amaçla n=3 sağlıklı fareden dalaklar ve tüm yüzeysel lenf nodları diseksi edilmiştir (Şekil 5-6). Organlardan elde edilen hücre süspansiyonu IL-2 ve anti-CD3 antikoru ile kültüre alınmıştır. Kültürün 0., 24. ve 96. Saatlerinde aktivasyon seviyesinin belirlenmesi amacıyla akım sitometri analizi yapılmıştır. Bu analizlerde T hücrelerinin CD25, CD69 ve CD44 ifadeleri ölçülmüştür. Farklı zamanlarda ölçülen aktivasyon belirteç yoğunlukları tek yönlü tekrarlayan ANOVA analizi ile karşılaştırılmıştır.



Dalaktan toplanan CD4+ T lenfositlerin aktivite göstergeleri:

CD25 ifadesi 24. Saatte bazal değere göre yükselmiştir. Ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 96. Saatte ölçülen CD25 ifadesi bazale göre yüksek saptanmıştır ($p=0,04$) (**Şekil 5-7A**).

CD69 ifadesi de benzer şekilde 96. Saatte bazale göre yüksektir ($p=0,03$) (**Grafik 5-7B**).

CD44 ifadesinin tekrarlı ölçümleri karşılaştırıldığında, 24. Saatte yükseldiği ($p=0,03$) ve 96. Saatte bu seviyeyi koruduğu görülmüştür ($p=0,03$) (**Şekil 5-7C**).

Dalaktan toplanan CD8+ T lenfositlerin aktivite göstergeleri:

CD25 ifadesinin 24. Saatte bazale göre yükselmiş olsa da bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamıştır ($p=0,14$) (**Şekil 5-7D**).

CD69 ifadesinin 24. Saatte belirgin olarak yükseldiği ($p=0,015$) ve 96. Saate kadar bazal değere yakın bir seviyeye gerilediği ($p=0,016$) görülmüştür (**Şekil 5-7E**).

CD44 ifadesi 24. Saatte ve 96 saatte bazale göre belirgin olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p=0,018$ ve $p=0,026$) (**Şekil 5-7F**).

Lenf nodundan toplanan CD4+ T lenfositlerin aktivite göstergeleri:

CD25 ifadesinin 24. Saat ve 96. Saat ölçümlerinde bazale göre yüksek değerler tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0,015$ ve $p=0,041$) (**Şekil 5-7G**).

CD69 ifadesinin 24. Saatte belirgin olarak yükseldiği ($p<0,001$) ve 96. Saatte bazale yakın değerlere gerilediği görülmüştür ($p<0,001$) (**Şekil 5-7H**).

CD44 ifadesi her iki ölçümde de bazale göre yüksek bulunmuştur (24. Saat için $p<0,001$ ve 96. Saat için $p<0,01$). Ayrıca CD 44 seviyelerinin 24. Saatten 96. Saate kadar yükselmeye devam ettiği ($p<0,001$) göze çarpmıştır (**Şekil 5-7I**).

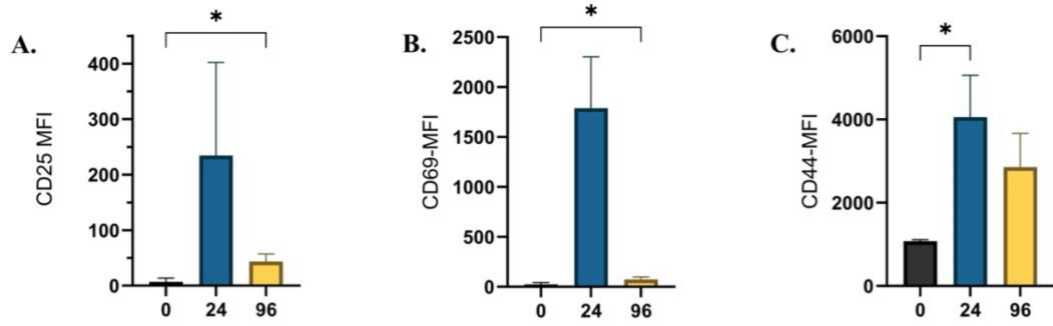
Lenf nodundan toplanan CD8+ T lenfositlerin aktivite göstergeleri:

CD25 ve CD69 seviyeleri erken dönemde (24. saat) yükselmiş ve geç dönemde (96. saat) bazal değerlere yakın seviyelere gerilemiştir (CD 25 için $p<0,01$ ve CD69 için $p<0,001$) (**Şekil5-7 J,K**).

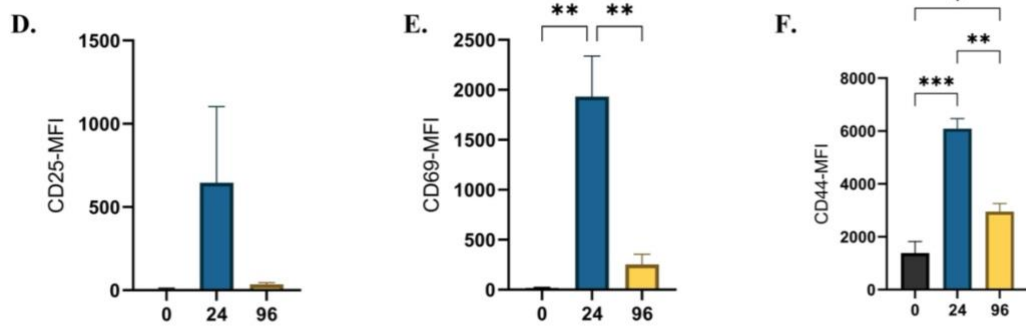
CD44 seviyesi ise erken dönemde ve geç dönemde devamlı olarak artmıştır ($p<0,001$) (**Şekil 5-7L**).

Aktivasyon belirteçlerinin ortalama yoğunluğuna ilişkin sonuçların teyidi için akım sitometride ölçülen belirtecin yüzde kaç ifade edildiği de belirlenmiştir (**Şekil 5-8**).

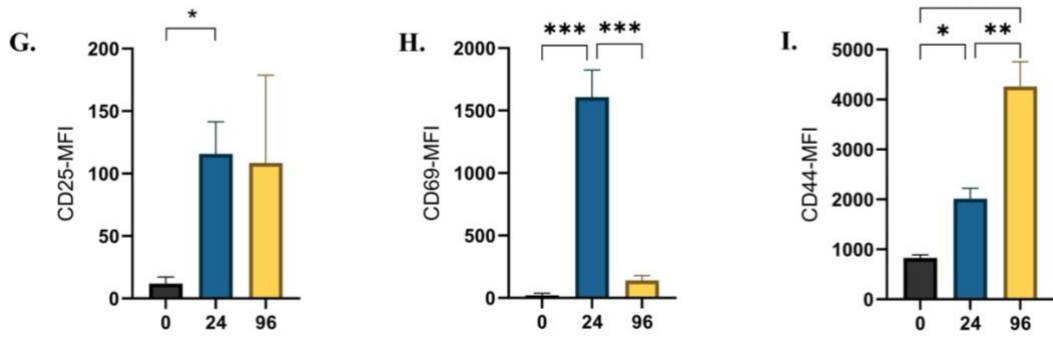
Dalak CD4⁺ T lenfosit



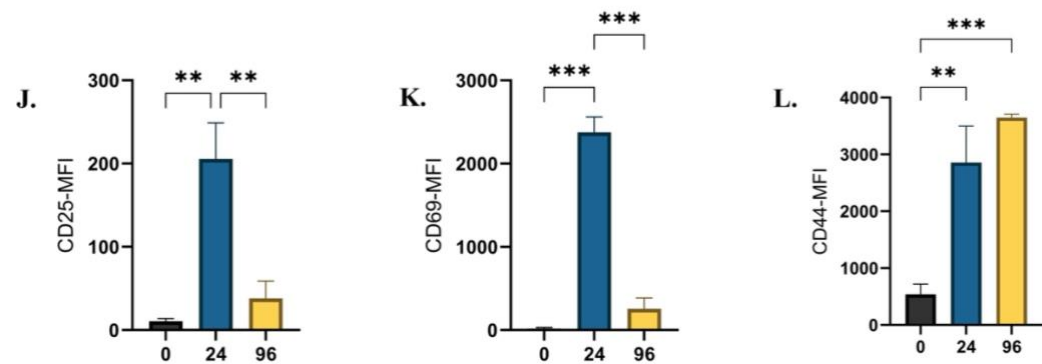
Dalak CD8⁺ T lenfosit



Lenf nodu CD4⁺ T lenfosit

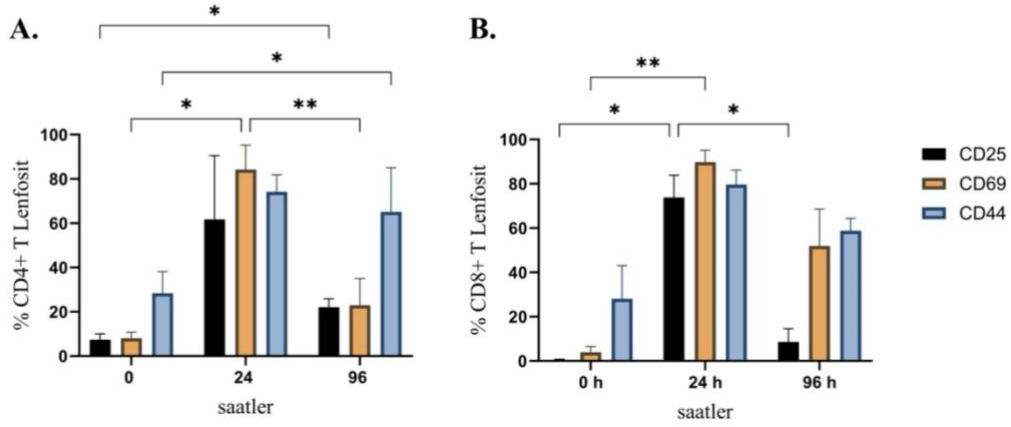


Lenf nodu CD8⁺ T lenfosit

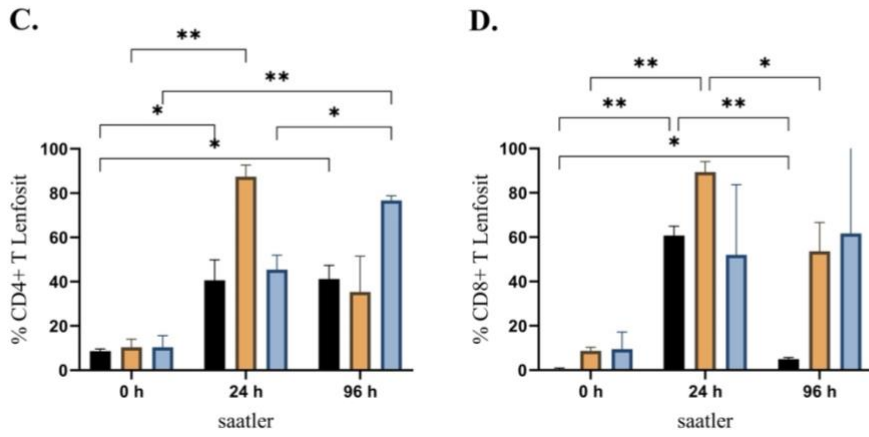


Şekil 5-7. Dalak ve lenf nodundan toplanan T lenfositlerde CD25, CD69 ve CD44 ifadelerinin ortalama floresan yoğunluk (OFY) cinsinden zamanla değişimi A-C. Dalaktan izole edilen CD4+ T lenfositlerin CD25 ve CD69 ifadeleri 96. saatte bazale göre yüksektir. CD44 ifadesi 24. Saatte belirgin artmış ve 96. saatte benzer seviyede kalmıştır. **D-F.** Dalaktan izole edilen CD8+ T lenfositlerin CD25, CD44 ve CD69 seviyeleri 24. saatte en yüksek seviyeye ulaşmış ve 96. saatte azalmıştır. CD44 ifadesi 96. Saatte bazale göre hala yüksektir. **G-I.** Lenf nodundan izole edilen CD4+ T lenfositlerin CD25 ve CD44 seviyeleri zamanla bazale göre artış göstermiştir. CD69 ifadesi erken dönemde (24. Saat) en yüksek seviyeye ulaşarak geç dönemde azalmıştır. **J-L.** Lenf nodundan izole edilen CD8+ T lenfositlerin CD25 ve CD69 ifadeleri erken dönemde (24. Saat) ve CD44 ifadesi geç dönemde (96. Saat) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. (Grafiklerde farklı zaman noktaları arasındaki farka işaret eden p değerleri ***<0,001; **<0,01; *<0,05 şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında “iki yönlü tekrarlayan ANOVA” yapıldıktan sonra çoklu karşılaştırmalar için posthoc “Tukey testi” kullanılmıştır. Bar grafikler ortalama±standart hata göstermektedir. Her grupta n=3’tür.

Dalak kökenli T lenfosit



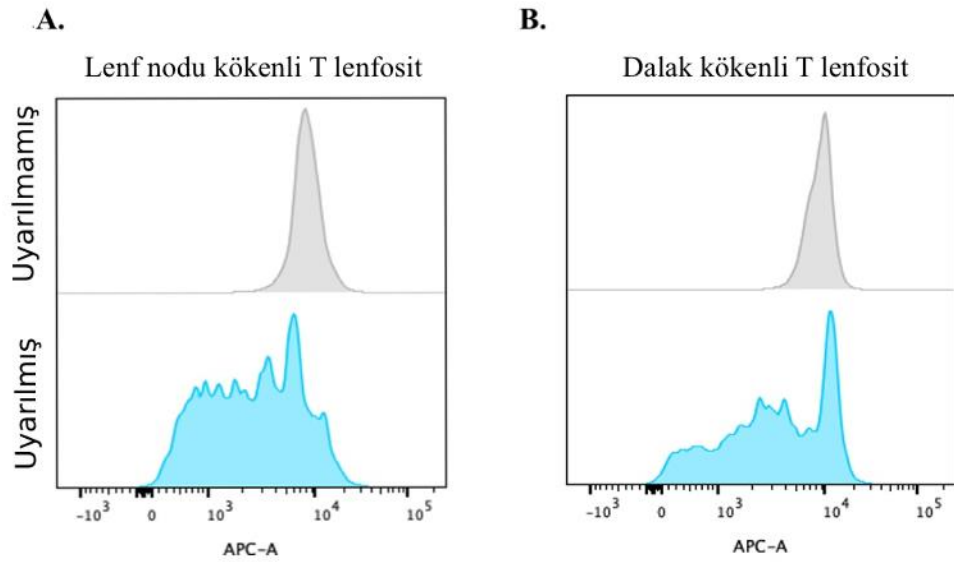
Lenf nodu kökenli T lenfosit



Şekil 5-8. Dalak ve lenf nodundan toplanan T lenfositlerde CD25, CD69 ve CD44 ifadelerinin yüzde (%) cinsinden zamanla değişimi A-B. Dalaktan elde edilen T lenfositlerin CD25, CD69 ve CD44 ifadeleri erken dönemde en yüksek değerinde ulaşmış ve 96. saatte azalmıştır. CD25 ve CD44 seviyeleri 96. Saatte hala bazale göre yüksektir. C. Lenf nodundan izole edilen CD4+ T lenfositlerin aktivasyon belirteçleri 24. Saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır ancak 96. saatte azalmalarına rağmen bazale göre yüksektir. D. Lenf nodundan elde edilen CD8+ T lenfositlerin CD25 ile CD69 ifadesi erken dönemde artmış ve 96. saatte azalmıştır. Ancak CD44 ifadesi zamanla artış göstermiştir. (Grafiklerde farklı zaman noktaları arasındaki farka işaret eden p değerleri **<0,01; *<0,05 şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında “iki yönlü tekrarlayan ANOVA yapıldıktan sonra çoklu karşılaştırmalar için posthoc “Tukey testi” kullanılmıştır. Bar grafikler ortalama±standart hata göstermektedir. Her grupta n=3’tür.

T lenfositlerin çoğalma durumu, akım sitometride CFSE (karboflorescein diasetat, süksinimidil ester) etiketlemesi kullanılarak ortalama floresan yoğunluğu üzerinden değerlendirilmiştir. Uyarılmamış T lenfositlerin benzer boyutlarda olması nedeniyle, CFSE etiketleme boyası hücrelerin yüzeyinde eşit şekilde dağılarak tek bir yoğunluk piki oluşturmuştur. İndüksiyon sonrasında ise, yeni oluşan hücreler ile olgun T lenfositler arasındaki boyut farkı nedeniyle CFSE, hücreler arasında eşit olmayan miktarlarda paylaşılmıştır. Bu durum, farklı CFSE yoğunluklarına sahip hücrelerin oluşmasına ve yoğunluk pikinin sola kaymasına yol açmıştır (**Şekil 5-9**).

Sağlıklı farelerden (n=3) elde edilen dalak ve lenf nodları tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş ve uyarılmak üzere kültüre alınmıştır. Hem kültüre alınmadan önce hem de 24. Ve 96. saatlerde proliferasyon değerlendirmesi yapılmıştır. Son ölçümde dalaktan elde edilen T lenfositlerin proliferasyonu ortalama $70 \pm 11,61$ ve lenf nodundan elde edilen T lenfositlerin proliferasyonu ortalama $76,6 \pm 4,2$ 'dir. Eşit varyans varsayımı altında yapılan bağımsız örneklem t-testi sonuçları, $t(6) = -1,067$ ve $p = 0,327$ olup gruplar arasında fark saptanmamıştır.



Şekil 5-9. Dalak ve Lenf Nodu Kökenli T Hücrelerinde Uyarılma Durumunun Akım Sitometresi Kullanılarak Değerlendirilmesi. A. Uyarılmamış lenfositler benzer boyutta olup tek pik oluşturur. **B.** Uyarılmış ve çoğalmakta olan lenfositler çeşitli boyutlarda hücrelere sahiptir. Bu durum grafiği sola kaydırır

5.3. Sağlıklı Farelerde T Lenfosit Biyodağılımı:

5.3.1. Ex-vivo Görüntüleme Bulguları

N=2 sağlıklı fareye naif T lenfosit, N=4 fareye nonspesifik yolla uyarılmış T lenfosit enjeksiyonu yapılmıştır. Bir fareye ise kontrol amaçlı kullanılmak üzere PBS uygulanmıştır. Enjeksiyonunun 16. saatinde fareler sakrifiye edilmiştir. Bu işlemde perfüzyon (PBS ve izotonik %0,9'luk NaCl solüsyonu ile kanın uzaklaştırılması) uygulanmamıştır. Beyin, omurilik, karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, dalak ve lenf nodu diseke edildikten sonra organlar tümüyle ex-vivo görüntüleme cihazına yerleştirilmiştir. Florokrom boyanın (Allophycocyanin-APC) uyarılması için 577 nm, emisyonu için 602 nm dalga boyları ile 1 s boyunca görüntü alınmıştır (**Şekil 5-10**). OFY, total floresan (TF) ve ağırlığa göre normalize edilen TF değerleri **Tablo 5.2**'de listelenmiştir.

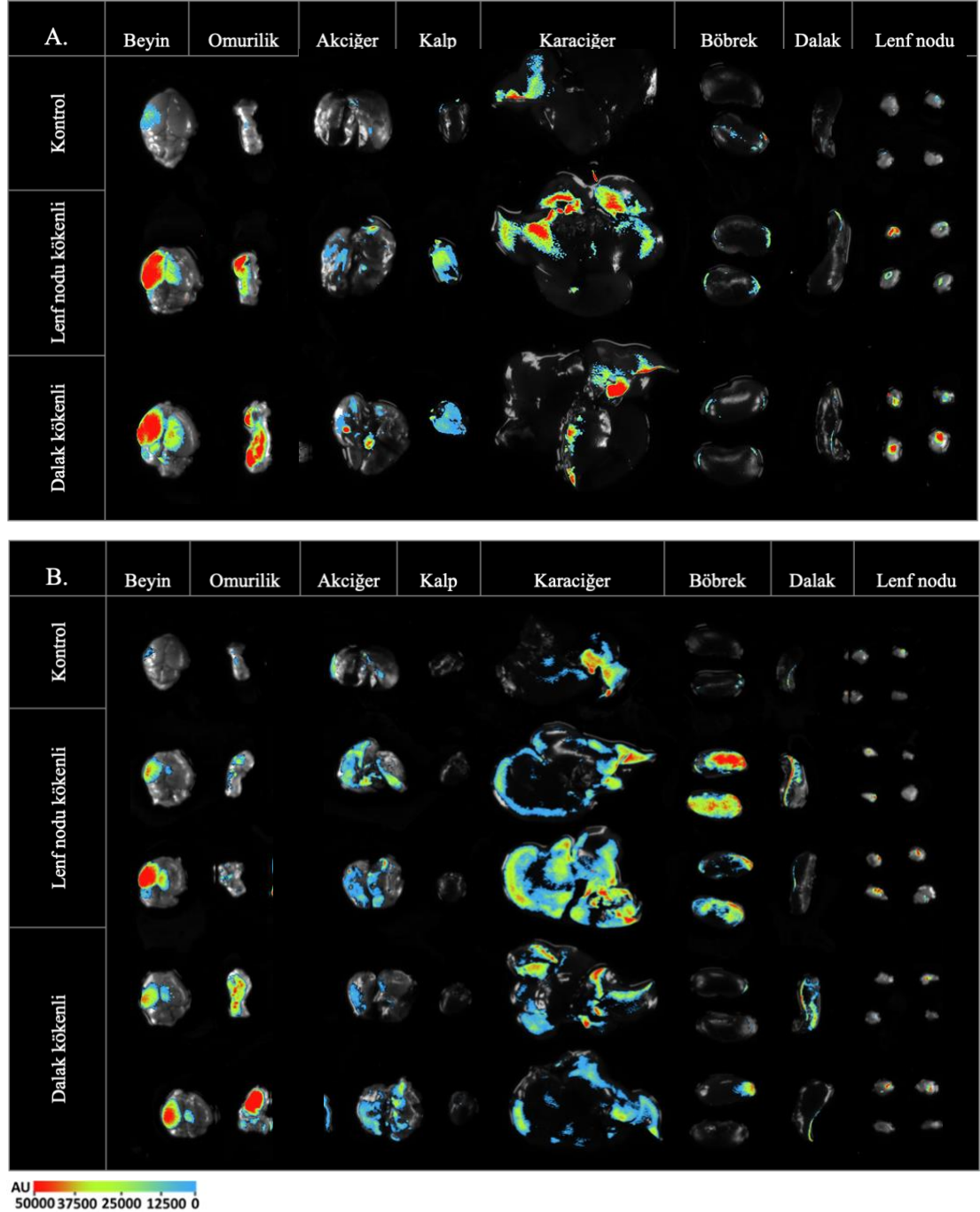
Enjekte edilen lenfositler 4 grupta ele alınmıştır:

1. Lenf nodundan alınmış naif lenfositler
2. Dalaktan alınmış naif lenfositler
3. Lenf nodundan alınmış aktif lenfositler
4. Dalaktan alınmış aktif lenfositler

Öncelikle her grup kendi içinde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerde organlar arasındaki tutulum birbiriyle karşılaştırılmıştır. OFY ve TF parametreleri organlara yerleşmiş T lenfosit miktarlarını temsil etmektedir. TF/g parametresi ise, lenfositlerin farklı anatomik lokasyonlara afinitesini değerlendirmek için kullanılmıştır.

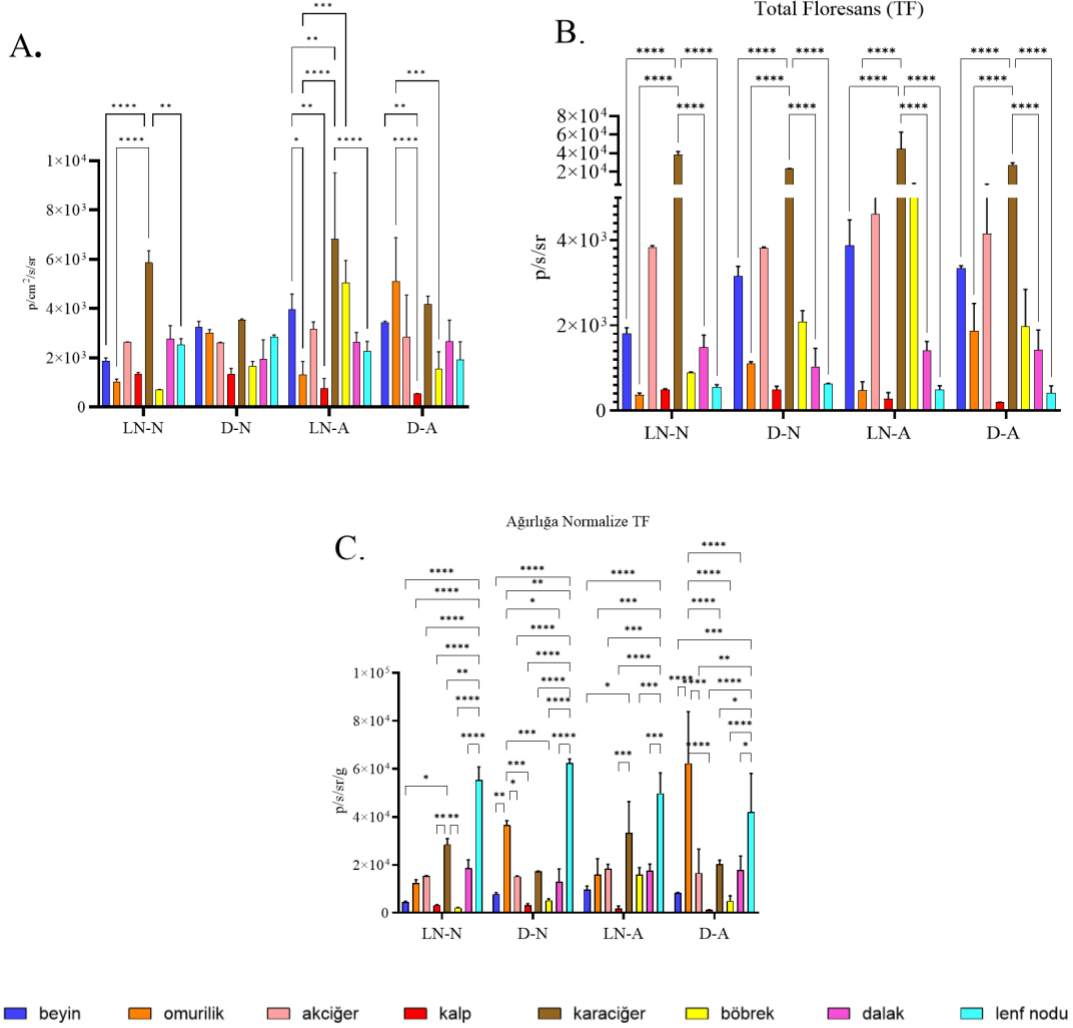
Karaciğerdeki toplam T lenfosit miktarı, tüm lenfosit gruplarında diğer organlara göre yüksek saptanmıştır. Dalaktan alınan naif T lenfosit grubu dışındakilerde bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). Ağırlığa göre normalizasyon yapıldığında ise, lenfositlerin biyodağılımında en çok lenf nodlarına yerleşmeye meyilli oldukları görülmüştür ($p < 0,001$) (**Şekil 5-11**) ve (**Şekil 5-12**).

İkinci olarak her organ için bu dört grup birbiriyle karşılaştırılmıştır. Beyinde toplanmış T lenfosit miktarının veya lenfositlerin beyne afinitesinin gruplar arasında belirgin fark göstermediği görülmüştür. Ancak omuriliğe yönelim lenf nodundan ve dalaktan elde edilmiş aktif lenfosit gruplarında naif gruplara göre artış göstermiştir ($p<0,05$) (Şekil 5-13).



Şekil 5-10. Sağlıklı kontrol grubunda T lenfosit biyodağılımı A. Naif B. Aktif T lenfositlerin beyin, omurilik, akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, dalak ve lenf nodunda birikimlerinin değerlendirilmesi amacıyla ex-vivo görüntüleme cihazında alınan görüntüleri

Ortalama Floresan Yoğunluğu (OFY)

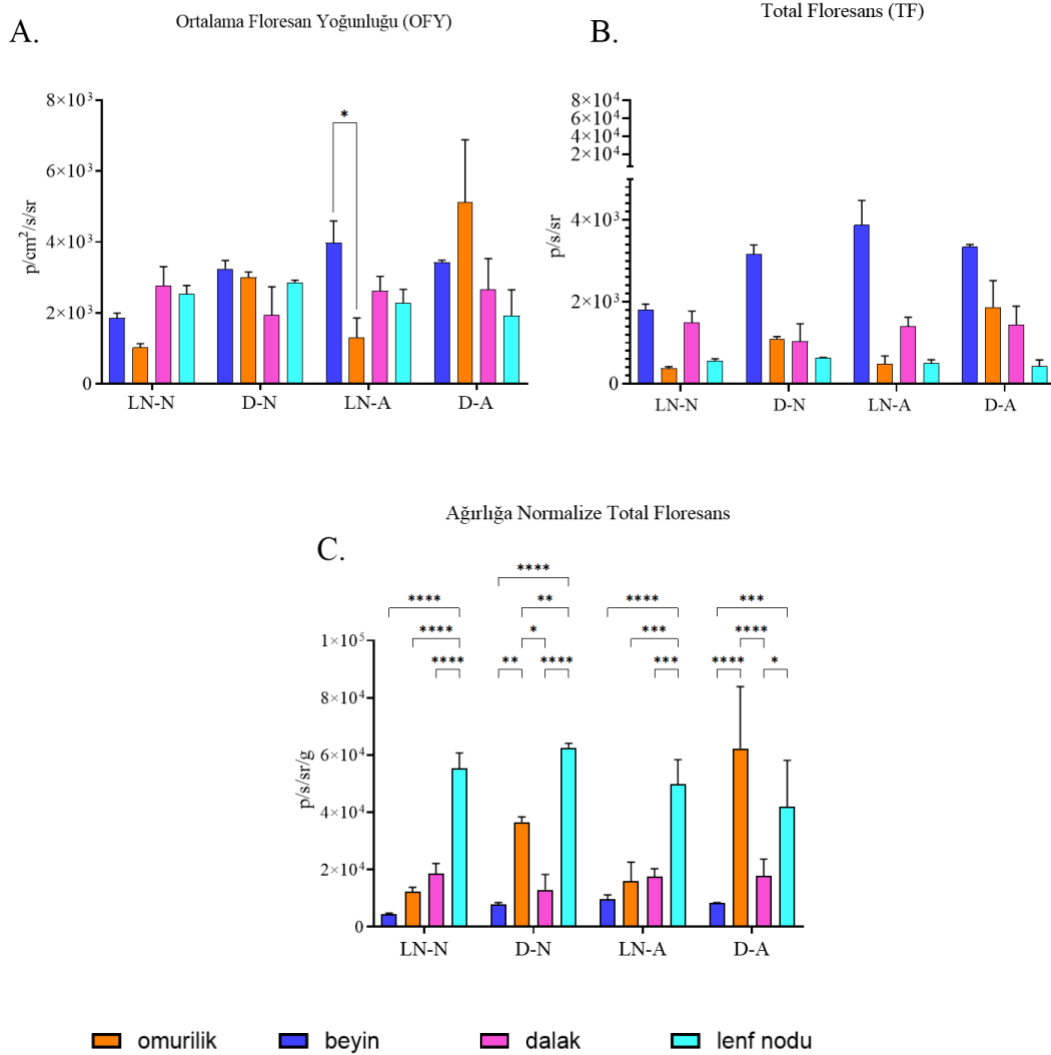


Şekil 5-11. Sağlıklı Farelerde Naif ve Aktif T Lenfosit Biyodağılımı. L-N: Lenf nodundan elde edilen naif lenfositler, D-N: Dalaktan elde edilen naif lenfositler, L-A: Lenf nodundan elde edilen aktif lenfositler, D-A: Dalaktan elde edilen aktif lenfositleri ifade etmektedir. **A. Organlardaki tutulumun OFY değerleri.** Karaciğerin OFY diğer organlardan yüksektir. **B. Organlardaki tutulumun Total Floresans değerleri.** TF grafiğinde karaciğere giden lenfosit miktarı beyin, omurilik, dalak ve lenf nodundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur **C. Ağırlığa Normalize Total Floresans grafiği.** Enjekte edilen lenfositlerin lenf noduna afinitesi diğer organlardan anlamlı derecede yüksektir. Grup başına n=2 olup iki yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. Karşılaştırma sonuçlarından anlamlı olanlar grafiklerde * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ ile gösterilmiştir. TF değerleri karaciğerde en yüksektir.

Tablo 5-2. Sağlıklı Farelerde Naif ve Aktif T Lenfosit Biyodağılımı

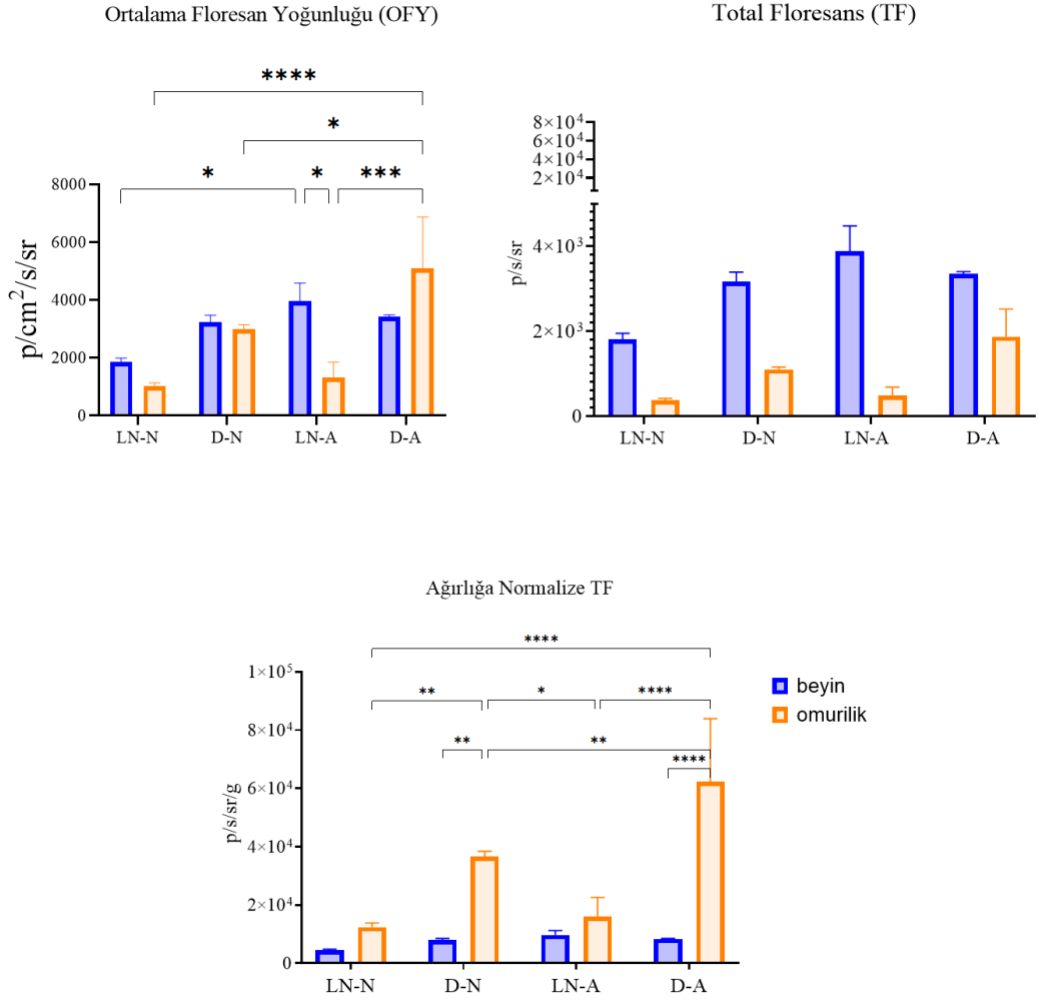
	Beyin	Omurilik	Akciğer	Kalp	Karaciğer	Böbrek	Dalak	Lenf nodu
Toplam Floresans (p/s/sr)								
Lenf nodundan aktif	3974±617	1314± 540	3159±300	755,5±405	6825,5±2682	5041,5±915	2621,5±407	2272±390
Lenf nodundan naif	1855±140	1018±117	2626±21	1341,5±59	5861,5±487	707±10	2775±530	2528±243
Dalaktan aktif	3427±61	5112±1771	2840±1706	540±5	4165±342	1556,5±689	2667±864	1918±733
Dalaktan naif	3244±232	3004±147	26010±19	1327,5±244	3532,5±46	1646±207	1935,5±798	2851±72
Ağırlığa Normalize Edilmiş Total Floresans (p/s/sr/g)								
Lenf nodundan aktif	4763±1140	4280±1341	13406±1527	21775±3371	128749±30254	15450±2263	15274±2218	3371±21115
Lenf nodundan naif	8624±1075	10749±2075	11359±1724	17628±1143	164288±24029	19715±18027	17240±13924	2540±19499
Dalaktan aktif	8307±75	7508±3534	35344±1535	17875±2815	126555± 17379	15187±5678	15345±475	3656±21973
Dalaktan naif	8458±825	8249±7756	77561±2367	17739±1326	79658±19125	9559±3387	23669±6477	1307±13782
Ortalama Floresan Yoğunluğu (p/cm²/s/sr)								
Lenf nodundan aktif	3974±616	1314±540	3159±299	756±405	6826±2682	5042±916	2621±407	2272±390
Lenf nodundan naif	1855 ± 140	1018±8117	2626±21	1342±59	5862±487	707±10	2775±530	2528±243
Dalaktan aktif	3427 ± 61	5112±1771	2840±1706	540±6	4165±342	1557±689	2667±864	1918±733
Dalaktan naif	3244 ± 232	3004±147	2610±19	1328±244	3533±46	1646±20	1936±798	2851±72

*Tüm gruplar için ortalama±standart sapma verilmiştir.



Şekil 5-12. Sağlıklı farelerde MSS ve lenfoid organlara lenfosit biyodağılımı. Enjekte edilen lenfositlerin çoğunluğu MSS’de birikmesine rağmen birim kütle başına toplanan lenfosit MSS’de lenfoid organlara göre daha azdır. LN-N: Lenf nodundan elde edilen naif lenfositler, D-N: Dalaktan elde edilen naif lenfositler, LN-A: Lenf nodundan elde edilen aktif lenfositler, D-A: Dalaktan elde edilen aktif lenfositler olmak üzere **A. Organlardaki tutulumun OFY değerleri.** LN-A grubunda beyinde biriken T lenfosit miktarı omuriliğe göre yüksek saptanmıştır. **B. Organlardaki tutulumun Toplam floresans (TF) değerleri.** Toplam floresans grafiğinde, enjekte edilen lenfositlerin beyinde biriken miktarı dalak ve lenf noduna göre yüksek görülmüştür ($p > 0,05$). **C. Organlardaki tutulumun normalize TF değerleri.** Sağlıklı hayvanlarda lenfoid organlara T lenfosit yönelimi daha fazladır. Aktivasyon ile organ omuriliğe yönelen hücre yoğunluğunda artış görülmüştür. (Grup başına $n=2$)

olup iki yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. Beyin ve omuriliğin diğer organlarla karşılaştırma sonuçlarından anlamlı olanlar grafiklerde * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ ile gösterilmiştir.)



Şekil 5-13. Beyin ve omurilikte biriken T lenfositlerin uyarımla değişen miktarı. LN-N: Lenf nodundan elde edilen naif lenfositler, D-N: Dalaktan elde edilen naif lenfositler, LN-A: Lenf nodundan elde edilen aktif lenfositler, D-A: Dalaktan elde edilen aktif lenfositler olmak üzere **A. Ortalama Floresan Yoğunluğu-Organ grafiği.** Aktif T lenfositler beyin ve omurilikte naif T lenfositlere göre daha çok yerleşmiştir. **B. Total Floresans-Organ grafiği.** **C. Ağırlığa normalize TF-Organ grafiği.** Aktif T lenfositlerin omuriliğe afinitesi naif T lenfositlerden yüksektir. Gruplar arasında karşılaştırma iki yönlü ANOVA ile yapılmıştır. Posthoc analizlerde

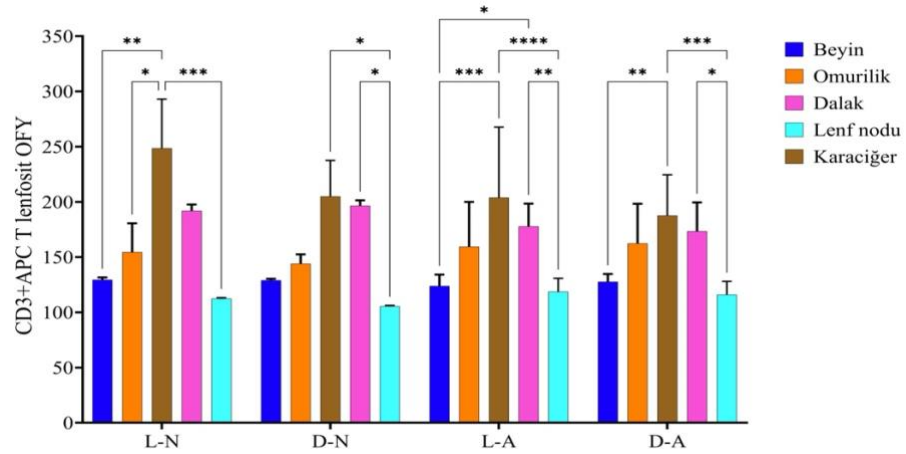
Tukey testi kullanılmıştır. Sonuçların istatistiksel anlamlılığı p değerlerine göre * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ ile gösterilmiştir.

5.3.2. Akım Sitometri Analizleri

T hücre enjeksiyonundan sonraki 16. saatte sakrifiye edilerek ex-vivo görüntülemeleri yapılan organlar, tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Tek hücre süspansiyonlarındaki işaretli T lenfositler, akım sitometride ölçülmüştür. MSS organları olan beyin ve omuriliğin yanında, T lenfositlerin enjeksiyondan sonra MSS'e geçmeden uğrayacağı öngörülen dalak, lenf nodu ve karaciğer değerlendirmeye dahil edilmiştir. Enjekte edilen lenfositleride 4 grupta ele alınmıştır. Her grup kendi içinde değerlendirilmiştir. Lenfosit grupları aşağıdaki gibidir:

1. Lenf nodundan alınmış naif lenfositler
2. Dalaktan alınmış naif lenfositler
3. Lenf nodundan alınmış aktif lenfositler
4. Dalaktan alınmış aktif lenfositler

Ex-vivo görüntüleme bulguları ile benzer şekilde her grupta karaciğerde biriken T lenfosit tutulumu diğer organlara göre yüksek saptanmıştır ($p<0,05$). İkili karşılaştırmalar ve anlamlı bulunan sonuçlar **Şekil 5-14**'te özetlenmiştir.



Şekil 5-14. Farklı kaynaklardan elde edilmiş aktif ve naif lenfositlerin farklı organlarda akım sitometri ile ölçülmesi. L-N: Lenf nodundan elde edilen naif lenfositler, D-N: Dalaktan elde edilen naif lenfositler, L-A: Lenf nodundan elde edilen

aktif lenfositler, D-A: Dalaktan elde edilen aktif lenfositler olmak üzere aktif lenfositlerin kullanıldığı gruplarda n=4, naif lenfositlerin kullanıldığı gruplarda n=2'dir. Gruplar arasında karşılaştırma iki yönlü ANOVA ile yapılmış olup her grupta karaciğerde biriken lenfosit miktarı diğer organlara göre yüksek saptanmıştır. (Grafiklerde *<0,05; **<0,01; ***<0,001 ile gösterilmiştir.)

5.4. Kuprizonlu Diyet Alan Farelerde T Lenfosit Biyodağılımı:





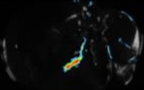







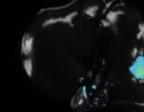







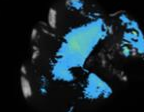







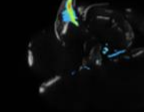







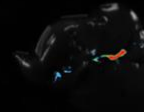



5.4.1. Ex vivo Görüntüleme Bulguları:

İki sağlıklı fareye FIT-C florokromu ile işaretlenmiş naif T lenfositler enjekte edilmiştir. Diğer iki fareye, nonspesifik yöntemle aktivasyon ve proliferasyonu teşvik edilen, APC ile işaretlenmiş T lenfositler enjekte edilmiştir. Kontrol amacıyla bir fareye PBS enjekte edilmiştir. Enjeksiyonların ardından 16 saat sonra fareler sakrifiye edilmiştir. Bu süreçte perfüzyon yapılmamıştır. Beyin, omurilik, karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, dalak ve lenf nodları disseke edilerek ex-vivo görüntüleme cihazına yerleştirilmiştir. APC işaretinin uyarılması için 577 nm, emisyonu için 602 nm dalga boyları; FIT-C işaretinin uyarılması için 490 nm, emisyonu için 620 nm dalga boyları kullanılarak, her biri 1 saniye süresince görüntü alınmıştır. (Şekil 5-15).

Enjekte edilen lenfositler 4 grupta ele alınmıştır:

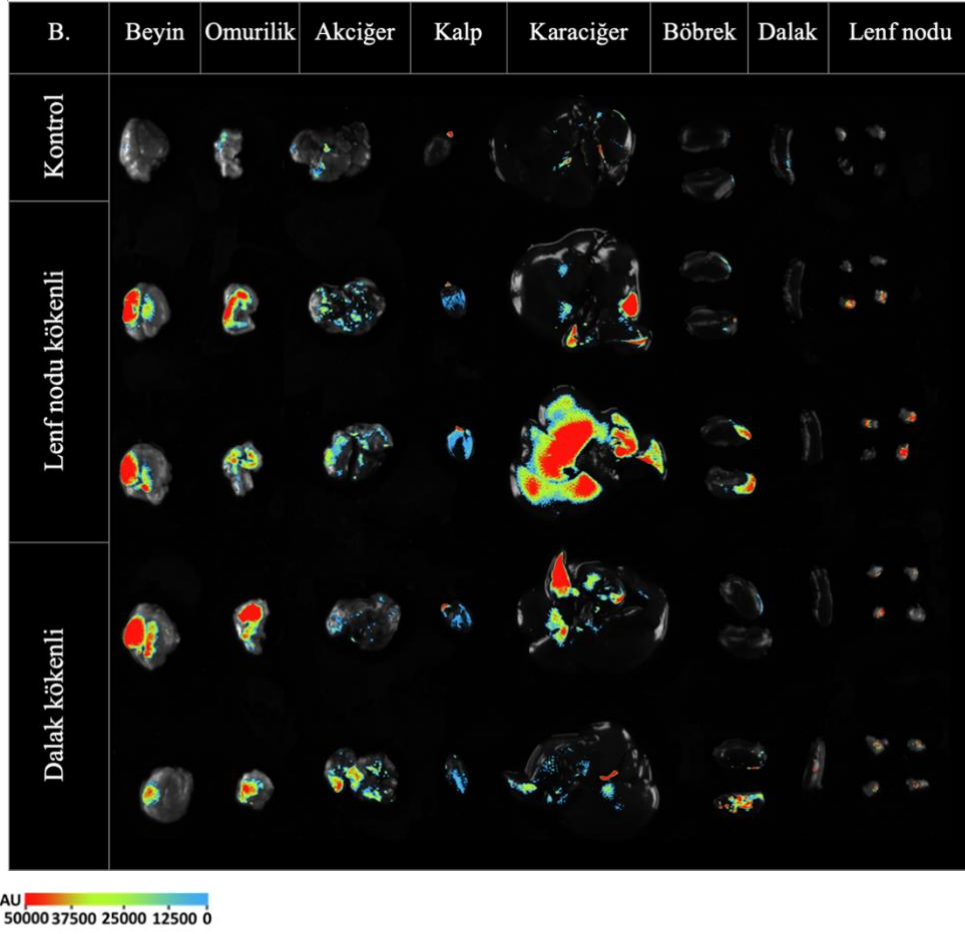
1. Lenf nodundan alınmış naif lenfositler
2. Dalaktan alınmış naif lenfositler
3. Lenf nodundan alınmış aktif lenfositler
4. Dalaktan alınmış aktif lenfositler

Öncelikle her grup kendi içinde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerde organlar arasındaki tutulum birbiriyle karşılaştırılmıştır. Değerlendirilen her grupta T lenfositlerin lenf nodunda daha çok biriktiği saptanmıştır ($p<0,001$). Ayrıca aktif lenfositlerin yer aldığı gruplarda omurilikteki birikimin de öne çıktığı görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 5-16).

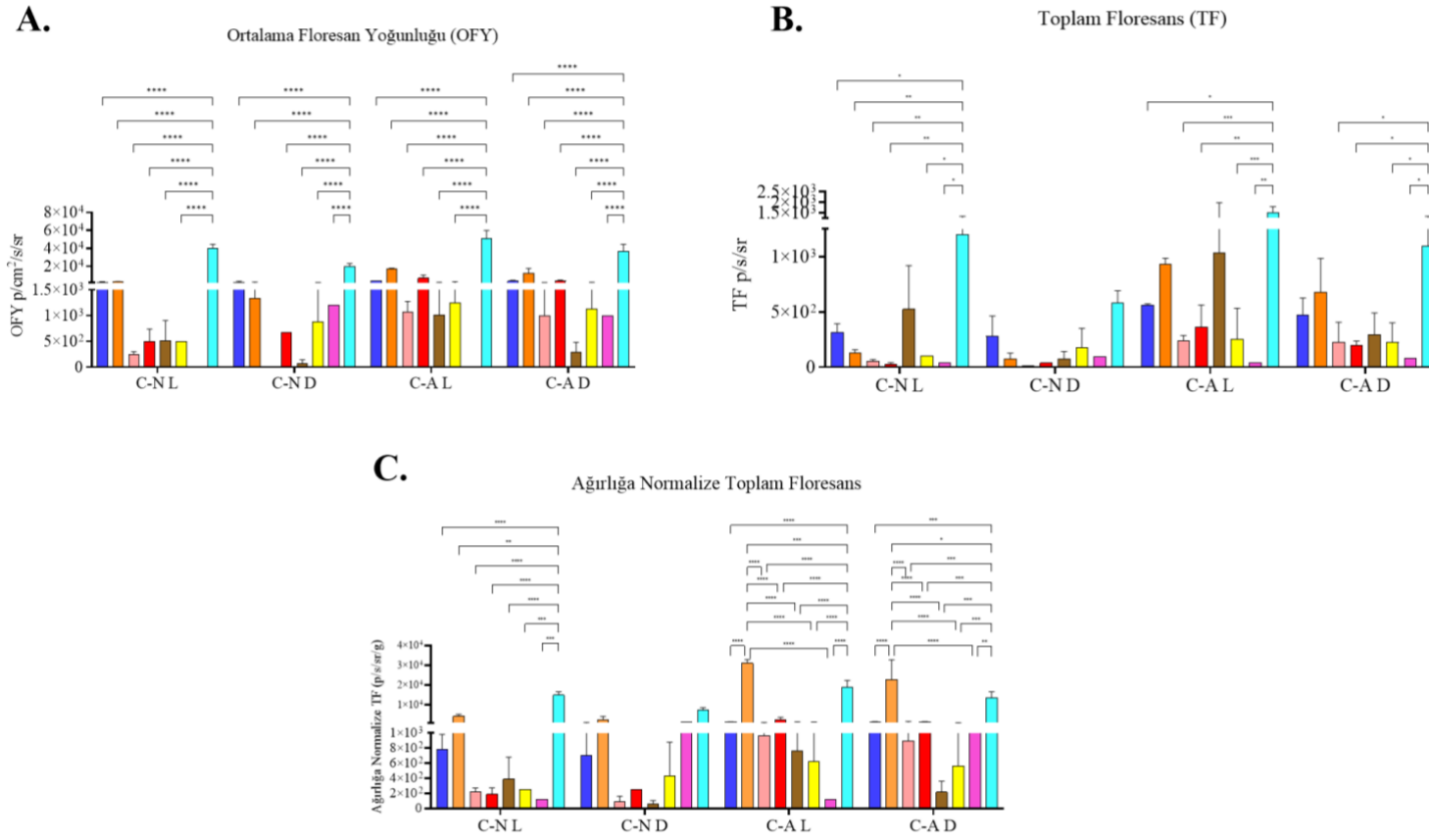
A.	Beyin	Omurilik	Akciğer	Kalp	Karaciğer	Böbrek	Dalak	Lenf nodu
Kontrol								
Lenf nodu kökenli								
								
Dalak kökenli								
								

(Şekil 5-15A)

(Şekil 5-15 Devam)



Şekil 5-15. Kuprizonlu toksik demiyelinizasyona sahip farelerde T lenfosit biyodağılımı-ex vivo görüntüleme. Her sütun farklı bir organa aittir. Sırasıyla beyin, omurilik, akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, dalak ve lenf nodları yer almaktadır. Farklı gruplara ait organlar farklı satırlarda yer almaktadır. **A.** Naif T lenfositlerin ışınım miktarını ölçmek için organlar 490 nm’de uyarılarak FIT-C florokromundan yayılan dalga boyları ölçülmüştür. **B.** Aktif lenfositlerin ışınım miktarını ölçmek için organlar 580 nm’de uyarılarak APC florokromundan yayılan dalga boyları ölçülmüştür. Görüntüler Vilber Newton 7.0 görüntüleme cihazında alınmıştır.

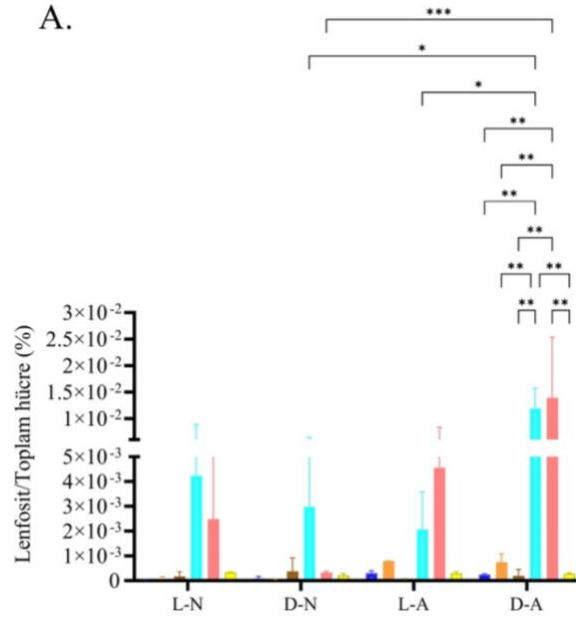


Şekil 5-16. Kuprizonlu yem ile beslenen farelerde naif T lenfositlerin ve aktifleşmiş T lenfositlerin -ex vivo görüntüleme analizi n=2 olup iki yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. (Grafiklerde * $<0,05$; ** $<0,01$; * $<0,001$ ile gösterilmiştir.) (C: kuprizonlu grup, L: lenfositler lenf nodundan elde edilmiştir; D: dalaktan elde edilmiştir) Farklı organlardaki lenfosit biyodağılımı A. OFY B. Ağırlığa normalize OFY, C. TF ve D. Ağırlığa normalize TF grafikleriyle değerlendirilmiştir.**

5.4.2. Akım Sitometri Bulguları:

Kuprizonlu diyet verilen fareler, T hücre enjeksiyonundan 16 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Merkezi sinir sistemi (MSS) organları olan beyin ve omuriliğin yanı sıra, T lenfositlerin MSS'e ulaşmadan önce geçmesi beklenen dalak, lenf nodu ve karaciğer de değerlendirilmiştir. Ex-vivo görüntülemesi yapılan organlar tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Tek hücre süspansiyonları (5×10^6 hücre/mL), enjeksiyon öncesinde işaretlendikleri florokromların uyarılma ve emisyon frekanslarına göre akım sitometrisine alınmıştır. Naif T lenfositler FIT-C, aktif T lenfositler ise APC florokromları ile işaretlenmiştir; uyarım ve emisyon dalga boyları sırasıyla 490/620 nm ve 577/402 nm'dir. Akım sitometrisinde, her organ için lenfosit popülasyonu seçildikten sonra tekli hücre popülasyonları belirlenmiştir. Daha sonra, APC-A pozitif aktif hücreler ve FIT-C pozitif naif hücreler işaretlenmiştir. Son olarak, lenfosit sayısının toplam hücre sayısına oranı hesaplanmıştır.

Her grup kendi içinde değerlendirilmiştir. Tüm gruplarda lenfositlerin lenf nodunda ve akciğerdeki oranları diğer organlara göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bu fark, dalaktan uyarılmış aktif lenfosit grubunda anlamlı seviyeye ulaşmıştır. Beyin ve omurilik süspansiyonlarında dışardan enjekte edilen naif lenfositlerin neredeyse hiç bulunmadığı görülmüştür. Ancak aktif T lenfositler az miktarda da olsa beyin ve omurilikte tespit edilmiştir.



Şekil 5-17. Kuprizonlu hayvanlarda farklı organlarda aktif T lenfosit ve Naif T lenfosit dağılımı. Biyodağılımı çalışılan lenfositlerin toplam hücre sayısına oranı akciğer ve lenf nodunda diğer organlara göre yüksektir. Aktivasyon, organlarda T lenfosit tutulumunu artırmıştır. Grup başına n=4 olup iki yönlü ANOVA ile yapılan analizde elde edilen p değerleri *<0,05; **<0,01; ***<0,001 ile gösterilmiştir. (L-N: Lenf nodundan elde edilen naif lenfositler, D-N: Dalaktan elde edilen naif lenfositler, L-A: Lenf nodundan elde edilen aktif lenfositler, D-A: Dalaktan elde edilen aktif lenfositler)

5.5. Kuprizonlu Toksik Demiyelinizasyon Modelinde T Lenfosit Biyodağılımının Sağlıklı Grupla Karşılaştırılması:

Sağlıklı fareler ve kuprizonlu yemle beslenen fareler üzerinde gerçekleştirilen T lenfosit biyodağılım çalışmalarında uyarılmış T lenfositlerin naif gruba göre etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Naif T lenfositlerden aktif T lenfositlere geçiş sırasında lenf nodundan elde edilen T lenfositlerin etkinliğinde, dalaktan elde edilenlere göre daha fazla artış görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda önerilen çift indüksiyonlu kuprizonlu toksik demiyelinizasyon modelinin tasarımında lenf nodundan elde edilmiş T lenfositler kullanılmıştır.

Aktif T lenfositler, in-vitro 96 saat boyunca uyarıldıktan sonra elde edilmiştir. Lenf nodundan elde edilmiş T lenfositler naif ve aktif olmak üzere sağlıklı farelere ve 8 hafta kuprizonlu yemle beslenmiş farelere dört grup (n=5/grup) halinde kuyruk veninden periferal yolla 10^6 hücre/fare olmak üzere uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrasındaki 16. saatte fareler sakrifiye edilerek beyinler diseke edilmiş ve biyodağılım çalışmaları tekrarlanmıştır. Böylece, bir sonraki basamak için, optimizasyon deneylerinden MSS organları için elde edilen bilgilerin için geçerliliklerini kanıtlamak amaçlanmıştır. Bu deney grubunda sadece 'beyin' diseksiyonu yapıldığına dikkat ediniz.

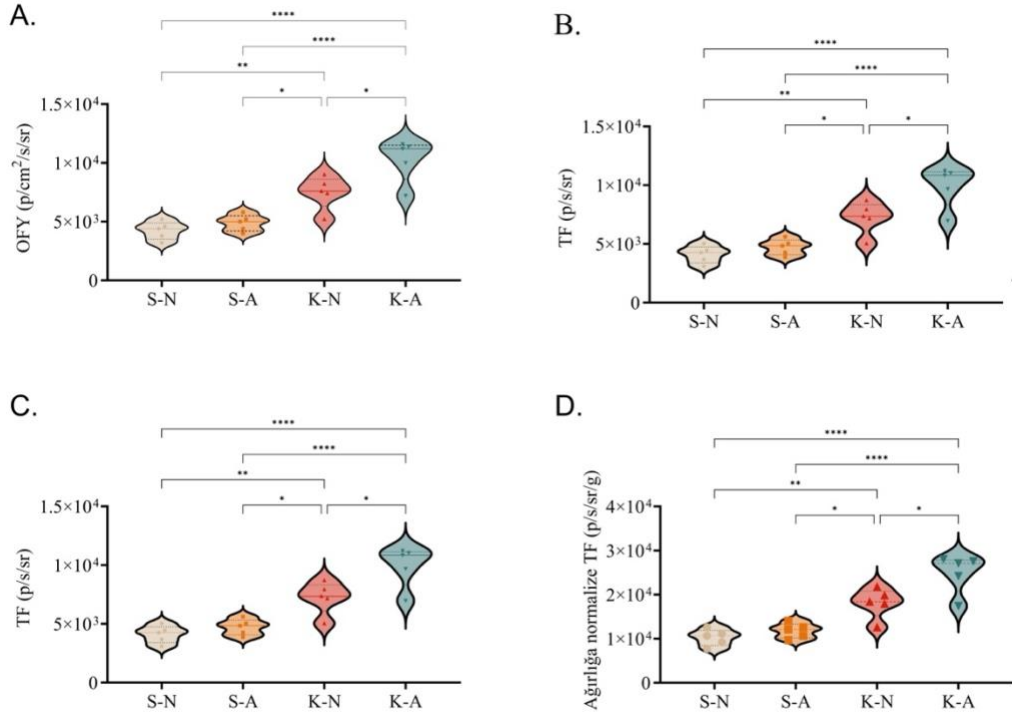
5.5.1. Ex-vivo Görüntüleme Bulguları:

Bir adet kontrol fare ile beraber dört grup fare sakrifiye edildikten sonra beyin diseksiyonu yapılmış ve beyinler ex-vivo görüntüleme cihazına yerleştirilmiştir. Florokrom (Allophycocyanin-APC) ile uygun dalga boylarında 1 sn boyunca görüntü alınmıştır. Kontrol fare ile belirlenen otofloresan değeri diğer farelerden çıkarılarak net OFY elde edilmiştir. OFY, TF ve bu parametrelerin ağırlığa göre normalize edilmiş değerleri hesaplanmıştır. Bu deneyde birbiriyle karşılaştırılan 4 grup aşağıdaki gibidir:

1. Naif T lenfositlerin verildiği sağlıklı fareler
2. Aktif T lenfositlerin verildiği sağlıklı fareler
3. Naif T lenfositlerin verildiği kuprizonlu fareler
4. Aktif T lenfositlerin verildiği kuprizonlu fareler

Gruplar, tek yönlü ANOVA ile karşılaştırılmıştır.

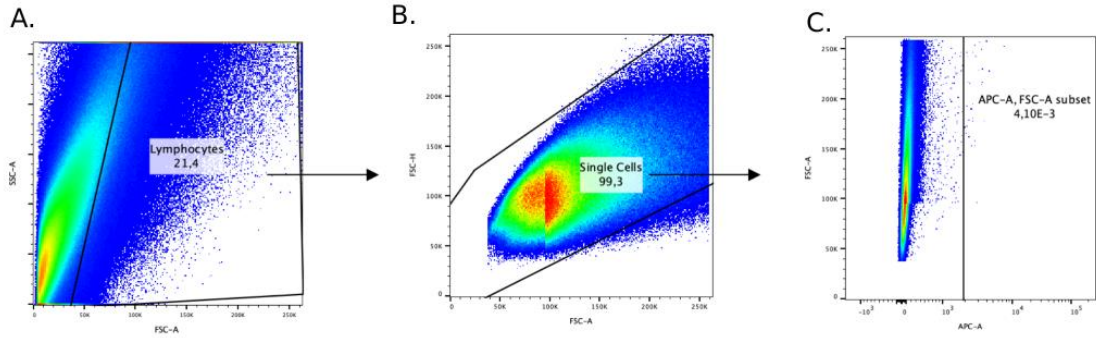
En yüksek T lenfosit miktarı ve yoğunluğu aktif T lenfositlerin enjekte edildiği kuprizonlu hayvanlarda saptanmıştır ($p<0,01$). Ayrıca kuprizonlu hayvanlara naif T lenfosit verildiğinde, beyinde sağlıklı grupların ikisine göre de dha fazla T lenfosit biriktiği görülmüştür ($p<0,05$). Bu karşılaştırma farklı parametreler (OFY, TF ve ağırlığa normalize edilmiş OFY ile TF) üzerinden yapıldığında benzer sonuçlar bulunmuştur.



Şekil 5-18. Sağlıklı fareler ve kuprizonlu yem ile beslenen farelerin beyinlerinde T lenfosit biyodağılımı-Ex vivo görüntüleme bulguları: A. Ortalama Floresan Yoğunluğu (OFY), **B.** Ağırlığa normalize edilmiş OFY, **C.** Toplam floresans, **D.** Ağırlığa normalize edilmiş TF ortalama değerlerinin, sağlıklı gruplar arası yapılan karşılaştırma dışında diğer gruplar arasında belirgin farklı olduğu saptanmıştır. Grup başına n=5 olup tek yönlü ANOVA ile yapılan analizde elde edilen p değerleri *<0,05; **<0,01; ***<0,001 ile gösterilmiştir. Post-hoc analizlerde ‘Tukey testi’ kullanılmıştır. (S-N: Sağlıklı fareye naif T lenfosit verilmiş, S-A: Sağlıklı fareye aktif T lenfosit verilmiş, K-N: Kuprizonlu yem ile beslenen fareye naif T lenfosit verilmiş, K-A: Kuprizonlu yem ile beslenen fareye aktif T lenfosit verilmiş)

5.5.2. Akım Sitometri Bulguları:

Ex-vivo görüntüleme sonrasında örnekler işaretlenmiş oldukları Allophycocyanin (APC) florokromunun dalga boylarına uygun şekilde analiz için akım sitometrisine tabi tutulmuştur. Beyinlerden hazırlanan süspansiyonlarda önce SSC-A ve FSC-A özelliklerine göre lenfosit popülasyonunda olan hücreler belirlenmiştir. Ardından, akım sitometrisinde dedektör önünden geçen tekli hücre popülasyonu diğerlerinden ayrılmıştır (single cell gating). Bu tekli hücre popülasyonu içinde farelere enjekte edilen lenfositleri temsil eden APC+ lenfositlerin toplam hücre sayısına oranı (%) ölçülmüştür. Kapılama stratejisi Şekil 5-19'da özetlenmiştir.

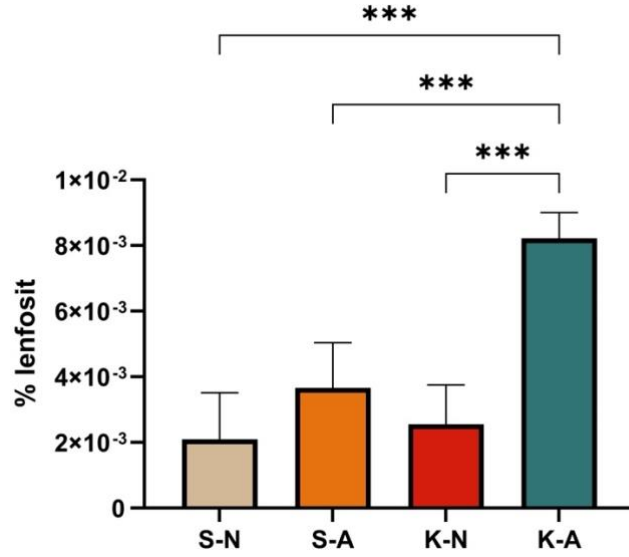


Şekil 5-19. Fare Beyninden APC+ Lenfositlerin Kapılama Stratejisi A. İlk panel, lenfosit popülasyonunun FSC-A (Forward Scatter Area) ve SSC-A (Side Scatter Area) üzerinden seçimini göstermektedir. Süspansiyon içindeki tüm lenfositler, bu parametreler kullanılarak belirlenir. B. İkinci panel, önceki adımda seçilen lenfosit popülasyonu içerisinde tekli hücrelerin (Single Cells) seçilmesini göstermektedir. Bu adım, çiftli hücrelerin (doublets) elimine edilmesi için önemlidir. C. Üçüncü panel tekli hücre popülasyonu içerisinde APC+ lenfositlerin seçimini göstermektedir. APC pozitif hücreler, FSC-A ve APC-A parametrelerine göre, kontrol fare kullanılarak önceden saptanmış sınırlar çizilerek belirlenir.

Bu deneyde birbiriyle karşılaştırılan 4 grup aşağıdaki gibidir:

5. Naif T lenfositlerin verildiği sağlıklı fareler (S-N)
6. Aktif T lenfositlerin verildiği sağlıklı fareler (S-A)
7. Naif T lenfositlerin verildiği kuprizonlu fareler (K-N)
8. Aktif T lenfositlerin verildiği kuprizonlu fareler (K-A)

Lenfosit yüzdeleri için yapılan ANOVA analizi, gruplar arasında anlamlı farklar olduğunu göstermiştir ($F(3, 11) = 19,88, P < 0,0001$). K-A grubunun ortalama lenfosit yüzdesi $8.23E-03 \pm 9.00E-04$ olup S-N grubundan ($2.93E-03 \pm 1.79E-03$), S-A grubundan ($3.43E-03 \pm 1.53E-03$) ve K-N grubundan ($2.55E-03 \pm 1.11E-03$) yüksek saptanmıştır (tüm karşılaştırmalar için $p < 0,001$) (Şekil 5-20).



Şekil 5-20. Sağlıklı fareler ve kuprizonlu yem ile beslenen farelerin beyinlerinde T lenfosit biyodağılımı-Akım sitometri bulguları S-N (Sağlıklı Naif): Sağlıklı ve naif (uyarılmamış) T lenfositleri içeren grup. S-A (Sağlıklı Aktif): Sağlıklı ve aktif (uyarılmış) T lenfositleri içeren grup. K-N (Kuprizon Naif): Kuprizon ile beslenen ve naif T lenfositleri içeren grup. K-A (Kuprizon Aktif): Kuprizon ile beslenen ve aktif T lenfositleri içeren grup. Y eksenini, toplam hücre içindeki APC+ T lenfosit yüzdesini göstermektedir. Her bir bar, ilgili grubun ortalama lenfosit yüzdesini ve ortalama±standart sapma şeklinde göstermektedir. Gruplar arasındaki karşılaştırma

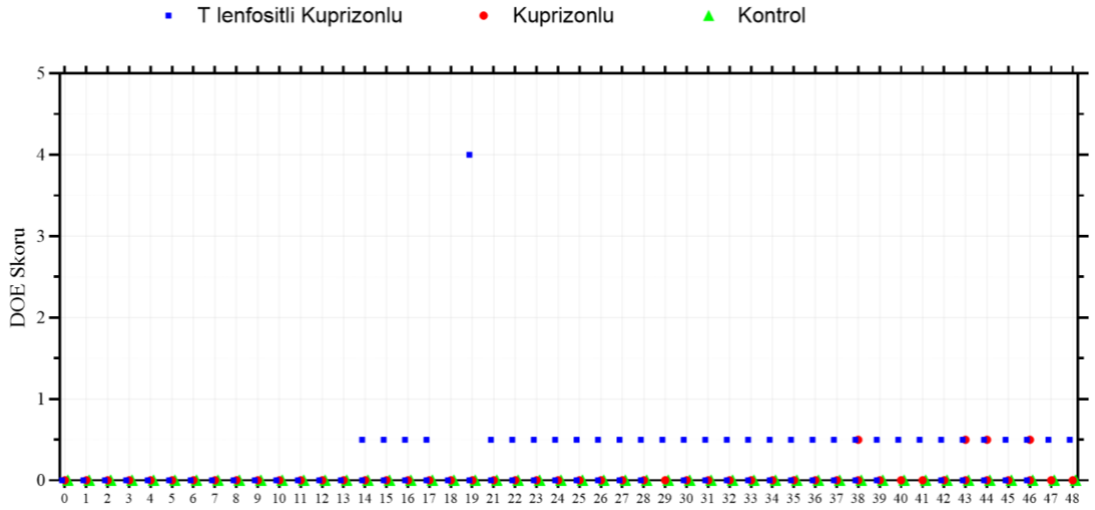
tek yönlü ANOVA ile ve post-hoc analizler Tukey testi ile yapılmıştır. Her karşılaştırma için p değeri <0,001 olan gruplar *** ile belirtilmiştir.

5.6. Kuprizonlu Toksik Demiyelinizasyon ve Nonspesifik olarak Aktifleştirilmiş Periferik T lenfosit İndüksiyonuyla Oluşturulan Yeni Modelin Multidisipliner Yaklaşımla Değerlendirilmesi:

Bu deneyde, üç farklı grup oluşturulmuştur. Birinci grupta (n=5), tamamen sağlıklı ve kontrol yem ile beslenen fareler bulunmaktadır. Bu grup, diğer iki grup için kontrol olarak kullanılmıştır. İkinci grupta (n=5) ise, deneylere hazırlık amacıyla 12 hafta boyunca kuprizonlu yem ile beslenmiş fareler yer almaktadır ve bu fareler deney süresince de aynı diyetle devam etmiştir. Üçüncü gruptaki fareler (n=7), ikinci gruptaki farelerle aynı şekilde 12 hafta boyunca kuprizonlu yem ile beslenmiş ve deney süresince de bu diyetle devam etmiştir. Ancak ek olarak deney süresince bu gruba her 96 saate bir toplamda 12 defa aktif T lenfosit enjeksiyonu yapılmıştır.

5.6.1. DOE Skoru ile Değerlendirme:

Deneyin ilk günü 0. gün olarak kabul edilmiş ve bugünden itibaren üç grup fare her gün DOE skoru ile değerlendirilmiştir. Bu süreçte T lenfosit enjeksiyonu yapılan farelerden bir tanesinde 12. günde ilk klinik bulgular görülmeye başlamış olup bu fare ile beraber toplam 2 fare 17. Ve 19. günlerde ölmüştür. Kalan 5 farelerden bir tanesinde DOE skoru ile yapılan muayenede ilk değişiklik skor 0,5 olacak şekilde 5. enjeksiyon sonrasında (21. günde) görülmüştür. Diğer 4 farede ilk klinik değişiklik 7. Enjeksiyon sonrasında (28-30. günlerde) görülmüştür. Skor puanı bu 5 farede deney sonuna dek 0-0,5 puan şeklinde dalgalanma göstermiştir (**Şekil 5-21**).



Şekil 5-21. Farklı gruplardaki farelerin DOE skorlarının karşılaştırılması Bu grafik, T lenfositli kuprizonlu (mavi kareler), kuprizonlu (kırmızı daireler) ve kontrol (yeşil üçgenler) fare gruplarında DOE skorlarını göstermektedir. Her bir grup için toplam 48 değerlendirme yapılmıştır. DOE skoru, farelerin motor fonksiyonlarındaki değişiklikleri ve nörolojik belirtileri değerlendirmek için kullanılmıştır.

5.6.2. Davranış Deneyleri:

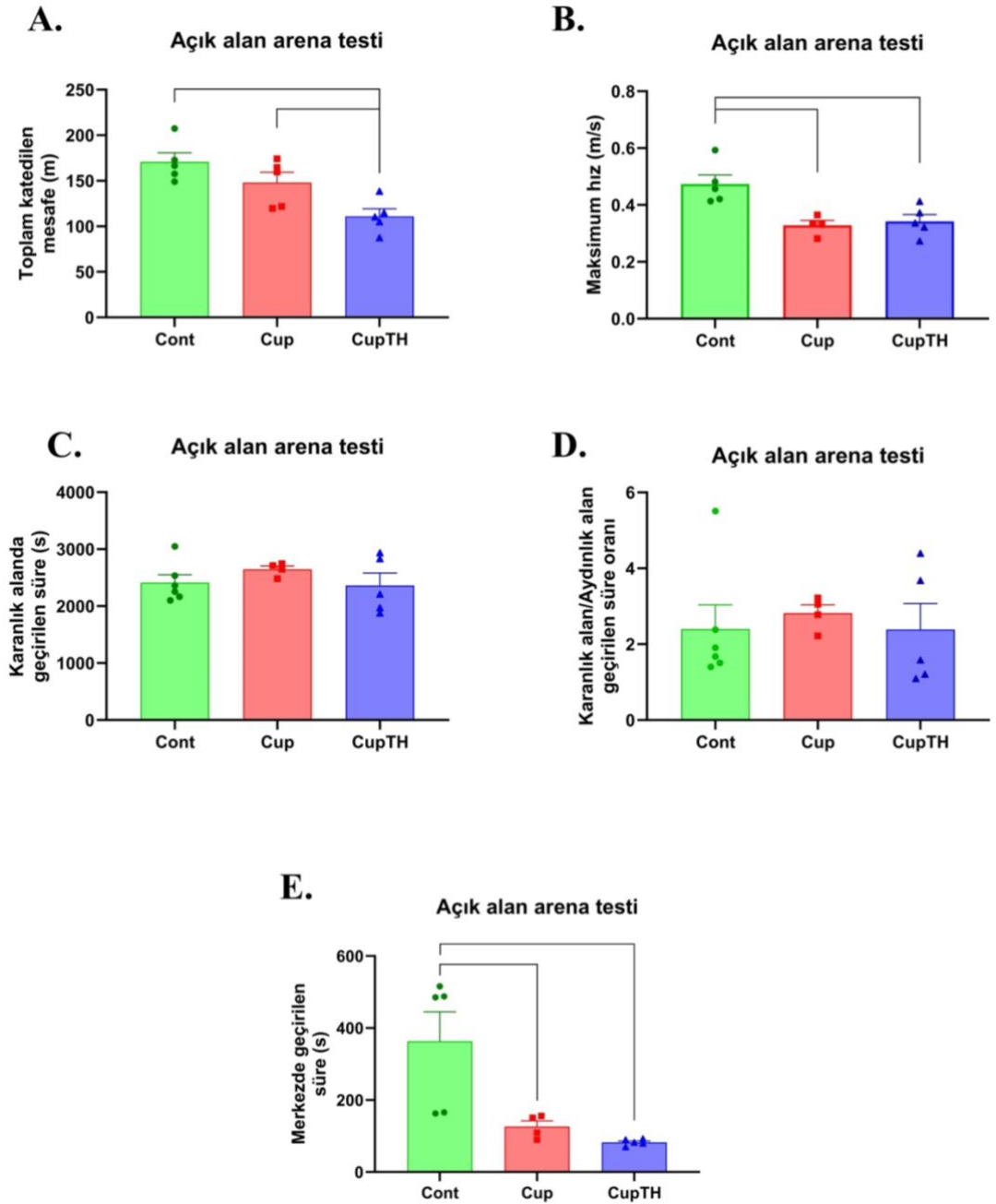
Fonksiyonel değerlendirmenin amaçlandığı davranış deneyleri kapsamında lokomasyon kabiliyeti ve belirgin olmayan motor defisiti göstermek amacıyla açık alan arena testi uygulanmıştır.

Bir saat boyunca katedilen toplam mesafeyi üç grup arasında karşılaştırmak amacıyla yapılan tek yönlü ANOVA analizi, gruplar arasında anlamlı farklar olduğunu göstermiştir ($p=0,004$; $R^2 =0,604$). Farelerin kat ettiği toplam mesafe ortalamaları kontrol grupta $170,69\pm 21,85$ m, kuprizonlu yem grubunda $147,18\pm 24,76$ m ve çift indüksiyon grubunda $110,97\pm 19,42$ m olarak bulunmuştur. Tukey'in çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre kuprizonlu diyet alan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,278$). Çift indüksiyon yapılan grupta ise toplam katedilen mesafe hem kontrol gruba göre hem kuprizonlu gruba göre düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,05$) (Şekil 5-22A).

Üç grup arasında maksimum hız verilerini karşılaştırmak için yapılan ANOVA analizi, gruplar arasında anlamlı farklar olduğunu göstermiştir ($F(2,11) = 9,386$; $p = 0,004$; $R^2 = 0,631$). Maksimum hız ortalamaları kontrol grupta $0,473 \pm 0,066$ m/s, kuprizonlu grupta $0,329 \pm 0,036$ m/s ve çift indüksiyon uygulanan grupta $0,343 \pm 0,051$ m/s bulunmuştur. Tukey'in çoklu karşılaştırma testi sonucunda kuprizonlu diyet alan grubun ve çift indüksiyon uygulanan grubun hız ortalaması kontrole göre düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,01$). Ancak çift indüksiyon uygulanan grup ile kuprizonlu diyet alan grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,928$) (**Şekil 5-22B**).

Görme bozukluğunu (optik nörit varlığını) dolaylı yoldan saptayabilmek için 'karanlık alanda geçirilen süre' ve 'karanlık alanda geçirilen sürenin aydınlık alanda geçirilen süreye oranı' değerlendirilmiştir. Grupların bu iki parametre için de ortalama değerleri benzer bulunmuştur (sırayla $p=0,5$ ve $p=0,8$) (**Şekil 5-22.C,D**). Buradan hareketle, lokomasyon testlerindeki farkın görme bozukluğundan kaynaklanmadığı söylenebilir.

Açık alanın merkezinde geçirilen süre ortalamaları kontrol grupta $363,4 \pm 166,6$ s; yalnızca kuprizonlu diyet alan grupta $126,35 \pm 30,23$ s ve çift indüksiyon alan grupta $82,38 \pm 8,81$ s olarak bulunmuştur. Merkezde geçirilen zaman verilerini üç grup arasında karşılaştırmak için yapılan tek yönlü ANOVA analizi, gruplar arasında anlamlı farklar olduğunu göstermektedir ($F(2, 11) = 9,031$; $p= 0,004$; $R^2 = 0,6215$). Tukey'in çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre kontrol grubun ortalaması hem kuprizonlu gruba göre hem de çift indüksiyon alan gruba göre yüksektir (sırasıyla $p=0,02$; $p=0,006$). Kuprizonlu grup ve çift indüksiyon uygulanan grup arasında fark bulunmamıştır ($P = 0,829$) (**Şekil 5-22.E**). Açık alanın merkezinde geçirilen sürede azalma anksiyete göstergesi olarak değerlendirilmiştir.



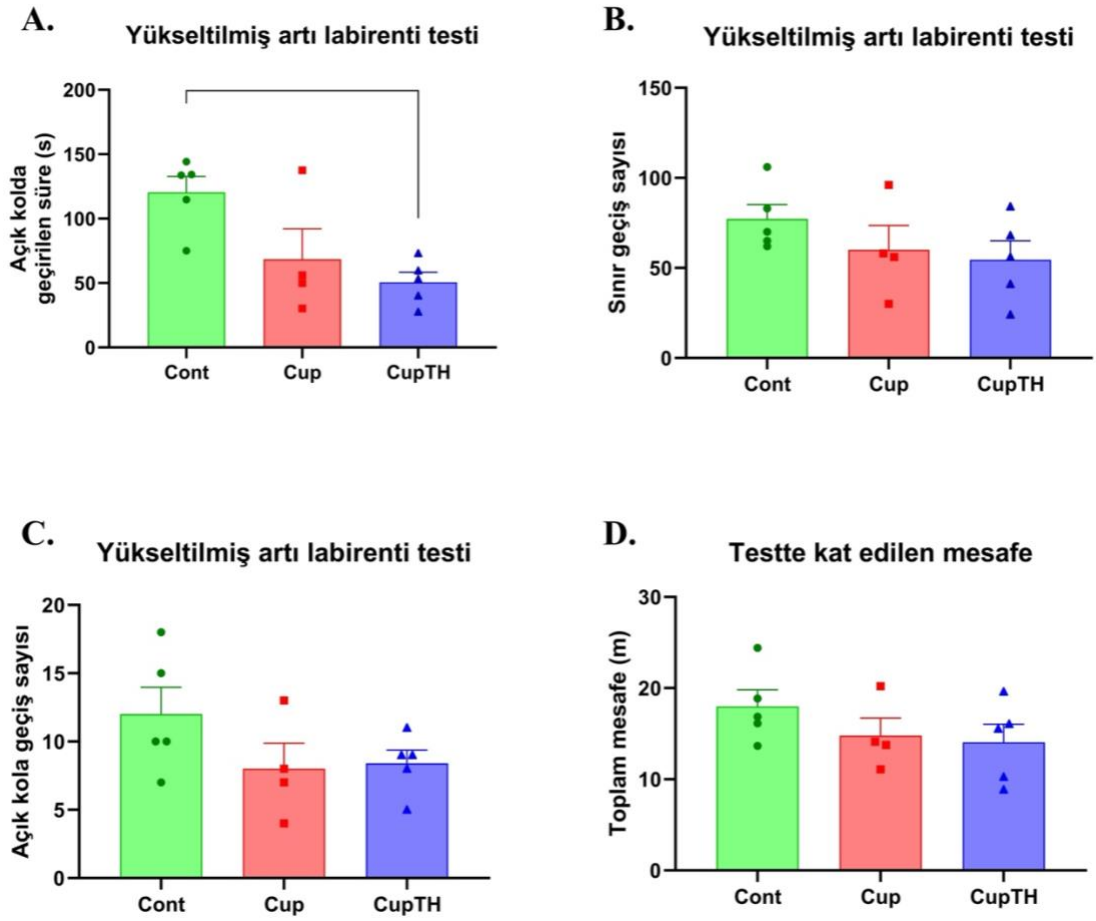
Şekil 5-22. Açık alan arena testi **A. Toplam Kat Edilen Mesafe (m):** Çifte indüksiyon uygulanan grubun kat ettiği mesafe, kontrol grubuna ve sadece kuprizonlu diyet alan gruba göre düşüktür. **B. Kontrol grubunun ortalama maksimum hızı (m/s),** diğer iki grubun ortalama hızından daha yüksektir. **C. Karanlık Alanda Geçirilen Süre (s):** Bu parametrede gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. **D. Karanlık/Aydınlık Alanda Geçirilen Süre Oranı:** Gruplar arasında bu oran açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. **E. Merkezde geçirilen süre.** Kontrol grubunun merkezde geçirdiği ortalama süre (s), diğer iki gruptan yüksektir. Bar

grafiklerde ortalama±standart sapma gösterilmektedir. Aralarında anlamlı fark bulunan sütunlar (gruplar) çizgi ile birleştirilmiştir. Farklar tek yönlü ANOVA analizi ile değerlendirilmiş ve Post-hoc analizler Tukey testi ile yapılmıştır.

Farelerin ‘açık kolda geçirilen süreleri’ tek yönlü ANOVA ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklar olduğu görülmüştür ($F(2, 11) = 6.514$, $p= 0.014$; $R^2 = 0.542$). Açık kolda geçirilen süre ortalamaları kontrol grupta 120.4 ± 27.51 s, kuprizonlu grupta 68.45 ± 45.87 s ve çifte indüksiyon uygulanan grupta 50.66 ± 17.97 s olarak bulunmuştur. Bu değerler kuprizonlu grupta ve çift indüksiyon alan grupta kontrol gruba göre düşük saptanmıştır (sırasıyla $p=0,076$; $p=0,013$) (**Şekil5-23A**).

Farelerin açık alan/kapalı alan sınırını geçiş sayıları üç grupta benzer bulunmuştur ($F(2,11)=1,33$; $p=0,30$; $R^2 =0,20$). Sınır geçiş sayısı ortalamaları kontrol grupta $77,2\pm18,84$, kuprizonlu grupta $60\pm27,84$ ve çift indüksiyon uygulanan grupta 54.6 ± 23.47 saptanmıştır (**Şekil 5 23B**). Sınır geçiş sayılarının toplamı içinde açık kola geçiş sayısı da gruplar arasında benzerdir ($p=0,207$) (**Şekil 5-23C**).

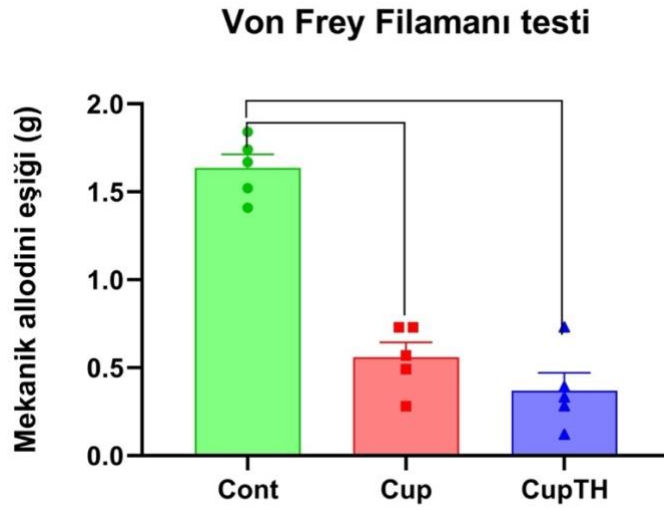
Farelerin yükseltilmiş artı labirentinde kat ettikleri toplam mesafe ortalamaları kontrol grupta 18.00 ± 3.83 m, kuprizonlu grupta 14.79 ± 3.87 m ve çift indüksiyon uygulanan grupta $14.07 \pm 4,1$ m’dir. Tek yönlü ANOVA sonuçları, gruplar arasında fark olmadığını göstermektedir ($F(2, 11) = 1.254$, $P = 0.3231$, $R^2 = 0.1857$). (**Şekil 5-23.D**).



Şekil 5-23. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçları. **A. Açık Kolda Geçirilen Süre (s):** Kontrol grubunun açık kolda geçirdiği süre, sadece kuprizonlu diyet alan grup (Cup) ve çifte indüksiyon uygulanan grup (CupTH) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksektir. **B. Sınır Geçiş Sayısı:** Kontrol grubunun sınır geçiş sayısı, sadece kuprizonlu diyet alan grup (Cup) ve çifte indüksiyon uygulanan grup (CupTH) ile karşılaştırıldığında daha yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur. **C. Açık Kola Geçiş Sayısı:** Kontrol grubunun açık kola geçiş sayısı, sadece kuprizonlu diyet alan grup (Cup) ve çifte indüksiyon uygulanan grup (CupTH) ile karşılaştırıldığında daha yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. **D. Toplam Mesafe (m):** Kontrol grubunun deney düzeneğinde toplam kat ettiği mesafe, sadece kuprizonlu diyet alan grup (Cup) ve çifte indüksiyon uygulanan grup (CupTH) ile karşılaştırıldığında daha yüksektir, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bar grafiklerde ortalama±standart sapma gösterilmektedir. Aralarında anlamlı fark bulunan sütunlar (gruplar) çizgi ile

birleştirilmiştir. Farklar tek yönlü ANOVA analizi ile değerlendirilmiş ve Post-hoc analizler Tukey testi ile yapılmıştır.

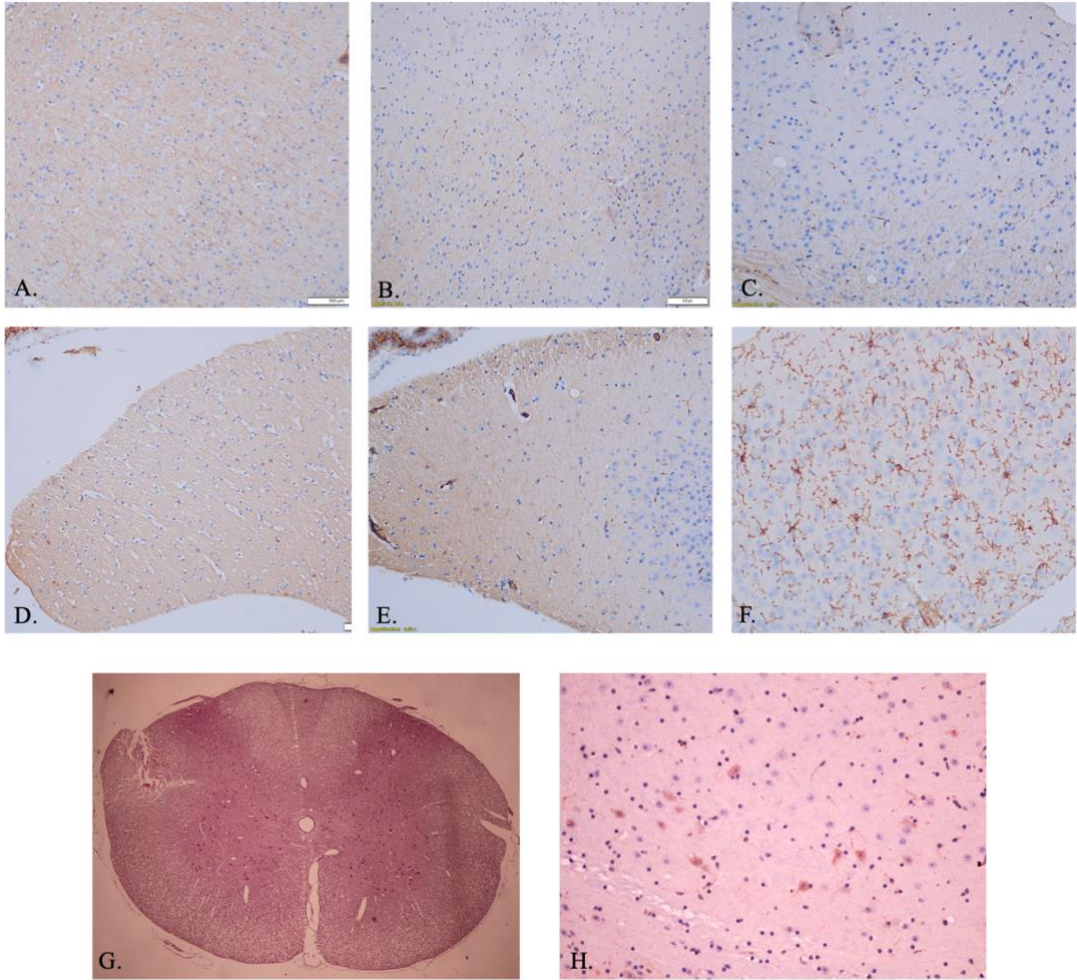
Von Frey Filamanı testinde mekanik allodiniye yol açacak en ince filamanın gram cinsinden ağırlığı belirlenmiştir. ANOVA analizi sonuçları, gruplar arasında anlamlı farklar olduğunu göstermektedir ($F(2, 12) = 60,60$; $p < 0,001$; $R^2 = 0.9099$). Kuprizonlu grubun ($0,56 \pm 0,18g$) ve çift indüksiyon alan grubun ($0,37 \pm 0,21g$) ortalama değerleri kontrol gruptan ($1,64 \pm 0,17g$) düşüktür ($p < 0,001$). (Şekil 5-24).



Şekil 5-24. Von Frey Filamanı testi sonuçları. Kontrol grubunun (Cont) ortalama mekanik allodini eşığı kuprizonlu grubun (Cup) ve çift indükdiyön alan grubun (CupTH) ortalama mekanik allodini eşiginden anlamlı derecede yüksektir. ($p < 0.0001$). Ancak, kuprizon grubunun ortalama değeri ile çifte indüksiyon yapılan grubun ortalama değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Her bar ortalama±standart sapmayı göstermektedir. Çizgi ile birleştirilen barların karşılaştırılmaları sonucunda $p < 0,0001$ anlamlılık seviyesinde fark tespit edilmiştir.

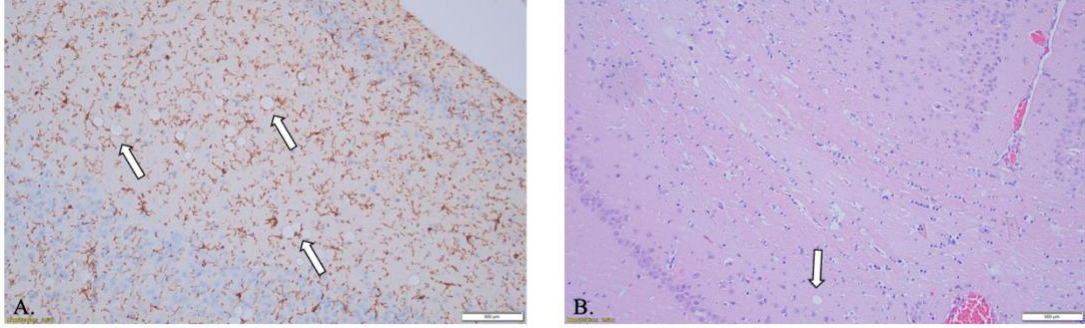
5.6.3. Histopatolojik Değerlendirme:

Beyin ve omurilik kesitleri hematoksilin&eoazin(H&E), miyelin basic protein (MBP), LY6G, CD3, PAX5 ve CD11b ile boyanmıştır (Şekil 5-25). Kuprizon diyeti alan farelerin beyinlerinde, subkortikal sahada vakuol formasyonları görülmüştür (Şekil 5-26). PAX5 boyaması ile kuprizonlu diyet alan grupta ve çift induksiyon yapılan farelerde talamik hipotalamik bileşkede hafif düzeyde artmış B lenfositler tespit edilmiştir. PAX5 ile boyanan alanlarda ender CD3 pozitifliği görülmüştür.



Şekil 5-25. Beyin ve omurilik kesitleri. Subkortikal alan MBP boyamasıyla **A.** Kontrol grupta normal sınırlarda miyelin miktarı, **B.** Kuprizonlu diyet alan grupta orta dereceli ve **C.** Kuprizonlu diyet ile T hücre enjeksiyonu uygulanan grupta ileri düzeyde demiyelinizasyon saptanmıştır. Fimbiyanın MBP boyamasıyla **D.** Kontrol grupta normal sınırlarda miyelin miktarı ve **E.** Kuprizonlu diyet alan grupta orta dereceli

demyelinizasyon olduğu görülmüştür. **F.** Subkortikal alan CD11b boyamasıyla aran sayıda mikroglialar izlenmiştir. **G.** Omurilik H&E boyaması **H.** Subkortikal alanda LY6G boyaması ile nötrofil saptanmıştır.



Şekil 5-26. Kuprizon diyeti alan farelerde vakuol formasyonları Subkortikal alanda MBP (A) ve H&E (B) ile boyanan kesitlerde vakuol saptanmıştır.

Miyelin Basic Protein (MBP) Boyama Sonuçları:

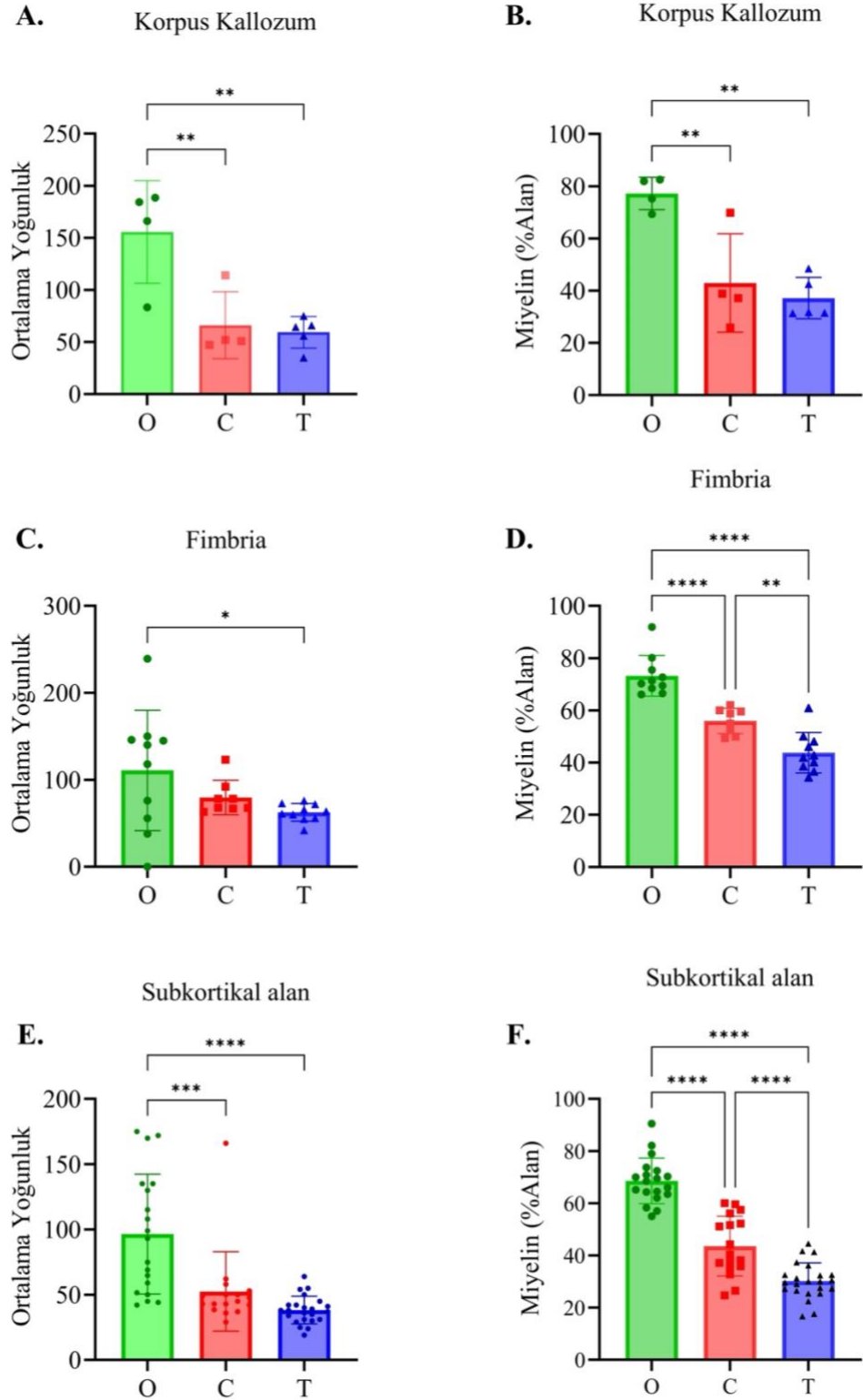
Üç fare grubu arasında klinik açıdan fark olduğu görüldükten sonra histopatolojik korelasyonunu değerlendirmek amacıyla hayvanlar kurban edilmiş ve beyin, omurilik, dalak diseksiyonları yapılmıştır. Preparatlar immünohistokimya boyama ile incelenmiştir. MBP ile boyanan ‘alan’ ve boyamanın ‘yoğunluğu’ değerlendirilmiştir. Kontrol grup, kuprizonlu diyet alan grup ve çift indüksiyon yapılan grup tek yönlü ANOVA ile karşılaştırılmıştır. Post-hoc analizlerde Tukey testi kullanılmıştır.

Korpus kallozumun ortalama MBP yoğunluğu ve MBP ile boyanan alan yüzdesi gruplar arasında fark olduğunu göstermiştir (sırasıyla $p=0,003$; $p=0,001$). Kontrol grubunun korpus kallozumundaki miyelin yoğunluğu, kuprizonlu grup ve çift indüksiyonlu gruba göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,009$; $p=0,004$). (Şekil 5-27.A). MBP boyanan alan oranı ise kontrol grupta ($77,22\pm 8,45$), kuprizonlu diyet alan fare grubundan ($42,92\pm 8,46$) ve çift indüksiyon uygulanan gruptan ($37,15\pm 8,024$) yüksek saptanmıştır (Sırasıyla $p=0,005$; $p=0,001$). Kuprizonlu grup ile çift indüksiyon uygulanan grup arasında fark bulunmamıştır ($p=0,78$) (Şekil 5-27.B).

Fimbriadaki MBP yoğunluğu ve MBP boyanan alan oranı çift indüksiyon alan grupta kontrol gruba göre düşük saptanmıştır (sırasıyla $p=0,04$ ve $p<0,001$) (**Şekil 5-27.C, D**). Ayrıca fimbriada MBP boyalı alan yüzdesi kuprizonlu grupta (55.92 ± 5.00) kontrol gruba göre (73.23 ± 8.13) düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

Subkortikal bölgedeki miyelinle kaplı alan ve miyelin yoğunluğu çift indüksiyon alan grupta ve kuprizonlu grupta kontrole göre düşüktür. Ayrıca T lenfosit indüksiyonu eklendiğinde miyelin boyanan alanın kuprizonlu gruba göre daha da düştüğü tespit edilmiştir (**Şekil 5-27.E,F**).

Bununla birlikte, kesitler mikroskop altında değerlendirilerek miyelin kaybı açısından skorlanmıştır. Mikroskop incelemesinde miyelin kaybının hiç görülmediği grup 0, tama yakın miyelin kaybı olan grup 3 ile puanlanmıştır. Total alanın üçte biri kadar demiyelinizasyon görülen kesite 1, üçte ikisi kadar demiyelinizasyon olduğu görülen kesite 2 puan verilmiştir. Sadece kuprizonlu diyet alan grupta ortalama skor 2,5 iken hem kuprizonlu diyet hem T lenfosit enjeksiyonu alan grupta ortalama skor 2,8 olarak belirlenmiştir.

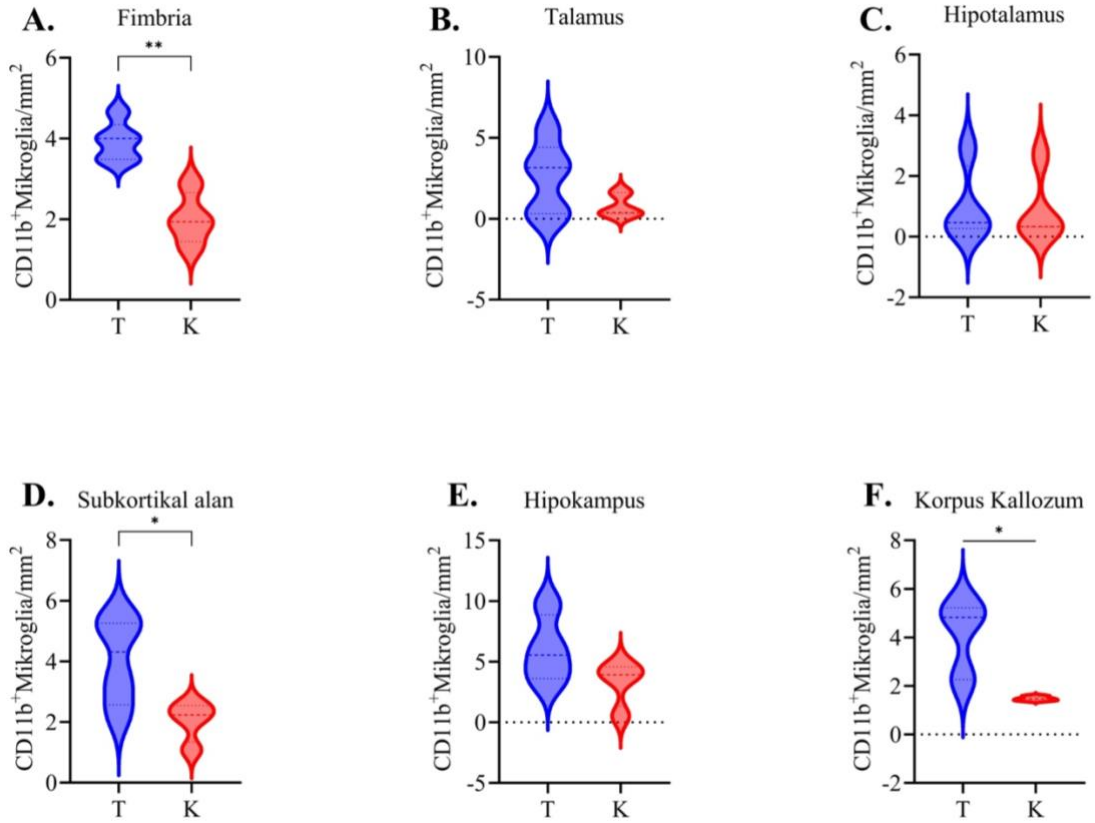


Şekil 5-27. Farklı Deney Gruplarında Demiyelinizasyon Şekildeki grafikler, kontrol grubunda (O), kuprizonlu yemle beslenen grupta (C) ve çift indüksiyon verilen grupta (T) korpus kallozum, fimbria ve subkortikal beyin alanlarında ölçülen ortalama miyelin yoğunluklarını ve miyelin kaplı alan oranını (%) göstermektedir. **A. Korpus**

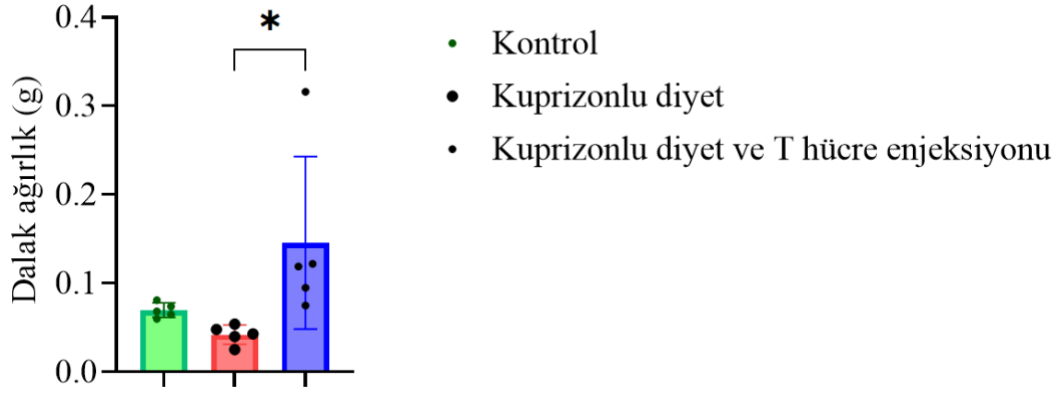
kallozumda ölçülen ortalama miyelin yoğunluğu. Kuprizonlu grupta ve çift indüksiyon alan grupta kontrole göre düşük saptanmıştır **B. Korpus kallozumda miyelinin kapladığı alan yüzdesi.** Kuprizonlu grupta ve çift indüksiyon alan grupta kontrole göre düşük saptanmıştır **C. Fimbriada ölçülen ortalama miyelin yoğunluğu.** Çift indüksiyon alan grupta kontrole göre düşüktür. **D. Fimbria bölgesinde miyelinin kapladığı alan yüzdesi.** Çift indüksiyon alan grup, kuprizonlu grup ve kontrol arasında belirgin fark saptanmıştır. **E. Subkortikal alanlarda ölçülen ortalama miyelin yoğunluğu.** Kuprizonlu grupta ve çift indüksiyon alan grupta kontrole göre düşük saptanmıştır **F. Subkortikal alanlarda miyelinin kapladığı alan yüzdesi.** Çift indüksiyon alan grup, kuprizonlu grup ve kontrol arasında belirgin fark saptanmıştır. Gruplar tek yönlü ANOVA ile karşılaştırılmıştır ve post-hoc analizlerde Tukey testi kullanılmıştır. Grafiklerdeki barlar bireysel ölçümleri ve ortalama değerleri standart sapma ile birlikte içermektedir.

CD11b Boyama Sonuçları:

Her görüntüde 20X büyütmede CD11b+ mikroglialar manuel olarak sayılmıştır. Piksel²-mm² dönüşümü yapılarak hücre/mm² cinsinden sonuç elde edilmiştir. Kuprizonlu diyet alan grup ve çift indüksiyon uygulanan grup, bağımsız örneklem T testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, değerlendirilen tüm sahalarda çift indüksiyon uygulanan grubun mikroglia sayısının kuprizonlu gruptan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu fark, fimbria, subkortikal alan ve korpus kallozumda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p<0,001; p<0,05 ve p<0,05)



Şekil 5-28. Farklı Beyin Bölgelerinde CD11b+ Mikroglia Yoğunluklarının Gruplar Arasında Karşılaştırılması. Farklı beyin bölgelerinde 1 mm²'deki CD11b+ mikroglia sayılarının gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren violin grafikleri. **A. Fimbriada**, çift indüksiyon grubunun (T) mikroglia yoğunluğu kuprizon diyeti alan gruptan (K) yüksektir (**p<0,01). **B. Talamusta**, iki grup arasında fark bulunmamıştır (p>0,05). **C. Hipotalamusta** gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05). **D. Subkortikal alanda** çift indüksiyon alan grubun (T) mikroglia sayısı kuprizonlu gruba (K) göre yüksek saptanmıştır (*p<0,05). **E. Hipokampusta**, iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05). **F. Korpus kallozumda**, çift indüksiyon alan grubun (T) mikroglia sayısı kuprizonlu gruba (K) göre yüksek bulunmuştur (*:p<0,05). Veriler, ortalama ve standart sapma ile gösterilmiştir. Grup başına n=4'tür.



Şekil 5-30. Farklı deney gruplarında dalak ağırlıklarının karşılaştırılması. Gruplar arasında karşılaştırma tek yönlü ANOVA ve post hoc analizler Tukey testi ile yapılmıştır. Barlar ortalama±standart sapmayı ve * $p < 0,05$ göstermektedir.

6. TARTIŞMA:

Çalışmamızın önemli bulguları şu şekildedir: i) Elde edildiği kaynaktan ve antijen özgüllüğünden bağımsız olarak aktivasyon T lenfositlerin merkezi sinir sistemine yönelimini diğer organlardan fazla artırır ve bu lenfositler MSS dokusuna geçebilir ii) Kuprizonla uyarılmış toksik demiyelinizasyon bu göçü artırır. iii) CD3 ve IL-2 ile özgül olmayacak şekilde aktive edilmiş periferal T lenfositler oligodendrosit hasarı başlamış bir sistemde belirgin spesifik T lenfosit yanıtı olmadan da demiyelinizasyonunu artırır.

Deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) modelinde kliniğin ve histopatolojik değişikliklerin ortaya çıkması için, merkezi sinir sistemi antijenlerine karşı aktive edilmiş T lenfositlerin tek başına yeterli olmadığı literatürde gösterilmiştir [116]. MSS’de DOE’de görülen kontrolden çıkmış inflamasyonun başlatıcısı spesifik antijenlere karşı uyarılmış T lenfositlerdir. Ancak DOE modelinde beyinde saptanan toplam lenfosit miktarı, MOG antijeniyle indüklenerek patolojiyi başlatan T lenfositlerden fazladır.

Literatürde, nonspesifik T lenfositlerin, MBP gibi antijenlere karşı aktive edilmiş T lenfositler ile birlikte uygulandıklarında MSS’e geçebildiğini ve DOE oluşumunu artırdığını farklı yönlerle kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. Ludowyk ve ark. ovalbumin antijenine karşı aktive edilmiş T lenfositlerin, ensefalitojenik T lenfositlerle birlikte verildiğinde omuriliğe yerleşebildiğini, ancak tek başına verildiklerinde bunun mümkün olmadığını floresan mikroskopi ile yaptıkları çalışmalarında göstermiştir[252]. Böylelikle, nonspesifik olarak aktive edilmiş T lenfositlerin antijene spesifik T lenfosit cevabı varlığında omuriliğe gidebildiğini histopatolojik olarak kanıtlamıştır.

Jones ve ark. 8 haftalık ve kemik iliği radyasyonla ortadan kaldırılmış SJL farelerine iki grup halinde MBP’e spesifik T lenfosit enjeksiyonu uygulamıştır. Bu gruplardan bir tanesine, enjeksiyondan bir hafta önce hiç CD3+ T hücre içermeyen kemik iliği, diğer gruba ise sadece ovalbumine karşı reaktif T hücrelerin bulunduğu kemik iliği hücrelerini transfer etmiştir. İki grupta da DOE kliniğinin geliştiğini, ancak ensefalojenik indüksiyon uygulamadan önce ovalbumine reaktif T hücrelerin nakledildiği farelerde hastalığın daha erken ve daha şiddetli geliştiğini göstermiştir. Ayrıca bu grupta DOE oluşturmak için gereken MBP reaktif T lenfosit sayısı da daha

düşük bulunmuştur. Transkriptomik çalışmalar sonucunda bu durumu, spesifik olmayan T lenfositlerin, MSS'deki antijen sunan hücrelerin etkinliğini artırması ile açıklamışlardır[253].

Lee ve ark. ise CD4+ hafıza T hücrelerinin antijen spesifik olmasa dahi, özgül T lenfosit yanıtını kuvvetlendirebildiğini göstermiştir. Böylece DOE oluşumunda bystander aktivasyonu daha önce bilinmeyen CD4+ hafıza hücrelerinin bu rolünü ortaya koymuştur. Bu çalışmada iki basamaklı yaklaşım yer almaktadır. İlk olarak MOG antijenine spesifik naif T lenfositler ve MOG antijenine duyarlılığı olmayan naif T lenfositleri ayrı ayrı ve beraber olarak farelere enjekte etmiştir. MOG'a duyarlılık göstermeyen naif T lenfositlerin uygulandığı farelerin omuriliklerinde histopatolojik değişikliğin olmadığını, MOG'a duyarlı naif T lenfositlerin uygulandığı farelerde demiyelinizasyonun geliştiğini ve bu iki hücre grubunun birlikte verildiği farelerde demiyelinizasyonun şiddetlendiğini kanıtlamıştır. Böylece, nonspesifik dahi olsa periferde T lenfosit yanıtı arttığında özgül T lenfositlerin etkinliğinin de arttığını göstermiştir. İkinci basamakta MOG'a özgü naif T lenfositlerin yanıtını IL-1 ile uyarılmış CD4+ bellek T lenfositlerinin arttırdığını bulmuştur [143].

Çalışmamızdaki temel hipotez bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Biz de deneylerimizin sonucunda, özgül olmayan bir uyarımla aktive edilmiş T lenfositlerin MSS'de demiyelinizasyona yol açtığını göstermiş bulunmaktayız. Ancak atıfta bulunulan çalışmaların hepsi, özgül olmayan aktif periferik T lenfositlerin etkisini belirli bir MSS antijenine reaktif T lenfositlerle birlikte uygulandığı deney koşullarında incelemiştir. Deneylerimizde antijene yönelik bir uyarım yapılmamıştır ve bu yönüyle literatürdeki çalışmalara farklı bir bakış açısı kazandıracağı düşünülmektedir. Ayrıca bu etki kupizon toksisitesi gibi primer hasar varlığında çalışılmıştır. Böylelikle, MS patofizyolojisinde yeri olan iki hipotezin birlikte temsil edilmesi sağlanarak bu iki hipotezin de hastalığın oluşmasında beraber etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu çalışmalar, deney başarısını omurilikteki histopatolojik değişiklikler ve buna bağlı klinik hastalık skorlarıyla değerlendirmiştir. Çalışmamız, özgül olmayan T lenfositlerin beyinde de benzer şekilde impaktının olduğunu kanıtlaması yönüyle de inovatif bir farklılık göstermektedir. Farelerden toplanan T lenfositlerin aktivasyonu CD4+ ve CD8+ T lenfositler için ayrı ayrı değerlendirilmiş ancak modelde bu iki popülasyon birlikte uygulanmıştır. Özellikle CD4+ T

lenfositlerin IL-2 etkisinde özgül olmayan bir aktivasyona açık olduğu bilinmektedir. Çalışmada kullanılan T lenfositlerin uyarım somrasında yüksek CD25 ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca CD44+ T lenfositlerin özellikle CD8+ hafıza T hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir[143, 254, 255]. Çalışmamızda uyarılmış T lenfosit popülasyonunda yüksek CD44 ifadesi de sağlanmıştır.

Tartışılan çalışmalar, özgül olmayan T lenfositlerin MSS'deki etkisini pür immünolojik temelde incelemiştir. Literatürde merkezi sinir sistemi içerisinde başlayan demiyelinizasyonun periferden gelen ve özgül olmayacak şekilde aktive edilmiş T lenfositler tarafından nasıl yönlendirildiğine dair çok sınırlı bilgi mevcuttur. Bu çalışmada, bazalde spesifik bir immün aktivasyonun eşlik etmediği kuprizonlu toksik demiyelinizasyon modelinde periferal özgül olmayacak şekilde uyarılmış T lenfositlerin MSS'deki demiyelinizasyona hem histopatolojik hem klinik düzeyde katkı sağladığı gösterilmiştir.

Bu bağlamda kuprizon ve özgül olmayacak şekilde aktive edilmiş T lenfositlerin çift indüksiyon şeklinde uygulandığı modele yakından bakmak gerekmektedir.

Kuprizon, farelere diyet yoluyla uygulanabildiği ve pelletlerdeki derişimi değıştikçe demiyelinizasyona olan direkt etkisi nedeniyle uygulaması kolay bir çalışma protokolüne sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle literatürde kullanımı yaygındır[256]. Etkisi hızlı başlar. Difteri toksininin ifadesiyle çalışan diğer toksik modellere göre sistemik yan etkisi daha azdır ve çalışma süresince mortalite oranı daha düşük görülür. Bu durum, özellikle uzun süreli deneylerde tercih edilme sebebi olarak görülmektedir. Ayrıca, kuprizonlu toksik demiyelinizasyon modelinde MSS inflamasyonunun görülebilmesi, MS'in daha fizyolojik koşullarda çalışılmasını sağlar. Kuprizon modeli, diğer farmakolojik veya genetik müdahalelerle kombine edilebilir[236]. Bu nedenlerle, nonspesifik olarak aktifleştirilmiş T lenfositlerin ikinci indüksiyon olarak ekleneceği çalışmamızda, toksik demiyelinizasyonun amacıyla kuprizon tercih edilmiştir. Nitekim, deney süresince sadece kuprizon diyeti uygulanan farelerde mortalite görülmemiştir.

Deneylerde kuprizon oral olarak uygulanmış ve yem formu pellet olarak belirlenmiştir. Literatürde, kuprizonun farklı uygulama yollarının deney başarısını etkilediği bildirilmiştir. Pellet formunda uygulanan diyetin, toz yem formuna göre

özellikle erken dönemde deney başarısını artırdığı ve diyetin zamansal dalgalanma gösterebilecek etkilerini en düşük düzeye indirdiği gösterilmiştir [257]. Ayrıca yemin pellet formunda uygulanması, inhalasyon yoluyla aynı ortamda bulunan kontrol farelerin toz formundaki yemden etkilenmesini de önlemiştir. Önemli bir nokta, nörotoksinin çıkarılmasından 4 gün sonra spontan remiyelinizasyonun meydana geldiğinin rapor edilmesidir [258]. Bu nedenle, çalışma boyunca kuprizonlu diyet uygulaması devam ettirilmiştir.

Kuprizonun oral tüketilmesine bağlı değişiklikler ilk olarak birkaç gün içinde ortaya çıkar. Oligodendrosit hasarına bağlı demiyelinizasyon en erken 3. haftada belirginleşir. Global demiyelinizasyon 6. Haftada beklenir. 12 hafta ve üzerinde kuprizon mağruzietü kronik demiyelinizasyona yol açar. Kuprizonla indüklenen toksik demiyelinizasyona 2 siklus halinde remiyelinizasyon eşlik eder. İlk remiyelinizasyon daha etkili iken 10-12 hafta dolaylarında gerçekleşen daha sınırlı bir katkıya sahiptir[259]. Akut demiyelinizasyon çalışmalarında 5 haftalık, kronik demiyelinizasyon çalışmalarında ise en az 12 haftalık kuprizon uygulaması önerilmektedir[260]. Çalışmamızın ilk basamağında kuprizonun farelerdeki etkileri inspeksiyonla takip edilmiştir. DOE skorundaki düşük şiddette değişikliklerin ve gruplar arasındaki ağırlık farklarının belirgin hale geldiği 8. haftanın sonunda sakrifikasyon yapılmıştır. Literatürde benzer şekilde 8 haftalık protokolün uygulandığı çalışmalar mevcuttur[261]. Kuprizon ve T lenfosit enjeksiyonu uygulamalarının birlikte yer aldığı son basamakta kronik demiyelinizasyon hedeflendiği için bu süre 16 hafta olarak belirlenmiştir. En yaygın kullanılan protokole uygun olarak, çalışmamızda %0,2'lik kuprizon içeren diyet uygulanmıştır. 2008'de Lindner ve arkadaşları, kuprizon dozunun %0,3'e çıkarılmasıyla yüksek düzeyde demiyelinizasyon elde edilebileceğini göstermiştir Ancak, kuprizon konsantrasyonu arttıkça (%0,2'den %0,3'e), ölüm oranı <%5'ten %10 veya %15'in üzerine çıkmaktadır Bu nedenle, %0,2 kuprizon, geniş demiyelinizasyon oluştururken daha az yan etki ürettiği için tercih edilen konsantrasyondur[258]. Genç yaş, MS ve diğer MSS demiyelinizan hastalıkları için risk faktörüdür[262]. Bu nedenle çalışmamızda 18-20 gr ağırlıkta 6-8 haftalık genç fareler kullanılmıştır[263]. C57BL/6 fare grubu, SJL suşu gibi diğer suşlara göre kuprizonla indüklenecek demiyelinizasyona yatkındır[264]. Yaygın ve kolay ulaşılabilir bir suş olması nedeniyle C57BL/6 fareler tercih edilmiştir.

Çalışmamızda, 6-8 haftalık farelerle yapılan deneylerde kuprizonun kilo almayı azaltan etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ancak kuprizonlu diyetle beslenen farelerin günlük yem tüketim miktarı kontrol grup ile benzer bulunmuştur ($p<0,05$). Bu değerlendirme ile farelerin yem yemekten kaçınma davranışı göstermediği ve iki grup arasındaki farkın bu sebepten kaynaklanmadığı kanıtlanmıştır. Literatürde de benzer şekilde kuprizonlu diyet alan farelerin kontrol gruba göre daha az kilo aldığı veya ağırlıklarının bazal değere göre düştüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak çalışmamızda olduğu gibi yaygın demiyelinizasyonun sağlandığı gösterilen deney gruplarında bile bazale göre kilo kaybının görülmemesi nedeniyle, kilo kaybının ve/veya kayıp miktarının deney başarısı ile ilişkilendirilemeyeceği düşünülmektedir [265]. Zhen ve arkadaşları, kuprizonun gavaj yoluyla uygulanmasının deney başarısına etkisini değerlendirmiştir. Fareler arasında toksik demiyelinizasyonun daha homojen olduğunu gösteren bu çalışmada da, %1'lik kuprizonlu yem dışındaki formülasyonları alan fare gruplarında farklı miktarlarda da olsa kilo artışı olduğu saptanmıştır[266]. Ayrıca kuprizon mağruziyeti olan gruplarımızda rektal prolapsus yaygın olarak tespit edilmiştir. Bu farelerde yapılan parazit testleri negatif saptanmıştır. Faggin ve arkadaşları, 4 hafta boyunca kuprizonlu diyetle beslenen farelerde Nörolojik defisitler ve davranış değişiklikleri ortaya çıkmadan önce gastrointestinal motilitenin bozulduğunu saptamıştır. Bu farelerde yapılan histopatolojik çalışmalar, enterik pleksusta inflamatuvar süreçlerin eşlik ettiği nörodejenerasyonun olduğunu kanıtlamıştır [267].

Literatürde, kuprizonun oral yolla tek başına uygulandığında meydana gelen değişiklikleri inceleyen çalışmalar olduğu gibi[266], kan-beyin bariyerini açmak için pertussis toksini ve bağışıklık yanıtını güçlendirmek için Freund adjuvanı kullanılan çalışmalar da mevcuttur[268]. Çalışmamızda, literatürde bildirilen etkin dozda (400 mg/kg/gün)[268] kuprizon tüketen ve pertussis toksin ya da Freud adjuvanı kullanılmadan gerçekleştirilen protokol sonunda farelerde toksik demiyelinizasyonun, lokal inflamasyonun ve klinik değişikliklerin görüldüğü kanıtlanmıştır. İlk deney grubunda MBP/DAPI oranının kuprizonla 8 hafta boyunca beslenen farelerde kontrole göre azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca son deney grubunda yapılan immünohistokimya boyamalarında, korpus kallozum, hipokampus, fimbria ve subkortikal alanda kontrol gruba göre belirgin demiyelinizasyon saptanmıştır. H&E ve MBP boyamalarında

özellikle subkortikal sahadan ve hipokampüsten alınan kesitlerde görülen vakuol formasyonu oligodendrosit harabiyetinin gerçekleştiğinin diğer bir kanıtıdır [269].

On altı hafta boyunca kuprizonlu diyet alan farelerde demiyelinizasyon en belirgin olarak korpus kallozum, subkortikal alan, hipokampus ve fimbriada saptanmıştır. Korpus kallozumdaki miyelinin toplam alana oranı, kuprizonla indüklenen miyelin kaybını saptamak için literatürde yaygın olarak kullanılan bir parametredir [270, 271]. Kuprizonun demiyelinizan etkisi, farklı fare suşlarında birbirinden farklı özelliklere sahiptir. Öyle ki, demiyelinizasyon C57B/6 farelerde korpus kallozumun medialinde lateraline göre daha yoğun görülür. SJL farelerde ise lateralden mediale azalan bir etkilenme gösterilmiştir[264]. Çalışmamızda da, korpus kallozumun demiyelinizasyonu orta hatta daha yoğun görülmüştür. Sen ve arkadaşları ise C57B/6 ile yaptığı toksik demiyelinizasyon çalışmasında korpus kallozumun mediali ve laterali arasında fark saptamamıştır[272]. Roufagalas ve arkadaşları, proksimal hipokampüste distale göre daha belirgin demiyelinizasyon olduğunu göstermiştir[273]. Ancak çalışmamızda distal hipokampusün proksimale göre daha çok etkilendiği görülmüştür. Çift indüksiyon uygulanan farelerin kesitlerinde ise incelenen tüm alanlarda tama yakın kayıp saptanmıştır.

Locatelli ve arkadaşları, toksik demiyelinizasyona eşlik eden mikroglia artışının olduğunu kanıtlamıştır. Ancak MSS'de bu artışa eşlik eden periferal immün sistem kökenli bir inflamasyon saptamamıştır[274]. Çalışmamızda, H&E boyaması ile kuprizonlu diyet alan farelerde fokal lenfosit kümelenmeleri ender olarak görülmüştür. Ayrıca T lenfosit uygulanan iki farede LY6G ile boyanmış nötrofiller tespit edilmiştir. Dolayısıyla, çalışmamızdaki bulgular, kuprizon uygulanan farelerde oligodendrosit harabiyetinin çoğunlukla lokal bir inflamasyon ile birlikte olduğunu ve periferal bağışıklık sistemi hücrelerinin bu inflamasyona değişik seviyelerde katıldığını kanıtlar niteliktedir [275]. Literatürde lenfosit infiltrasyonunun görülmediği toksik demiyelinizasyon modellerinde, toksisiteye mağruziyet süresi çalışmamıza göre daha kısadır. Çalışmamızda beslenmeye uzun süre (16 hafta) devam etmenin daha belirgin immün yanıtı yol açtığı düşünülmüştür.

Çalışmamızın histopatolojik değerlendirmelerinde ayrıca B lenfositler de kuprizonlu diyet alan grupta ve çift indüksiyon alan farelerin beyinlerinde fokal olarak saptanmıştır. Avşar ve ark. kuprizon toksisitesinde gelişen toksik demiyelinizasyona

B lenfositlerin eşlik ettiğini ve kuprizon etkisi ortadan kalktığında azaldığını göstermiştir[276].

Kuprizonun sistemik yan etkileri arasında T lenfosit aktivasyonunun baskılanması yer alabilir. Bu durum, deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) deneylerinde kuprizon kullanıldığında hastalık şiddetini azaltabilir. Kuprizonun DOE üzerindeki etkisi yalnızca T lenfosit aktivitesini değiştirmesiyle açıklanamaz. DOE oluşturmak için ensefalitojenin verilmesinden bir hafta önce başlanan kuprizon diyeti, T lenfosit etkinliğini düşürerek klinik hastalığın ortaya çıkmasını baskılar. Ancak, diyete 4 hafta önce başlandığında bu etki ortadan kalkar. Kuprizonun diğer organlar üzerindeki sistemik yan etkileri farelerin düşkünlüğünü artırarak hastalığa yatkın hale getirerek bu sonuca neden olduğu ileri sürülmüştür[277]. Sen ve ark. 5 hafta kuprizonlu yem ile beslenen ve kan beyin bariyerinin açılması için pertussis toksinin uygulandığı farelerin beyin kesitlerinde T lenfosit tespit edememiştir[272]. Bu durum, kuprizonun uygulandığı süre ile ilişkili olabilir. Nitekim aynı çalışmada dalak atrofisi ve dalak kesitlerinin immünohistokimyasal boyamalarıyla CD4+ veya CD8 lenfosit miktarında azalma saptanmıştır. Çalışmamızda kuprizonlu diyet alan gruptaki farelerin dalak ağırlıkları kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışmamızda, kuprizonun periferal immün sistem üzerindeki yan etkileri, periferal immün sistemin göreceli olarak dışlandığı durumlarda beyindeki lokal inflamasyonun büyüklüğünü değerlendirmek için bir araç olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu durumda dahi histopatolojik çalışmalarımızda, beyinde CD3 ile boyanan T lenfositin hafif düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır. Çift indüksiyon gruplarında ise in vitro olarak uyarılmış sağlıklı lenfositler farelere enjekte edilmiş ve böylece deney grupları için benzer periferal immün sistem koşulları oluşturulmuştur. Biyodağılım deneyleri enjeksiyondan sonraki 16. saatte yapıldığı için kuprizonun etkisinin en düşük düzeyde tutulması sağlanmıştır. Ayrıca tekrarlı T lenfosit enjeksiyonu yapılan deney grubunda da, enjeksiyonlar 96 saatte bir uygulandığı için sonuçlar kuprizonun olası etkilerinden arındırılmıştır.

Kuprizon ile beslenen farelerin ince bilişsel ve motor bozukluklar gösterdiği bildirilmiştir. Bu modeldeki hayvanlar, sınırlı omurilik patolojisi nedeniyle ciddi motor bozukluklar yaşamazlar ve bu, erken MS semptomlarına oldukça benzer [278]. Kuprizon modelinde yapılan literatürdeki çalışmalar, fare beyinlerinde

demiyelinizasyon ve davranış bozukluğunun birlikte görüldüğünü bildirmiştir [279]. Ancak davranış bozukluğu terimi, kuprizonun kendisinden kaynaklı 'nöropsikiyatrik yan etkiler' ve 'pür nörolojik etkiler' olarak iki başlık altında değerlendirilmelidir. DOE skorunun belirgin motor defisite odaklanması nedeniyle kuprizon modelinde ayırt edici test etme potansiyeline sahip olmaması, araştırmacıları, Nörolojik etkileri gözlemlemek üzere davranış deneyleri uygulamaya yönlendirmiştir [280].

DOE skoru, temel olarak motor kuvvet kaybı ve yürüme bozukluğu bulgularını değerlendirmesi yönüyle Multipl Skleroz hastalarını değerlendirmede sıkça kullanılan Genişletilmiş Özürlülük ve Durum Ölçeği (Expanded Disability Status Scale-EDSS) ile benzer özelliklere sahiptir. Periferal immün sistemin yoğun şekilde katıldığı merkezi sinir sistemi inflamasyonu, Multipl Skleroz hastalarında akut klinik ataklar şeklinde tezahür eder. Bu ataklarda görülen yürüme bozukluğu, duyu kaybı, inkontinans, görme disfonksiyonu EDSS puanında yükselmeye yol açar. Ancak Multipl Skleroz zamanla daha iyi anlaşılması ve hastalara getirdiği yükün bu semptomlarla sınırlı olmadığı görülmüştür. Gelişmiş uzun dönem tedaviler, önceki yıllara göre, son zamanlarda hastaların bu şekildeki semptomlarının kontrol altına alınmasını sağlamıştır. Yine de Multipl Sklerozlu bireyler, hastalık ilerledikçe eskiden sahip olduğu fonksiyonelliği kaybettiğini bildirmektedir. EDSS, kognitif fonksiyonlar, psikiyatrik patolojiler, yorgunluk ve duyu bozuklukları gibi kritik semptomları yeterince değerlendiremediği için, bu belirtileri belirgin şekilde gösteren hastalar, düşük EDSS skorları ile yanlış bir iyilik hali içinde değerlendirilebilir. Bu, hastalığın erken evrelerini ve hafif düzeyde progresyonunu değerlendirmede hassasiyet eksikliğine yol açmaktadır. Klinik-preklinik çalışmalar ile MS'in erken döneminin ve SPMS'in daha iyi tanınması, bu hasta grubunda görülen EDSS-klinik uyumsuzluğunu daha iyi anlamayı sağlamıştır. Halihazırda kullanılmakta olan EDSS skorlama sistemine yeni fonksiyonel testlerin dahil edilmesiyle 'EDSS-Plus' şeklinde yeni bir değerlendirme yaklaşımı önerilmiştir. EDSS Plus, klasik EDSS'ye ek olarak Zamanlı 25 Ayak Yürüme (T25FW) ve Dokuz Delikli Peg Testi (9HPT) gibi ek ölçümler içerir. Bu ek testler, motor yeteneklerin ve el becerilerinin değerlendirilmesinde daha ayrıntılı ve hassas bir ölçüm sağlar. Geleneksel EDSS, sadece genel bir engellilik derecesi sunarken, EDSS Plus, yürüme hızı ve el becerilerini de değerlendirdiği için hastalığın ilerleyişini daha kapsamlı bir şekilde tespit edebilir[281, 282].

DOE skoru da benzer şekilde, hareket kabiliyeti ve bu nedenle yürüme mesafesi azalan hayvanları değerlendirmede kullanıldığında yanlış çıkarımlara yol açabilir. Kuyruk kaslarında kuvvet kaybı olmayan, ancak düşük lokomasyon becerisi ve uzamış refleks yanıtları nedeniyle kafes içindeki üstünlük kurma mücadelesinde yeterince performans gösteremeyen veya allodinisi olan hayvanları değerlendirmede eksiklikler barındırabilir. Tarif edilen semptomların DOE skorunda karşılığı yoktur. Dolayısıyla, özellikle progresif MSS inflamasyonu ile seyreden DOE modellerinde yeni ölçütlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu klinik gözlemlerden yola çıkarak, fonksiyonel kaybı daha hassas saptayabilmek amacıyla deneylerimizdeki kinik değerlendirme protokolüne davranış deneyleri eklenmiştir.

Açık alan arena testi, farelerin lokomotor aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu testte lokomasyon fonksiyonu, "toplam katedilen mesafe" parametresi ile ölçülmüştür. Toplam katedilen mesafenin azalması, literatürde motor tutulumunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Motor kuvvet kaybı belirgin olmayan hayvanlarda bile bu parametrenin düşük bulunması, ince ve zor belirlenen motor tutulumunun ana göstergesi olabileceğine dair umut verici bulgular sunmaktadır[283]. Çalışmamızda çift indüksiyon uygulanan gruptaki toplam katedilen mesafe hem kontrol grup hem de kuprizonlu diyet alan gruba göre daha düşük saptanmıştır. Ek olarak, "maksimum hız" parametresi, testin değerlendirme yeterliliğini artırmak amacıyla eklenmiştir. Hem kuprizonlu grupta hem de çift indüksiyon alan grupta maksimum hız kontrole göre düşük saptanmıştır. Maksimum hız parametresinin azalması, hayvanların motor yeteneklerindeki zayıflamayı dolaylı olarak gösterebilmektedir[246].

"Karanlık alanda geçirilen süre" parametresi de çalışmamızda önemli bir yer tutmaktadır. Farelerin toksik veya inflamatuvar mekanizmalarla ortaya çıkan olası optik nörit semptomları, anksiyeteyi artırabilir veya hareket kabiliyetini kısıtlayabilir. Lokomasyonu değerlendiren parametrelerin bu durumdan etkilenip etkilenmediğini değerlendirmek için hayvanların karanlık alan tercihlerinde değişim olup olmadığı değerlendirilmiştir. Farelerin doğal davranışları gereği daha az aydınlık alanlarda bulunmayı tercih etmesi beklenmektedir[284]. Çalışmamızda karanlık alanda geçirilen sürenin, aydınlık alanda geçirilen süreye oranı yaklaşık 2,4 bulunmuştur. Görme disfonksiyonu sonucunda karanlık alan tercihindeki azalma bu değeri düşürecektir.

Ancak kontrol grubu ile diğer gruplar arasında fark görülmemiştir. Bu konuda literatürde doğrudan bir referans bulunmamakla birlikte, sonuçlarımızın bu yönde değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

"Merkezde geçirilen süre" parametresi, farelerin anksiyete-benzeri duygudurumlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Literatürde sıkça başvurulan bu test parametresi, farelerin merkezi alanlarda daha fazla zaman geçirmeleri durumunda anksiyete düzeylerinin düşük olduğu şeklinde yorumlanmaktadır[285]. Merkezde geçirilen sürenin artması, farelerin daha az anksiyeteli olduklarını göstermektedir. Çift indüksiyon uygulanan grubun merkezde geçirdiği süre, kuprizonlu diyet alan gruba ve kontrole göre azalmıştır. Ancak, bu parametre farelerin lokomotor kabiliyetinden de etkilenebileceği için anksiyeteyi değerlendirmede altın standart kabul edilen yükseltilmiş artı testi[286] de uygulanmış ve sonuçlar uyumlu bulunmuştur. Kuprizonlu diyet ile birlikte T lenfosit enjeksiyonu uygulanan deney grubunda anksiyete şiddeti kontrol gruba göre yüksek saptanmıştır. Sadece kuprizonlu diyet alan grupta da kontrol gruba göre anksiyete seviyesi yüksek bulunmuştur. Bu farkın anlamlılık derecesinin ($p=0,07$) daha fazla sayıda fare ile tekrarlanacak bir deneyde artacağı düşünülmektedir. Davranış deneylerinde saptanan anksiyete semptomunun, özellikle kuprizonlu diyet nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmüştür. Literatürde, kuprizon ile indüklenen şizofreni çalışmaları yer almaktadır. Ayrıca, kuprizonun sosyal davranışı da büyük ölçüde etkilediği bildirilmiştir[287].

Von Frey filaman testi, farelerin mekanik ağrı eşik değerlerini ve allodini düzeylerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Çift indüksiyon uygulanan grupta ve kuprizonlu diyet alan grupta allodini saptanmıştır. Olechowski ve ark. MOG antijeniyle aşılanan farelerde kronik ataklı bir DOE patolojisiyle birlikte, diğer nörolojik semptom ve bulgular gelişmeden önce nöropatik ağrı bulgularının ortaya çıktığını göstermiştir[288].

Çalışmamızda biyodağılım deneyleri ve histopatolojik boyamaların beraber kullanılması, patofizyolojik sürecin gelişiminde basamaklı bir takibi olanaklı kılmıştır. Sağlıklı farelerde yapılan biyodağılım çalışmalarında, özgül bir antijene karşı uyarılmış olmasa dahi aktif T lenfositlerin beyne ve omuriliğe geçebildiği gösterilmiştir. Kuprizonla indüklenen toksik demiyelinizasyon varlığında, pertussis toksin gibi kan beyin bariyerini açan ikinci bir etki olmadan dahi T lenfositlerin beyne

ve omuriliğe yöneliminin arttığı kanıtlanmıştır. Kuprizonlu diyet alan zayıf bir periferal immün sisteme sahip farelerde periferal bağışıklık yanıtın katkısı olmadan önce, oligodendrosit hasarına mikroglial reaksiyonun eşlik ettiği gösterilmiştir. Bu düşük şiddetteki inflamasyon ve bariz nörodejenerasyon durumunda farelerin davranış deneylerinde kontrol gruba göre daha kötü performans gösterdiği saptanmıştır. Periferik nonspesifik aktif T lenfositlerin MSS'deki demiyelinizasyonu ve lokal inflamasyonu artırması, periferik bağışıklık sistemi hücrelerinin beyne yönelimini artırması, farelerdeki Nörolojik tabloyu şiddetlendirmiştir. Ancak ataklarla seyreden MS'teki görülen ani motor kuvvet kaybı ve ataksi gibi değişiklikler DOE skoru ile yapılan değerlendirmelerde görülmemiştir. Fonksiyonel olarak müphem bir kötüleşmenin olmaması, ancak progresif kötüleşen ataksik yürüme ve lokomasyonda azalmanın bu histopatolojik bulgularla beraber görülmesi, modelin primer progresif Multipl Skleroz özellikleri gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Periferal yolla enjekte edilmiş T lenfositlerin organlara yönelimi değerlendirildiğinde, nonspesifik bir aktivasyonun bile MSS'e yönelimi diğer organlardan fazla artırması bu çalışmanın önemli bir diğer sonucudur. Biyodağılım deneylerinde enjeksiyondan sonraki 16. Saatte aktivasyondan bağımsız olarak en çok lenfosit birikimi dalak, karaciğer ve akciğerde görülmüştür. Biyodağılımı çalışılan lenfosit, tümör hücresi, mikrovezikül gibi örnekler intravenöz uygulandığında retikuloendotelial dokudan zengin organlarda birikir. Aktifleştirilmiş T lenfositlerin lenfoid organlara daha az yönelmesi ve dokularda birikme eğiliminde olması beklenen bir bulgudur[289]. Ancak hem sağlıklı hem kuprizonlu diyet almış hayvanlarda bu yönelimin MSS organlarında istatistiksel olarak anlamlı olarak artması, dikkat çekicidir.

Çalışmamızda hem sağlıklı farelerde hem de kuprizon diyeti alan grupta, periferal olarak enjekte edilen T lenfositlerin kaynağı, lenfosit alt tipi veya aktivasyon durumu fark etmeksizin beyne en az bir kere girebildiği gösterilmiştir. Enjeksiyondan 16 saat sonra yapılan biyodağılım deneylerinde hem naif hem de aktifleştirilmiş hücrelerin beyin ve omurilikte bulunduğu dair kanıtlar elde edilmiştir. Ayrıca,

aktifleştirilmiş T lenfositlerin spesifik bir MSS antijenine karşı olmadıkları da dikkat çekicidir. Hem CD4 hem de CD8 T lenfositleri MSS organlarında tespit edilmiştir. Ancak, tüm biyodağılım deneylerimiz enjeksiyon sonrası 16. saatte yapıldığından, bu veriler kesitsel bilgi sunmaktadır. Buna rağmen, bulgularımız literatürde T lenfositlerin beyne göçünün zamansal değişimini inceleyen diğer çalışmalarla uyumludur.

Hickley ve arkadaşlarının sağlıklı hayvanlarda T lenfositlerin MSS'ye göçüne etki eden faktörleri inceledikleri histopatolojik çalışmada, T hücrelerinin MSS'ye girişinde antijen spesifikliği, antijeni tanıma yeteneği ve MHC uyumluluğunun önemli faktörler olmadığı gösterilmiştir[116]. Bu çalışmada, hem CD4+ hem de CD8+ T lenfositler beyin kesitlerinde bulunmuştur. Ayrıca, MBP'ye karşı uyarılmış, Timus RT1B antijenine karşı uyarılmış, nonspesifik olarak aktifleştirilmiş ve naif olup hiçbir antijen spesifikliği taşımayan T lenfositler dört grup olarak incelenmiştir. Enjeksiyondan sonraki 1,5 saat içinde, aktifleştirilmiş gruplardaki T lenfositlerin beyne önemli ölçüde göç ettiği, ancak naif T lenfositlerin beyne daha az geçtiği gözlemlenmiştir. Özellikle, nonspesifik olarak aktifleştirilmiş T lenfositler en yüksek düzeye ulaşan grup olmuştur. MSS'de düzeyleri en erken (12. saatte) düşen grup naif T lenfositler iken, aktifleştirilmiş gruplardaki lenfositlerin 24. saat civarında MSS'den çıktığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, miyelin bazik proteine (MBP) karşı spesifik olarak aktifleştirilmiş T lenfositlerin 72. saatte tekrar beyne göç ettiği bulunmuştur. Çalışmamızda, özgül olmayan periferel T lenfositlerin etkisi araştırıldığı için MSS antijenlerine karşı aktifleştirilmiş T lenfosit grubuna yer verilmemiştir. Ancak, Hickley ve arkadaşlarının bulguları ile paralel olarak, enjeksiyondan 16 saat sonra sağlıklı hayvanlarda aktifleştirilmiş T lenfositler naif lenfositlerden daha yüksek miktarda olacak şekilde, iki grup da beyin ve omurilikte saptanmıştır. Öte yandan, farelerde kuprizonlu diyet uygulamaları öncesinde bazal kemik iliği üretimi radyasyon ile ortada kaldırılmadığı için, her ne kadar kuprizon etkisiyle zayıflamış bir yeteneğe sahip olsalar dahi, enjekte edilen T lenfositlerin beyne girişini artırıp artırmadığı da bilinmemektedir. Teorik olarak mümkün olan bu durum, muhtemelen sayı ve potans açısından önemsenmeyecek bir düzeyde olduğu düşünülmektedir.

T lenfositler lenfoid organlarda uyarıldıktan sonra santral hafıza T lenfositlere veya efektör hafıza T lenfositlere farklılaşabilir. Efektör hafıza T lenfositler dokulara

yayılarak daha önceden eğitildikleri antijen ile karşılaşırsa inflamatuvar yanıt başlatır. Hatta bu lenfositlerde, lenfoid organlara geri dönmeyi sağlayacak reseptörlerin kaybolduğu bilinmektedir. Santral hafıza T lenfositler ise lenfoid dokulara geri döner. Çalışmamızda, sağlıklı farelerin periferel dolaşımından toplanan T lenfositler CD-3 ve IL-2 ile uyarılmıştır. Bu iki uyarının efektör hafıza T lenfositlerini santral hafıza T lenfositlere göre daha fazla uyardığı bilinmektedir[290]. Aktivasyon kontrollerinde de efektör hafıza T lenfositlerde daha yoğun görülen CD44 ifadesinin yüksek olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, aktif T lenfosit grubundaki hücrelerin, diğer organlara ve MSS'e göçünün en az lenfoid organlar kadar olması beklenen bir durumdur. Çalışmamızda da, sağlıklı hayvanlarla yapılan biyodağılım deneylerinde, aktivasyonun özellikle omuriliğe yönelimi önemli ölçüde artırması, bu duruma bağlanmıştır.

Çalışmanın Eksiklikleri:

Çalışmamızda, T lenfositlerin, histopatolojik düzeyde demiyelinizasyonu ve lokal inflamasyonu artırdığı görülmüştür. Bu değişikliğe klinik parametrelerde bozulma da eşlik etmiştir. Özellikle açık alan arena testinde toplam katedilen mesafe parametresinde ve yükseltilmiş artı testinde açık kola geçiş sayısında azalma şeklinde bulgular saptanmıştır. Davranış deneylerindeki sonuçlar ve histopatolojik bulgular uyumludur. Nonspesifik aktif T lenfosit popülasyonunun sağlıklı hayvanlara uygulandığı bir grup bu deneyde yer almadığı için T lenfositlerin histopatolojik bulgulara ve davranış deneylerine olan ana etkisi değerlendirilememiştir. Ayrıca, davranış deneylerinin kesitsel uygulanması nedeniyle çift indüksiyon deney grubunda müphem nörolojik değişikliklerin en erken kaçınıcı doz T lenfosit enjeksiyonundan sonra anlamlı hale geldiği bu deney düzeneği ile saptanamamıştır. Locitelli ve ark. bu difteri toksini ile oligodendrosit ölümü indüklenmiş fare modelinde davranış değişikliklerinin ilk kez 5-6. Haftalarda meydana geldiğini bildirmiştir [274]. Çalışmamızda, motor defisiti yansıtan DOE skorundaki değişiklikler kuprizon uygulanan grupta 6. haftadan itibaren saptanmıştır. DOE skorunda artışın T hücre eklenen grupta 5. Enjeksiyondan sonra saptandığı ve bu skor değişikliklerinin dalgalanma gösterdiği görülmüştür.

7. KAYNAKLAR:

1. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. The Lancet, 2008. **372**(9648): p. 1502-1517.
2. Dobson, R. and G. Giovannoni, *Multiple sclerosis - a review*. Eur J Neurol, 2019. **26**(1): p. 27-40.
3. Lassmann, H., *Multiple Sclerosis Pathology*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(3).
4. Sherwin, A.L., *Multiple sclerosis in historical perspective*. McGill Med J, 1957. **26**(1): p. 39-48.
5. Firth, D., *The Case of Augustus d'Este (1794-1848): The First Account of Disseminated Sclerosis: (Section of the History of Medicine)*. Proc R Soc Med, 1941. **34**(7): p. 381-4.
6. Butler, M.A. and T.L. Bennett, *In Search of a Conceptualization of Multiple Sclerosis: A Historical Perspective*. Neuropsychology Review, 2003. **13**(2): p. 93-112.
7. Cruveilhier, J., *Anatomie pathologique du corps humain; ou, Descriptions, avec figures lithographiées et coloriées, des diverses altérations morbides dont le corps humain est susceptible*. 1842: Chez JB Baillière.
8. Charcot, J., *Histologie de la sclerose en plaques*. Gazette Hôpitaux, 1868. **41**: p. 554.
9. Rolak, L.A., *MS: the basic facts*. Clin Med Res, 2003. **1**(1): p. 61-2.
10. Baxter, A.G., *The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(11): p. 904-912.
11. Lublin, F., *History of modern multiple sclerosis therapy*. Journal of Neurology, 2005. **252**(3): p. iii3-iii9.
12. Gustavsson, A., et al., *Cost of disorders of the brain in Europe 2010*. Eur Neuropsychopharmacol, 2011. **21**(10): p. 718-79.
13. Bebo, B., et al., *The Economic Burden of Multiple Sclerosis in the United States: Estimate of Direct and Indirect Costs*. Neurology, 2022. **98**(18): p. e1810-e1817.
14. Endriz, J., P.P. Ho, and L. Steinman, *Time correlation between mononucleosis and initial symptoms of MS*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2017. **4**(3): p. e308.
15. Bjornevik, K., et al., *Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications*. Nat Rev Neurol, 2023. **19**(3): p. 160-171.
16. Fyfe, I., *T cells implicate Epstein-Barr virus in multiple sclerosis pathogenesis*. Nature Reviews Neurology, 2024. **20**(3): p. 133-133.
17. Baranzini, S.E. and J.R. Oksenberg, *The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years*. Trends Genet, 2017. **33**(12): p. 960-970.
18. McGinley, M.P., C.H. Goldschmidt, and A.D. Rae-Grant, *Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review*. Jama, 2021. **325**(8): p. 765-779.
19. Rae-Grant, A.D., et al., *Sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity*. Mult Scler, 1999. **5**(3): p. 179-83.
20. Dillon, B.E. and G.E. Lemack, *Urodynamics in the evaluation of the patient with multiple sclerosis: when are they helpful and how do we use them?* Urol Clin North Am, 2014. **41**(3): p. 439-44, ix.
21. Kale, N., *Optic neuritis as an early sign of multiple sclerosis*. Eye Brain, 2016. **8**: p. 195-202.
22. Kanchandani, R. and J.G. Howe, *Lhermitte's sign in multiple sclerosis: a clinical survey and review of the literature*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1982. **45**(4): p. 308-12.

23. Galetta, S.L., et al., *Acute optic neuritis: Unmet clinical needs and model for new therapies*. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2015. **2**(4): p. e135.
24. Benedict, R.H.B., et al., *Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical management, MRI, and therapeutic avenues*. *Lancet Neurol*, 2020. **19**(10): p. 860-871.
25. Lublin, F.D. and S.C. Reingold, *Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis*. *Neurology*, 1996. **46**(4): p. 907-11.
26. Mahad, D.H., B.D. Trapp, and H. Lassmann, *Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis*. *Lancet Neurol*, 2015. **14**(2): p. 183-93.
27. Zeydan, B. and O.H. Kantarci, *Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena*. *Neurol Clin*, 2018. **36**(1): p. 163-171.
28. Stys, P.K., et al., *Will the real multiple sclerosis please stand up?* *Nat Rev Neurosci*, 2012. **13**(7): p. 507-14.
29. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. *Lancet*, 2002. **359**(9313): p. 1221-31.
30. Barnett, M.H. and J.W. Prineas, *Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(4): p. 458-68.
31. Prineas, J.W., et al., *Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 2001. **50**(5): p. 646-57.
32. Thorpe, J.W., et al., *Serial gadolinium-enhanced MRI of the brain and spinal cord in early relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Neurology*, 1996. **46**(2): p. 373-8.
33. Bot, J.C. and F. Barkhof, *Spinal-cord MRI in multiple sclerosis: conventional and nonconventional MR techniques*. *Neuroimaging Clin N Am*, 2009. **19**(1): p. 81-99.
34. Rudick, R.A. and L. Kappos, *Measuring disability in relapsing-remitting MS*. *Neurology*, 2010. **75**(4): p. 296-7.
35. Miller, D., et al., *Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis*. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(5): p. 281-8.
36. Lebrun, C., et al., *Association between clinical conversion to multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome and magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid, and visual evoked potential: follow-up of 70 patients*. *Arch Neurol*, 2009. **66**(7): p. 841-6.
37. *Clinical demographics of multiplex families with multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Genetics Group*. *Ann Neurol*, 1998. **43**(4): p. 530-4.
38. Lassmann, H., W. Brück, and C.F. Lucchinetti, *The immunopathology of multiple sclerosis: an overview*. *Brain Pathol*, 2007. **17**(2): p. 210-8.
39. Kassmann, C.M., et al., *Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes*. *Nat Genet*, 2007. **39**(8): p. 969-76.
40. Kroner, A., et al., *PD-1 regulates neural damage in oligodendroglia-induced inflammation*. *PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4405.
41. Schumacher, G.A., 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**: p. 552-68.
42. Thompson, A.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. *Lancet Neurol*, 2018. **17**(2): p. 162-173.
43. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria*. *Ann Neurol*, 2011. **69**(2): p. 292-302.

44. Charil, A., et al., *MRI and the diagnosis of multiple sclerosis: expanding the concept of "no better explanation"*. *The Lancet. Neurology*, 2006. **5**(10): p. 841-852.
45. Rammohan, K.W., *Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis*. *Ann Indian Acad Neurol*, 2009. **12**(4): p. 246-53.
46. Kennedy, P.G.E., W. George, and X. Yu, *The elusive nature of the oligoclonal bands in multiple sclerosis*. *J Neurol*, 2024. **271**(1): p. 116-124.
47. Creel, D.J., *Visually evoked potentials*. *Handb Clin Neurol*, 2019. **160**: p. 501-522.
48. Klistorner, A. and S.L. Graham, *Role of Multifocal Visually Evoked Potential as a Biomarker of Demyelination, Spontaneous Remyelination, and Myelin Repair in Multiple Sclerosis*. *Frontiers in Neuroscience*, 2021. **15**.
49. Britze, J. and J.L. Frederiksen, *Optical coherence tomography in multiple sclerosis*. *Eye (Lond)*, 2018. **32**(5): p. 884-888.
50. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. *Neurology*, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
51. Cohen, M., et al., *Should we still only rely on EDSS to evaluate disability in multiple sclerosis patients? A study of inter and intra rater reliability*. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2021. **54**: p. 103144.
52. Tworok, S., et al., *Disability status and quality of life in multiple sclerosis: non-linearity of the Expanded Disability Status Scale (EDSS)*. *Health Qual Life Outcomes*, 2010. **8**: p. 55.
53. Weinshenker, B.G., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability*. *Brain*, 1989. **112 (Pt 1)**: p. 133-46.
54. Fischer, J.S., et al., *The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment*. *National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force*. *Mult Scler*, 1999. **5**(4): p. 244-50.
55. Uitdehaag, B.M., *Clinical outcome measures in multiple sclerosis*. *Handb Clin Neurol*, 2014. **122**: p. 393-404.
56. Cadavid, D., et al., *The EDSS-Plus, an improved endpoint for disability progression in secondary progressive multiple sclerosis*. *Multiple Sclerosis Journal*, 2017. **23**: p. 105 - 94.
57. Tiu, V.E., et al., *Serum Neurofilaments and OCT Metrics Predict EDSS-Plus Score Progression in Early Relapse-Remitting Multiple Sclerosis*. *Biomedicines*, 2023. **11**(2).
58. Beck, R.W., et al., *A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis*. *The Optic Neuritis Study Group*. *N Engl J Med*, 1992. **326**(9): p. 581-8.
59. Martínez-Cáceres, E.M., et al., *Treatment with methylprednisolone in relapses of multiple sclerosis patients: immunological evidence of immediate and short-term but not long-lasting effects*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **127**(1): p. 165-71.
60. Jongen, P.J., et al., *Patient-reported adverse effects of high-dose intravenous methylprednisolone treatment: a prospective web-based multi-center study in multiple sclerosis patients with a relapse*. *J Neurol*, 2016. **263**(8): p. 1641-51.
61. Zengin Karahan, S., et al., *Lack of Association between Pulse Steroid Therapy and Bone Mineral Density in Patients with Multiple Sclerosis*. *Mult Scler Int*, 2016. **2016**: p. 5794910.
62. Berkovich, R. and M.A. Agius, *Mechanisms of action of ACTH in the management of relapsing forms of multiple sclerosis*. *Ther Adv Neurol Disord*, 2014. **7**(2): p. 83-96.

63. Sørensen, P.S., *Treatment of multiple sclerosis with intravenous immunoglobulin: review of clinical trials*. Neurological Sciences, 2003. **24**(4): p. s227-s230.
64. Cortese, I., et al., *Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology*. Neurology, 2011. **76**(3): p. 294-300.
65. Weinschenker, B.G., et al., *A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease*. Ann Neurol, 1999. **46**(6): p. 878-86.
66. Rotstein, D., et al., *Association of NEDA-4 With No Long-term Disability Progression in Multiple Sclerosis and Comparison With NEDA-3: A Systematic Review and Meta-analysis*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2022. **9**(6).
67. Rush, C.A., H.J. MacLean, and M.S. Freedman, *Aggressive multiple sclerosis: proposed definition and treatment algorithm*. Nature Reviews Neurology, 2015. **11**(7): p. 379-389.
68. Freedman, M.S., et al., *Managing Multiple Sclerosis: Treatment Initiation, Modification, and Sequencing*. Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques, 2018. **45**(5): p. 489-503.
69. Cross, A. and C. Riley, *Treatment of Multiple Sclerosis*. Continuum (Minneapolis, Minn), 2022. **28**(4): p. 1025-1051.
70. Bertolotto, A., et al., *Guidelines on the clinical use for the detection of neutralizing antibodies (NAbs) to IFN beta in multiple sclerosis therapy: report from the Italian Multiple Sclerosis Study group*. Neurological Sciences, 2014. **35**(2): p. 307-316.
71. Kasindi, A., et al., *Glatiramer Acetate Immunomodulation: Evidence of Neuroprotection and Cognitive Preservation*. Cells, 2022. **11**(9).
72. Sandberg-Wollheim, M., et al., *Pregnancy Outcomes from the Branded Glatiramer Acetate Pregnancy Database*. Int J MS Care, 2018. **20**(1): p. 9-14.
73. O'Connor, P., et al., *Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2011. **365**(14): p. 1293-303.
74. Andersen, J.B., M.F. Wandall-Holm, and M. Magyari, *Pregnancy outcomes following maternal or paternal exposure to teriflunomide in the Danish MS population*. Mult Scler Relat Disord, 2022. **59**: p. 103529.
75. Marques, E.S., et al., *Developmental impacts of Nrf2 activation by dimethyl fumarate (DMF) in the developing zebrafish (Danio rerio) embryo*. Free Radic Biol Med, 2023. **194**: p. 284-297.
76. Fox, R.J., et al., *Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2012. **367**(12): p. 1087-97.
77. Jordan, A.L., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy in dimethyl fumarate-treated multiple sclerosis patients*. Mult Scler, 2022. **28**(1): p. 7-15.
78. Hellwig, K., et al., *Interim Analysis of Pregnancy Outcomes After Exposure to Dimethyl Fumarate in a Prospective International Registry*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2022. **9**(1).
79. Wan, M., et al., *Dimethyl fumarate induces cardiac developmental toxicity in zebrafish via down-regulation of oxidative stress*. Toxicology, 2024. **503**: p. 153735.
80. Kappos, L., et al., *A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2010. **362**(5): p. 387-401.
81. Ohtani, R., et al., *Risk factors for fingolimod-induced lymphopenia in multiple sclerosis*. Mult Scler J Exp Transl Clin, 2018. **4**(1): p. 2055217318759692.

82. Goncuoglu, C., et al., *Factors associated with fingolimod rebound: A single center real-life experience*. Multiple Sclerosis and Related Disorders, 2021. **56**: p. 103278.
83. Morrow, S.A., et al., *Use of natalizumab in persons with multiple sclerosis: 2022 update*. Mult Scler Relat Disord, 2022. **65**: p. 103995.
84. Singer, B.A., *The role of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis: benefits and risks*. Ther Adv Neurol Disord, 2017. **10**(9): p. 327-336.
85. Sørensen, P.S., et al., *Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab*. Multiple Sclerosis Journal, 2012. **18**(2): p. 143-152.
86. González-Suarez, I., et al., *Catastrophic outcome of patients with a rebound after Natalizumab treatment discontinuation*. Brain Behav, 2017. **7**(4): p. e00671.
87. Gibiansky, E., et al., *Ocrelizumab in relapsing and primary progressive multiple sclerosis: Pharmacokinetic and pharmacodynamic analyses of OPERA I, OPERA II and ORATORIO*. Br J Clin Pharmacol, 2021. **87**(6): p. 2511-2520.
88. Hauser, S.L., et al., *Safety of Ocrelizumab in Patients With Relapsing and Primary Progressive Multiple Sclerosis*. Neurology, 2021. **97**(16): p. e1546-e1559.
89. Rasband, M.N. and W.B. Macklin, *Chapter 10 - Myelin Structure and Biochemistry*, in *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*, S.T. Brady, et al., Editors. 2012, Academic Press: New York. p. 180-199.
90. Snaidero, N. and M. Simons, *Myelination at a glance*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 14): p. 2999-3004.
91. Philips, T. and J.D. Rothstein, *Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons*. J Clin Invest, 2017. **127**(9): p. 3271-3280.
92. Cammer, W., et al., *Quantitation of myelin carbonic anhydrase-development and subfractionation of rat brain myelin and comparison with myelin from other species*. Brain Res, 1977. **138**(1): p. 17-28.
93. LoPachin, R.M., C.M. Castiglia, and A.J. Saubermann, *Elemental composition and water content of myelinated axons and glial cells in rat central nervous system*. Brain Res, 1991. **549**(2): p. 253-9.
94. Morell, P., *Myelin*. 2013: Springer Science & Business Media.
95. Hirano, A. and H.M. Dembitzer, *A structural analysis of the myelin sheath in the central nervous system*. J Cell Biol, 1967. **34**(2): p. 555-67.
96. Gogate, N., et al., *Plasticity in the adult human oligodendrocyte lineage*. The Journal of Neuroscience, 1994. **14**(8): p. 4571-4587.
97. Medawar, P.B., *Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye*. Br J Exp Pathol, 1948. **29**(1): p. 58-69.
98. PERRY, V.H. and P.B. ANDERSSON, *The inflammatory response in the CNS*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 1992. **18**(5): p. 454-459.
99. Yang, L., et al., *Evaluating glymphatic pathway function utilizing clinically relevant intrathecal infusion of CSF tracer*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 107.
100. Kipnis, J., *Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system*. Science, 2016. **353**(6301): p. 766-71.
101. Döring, A., et al., *E- and P-selectin are not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 and SJL mice*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8470-9.
102. Buckley, M.W. and D.B. McGavern, *Immune dynamics in the CNS and its barriers during homeostasis and disease*. Immunol Rev, 2022. **306**(1): p. 58-75.

103. Cugurra, A., et al., *Skull and vertebral bone marrow are myeloid cell reservoirs for the meninges and CNS parenchyma*. *Science*, 2021. **373**(6553).
104. Daneman, R. and A. Prat, *The blood-brain barrier*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **7**(1): p. a020412.
105. Engelhardt, B. and R.M. Ransohoff, *The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(9): p. 485-95.
106. Montresor, A., et al., *Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 127.
107. Mundt, S., et al., *Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation*. *Sci Immunol*, 2019. **4**(31).
108. Bär, T., *The vascular system of the cerebral cortex*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 1980. **59**: p. I-vi,1-62.
109. Mapunda, J.A., et al., *How Does the Immune System Enter the Brain?* *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 805657.
110. Solár, P., et al., *Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease*. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2020. **17**(1): p. 35.
111. Cousins, O., et al., *The blood–CSF–brain route of neurological disease: The indirect pathway into the brain*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2022. **48**(4): p. e12789.
112. Balin, B.J., et al., *Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey*. *J Comp Neurol*, 1986. **251**(2): p. 260-80.
113. Brioschi, S., et al., *Heterogeneity of meningeal B cells reveals a lymphopoietic niche at the CNS borders*. *Science*, 2021. **373**(6553).
114. Goldmann, T., et al., *Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(7): p. 797-805.
115. Schmitt, C., N. Strazielle, and J.-F. Ghersi-Egea, *Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain*. *Journal of Neuroinflammation*, 2012. **9**(1): p. 187.
116. Hickey, W.F., B.L. Hsu, and H. Kimura, *T-lymphocyte entry into the central nervous system*. *Journal of Neuroscience Research*, 1991. **28**(2): p. 254-260.
117. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 859-73.
118. von Andrian, U.H., et al., *Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(17): p. 7538-42.
119. Engelhardt, B., et al., *E- and P-selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Blood*, 1997. **90**(11): p. 4459-72.
120. Engelhardt, B., *Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2006. **113**(4): p. 477-85.
121. Engelhardt, B., *The role of alpha 4-integrin in T lymphocyte migration into the inflamed and noninflamed central nervous system*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1998. **231**: p. 51-64.
122. Reiss, Y. and B. Engelhardt, *T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2*. *Int Immunol*, 1999. **11**(9): p. 1527-39.

123. Engelhardt, B., et al., *P-selectin glycoprotein ligand 1 is not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL and C57BL/6 mice*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1267-75.
124. Risau, W., B. Engelhardt, and H. Wekerle, *Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro*. J Cell Biol, 1990. **110**(5): p. 1757-66.
125. Wolburg, K., et al., *Ultrastructural localization of adhesion molecules in the healthy and inflamed choroid plexus of the mouse*. Cell Tissue Res, 1999. **296**(2): p. 259-69.
126. Engelhardt, B., et al., *Adhesion molecule phenotype of T lymphocytes in inflamed CNS*. J Neuroimmunol, 1998. **84**(1): p. 92-104.
127. Röhnel, R.K., et al., *Immunosurveillance modelled in vitro: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium*. Int Immunol, 1997. **9**(3): p. 435-50.
128. Kraus, J., et al., *Soluble and cell surface ICAM-1 as markers for disease activity in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 1998. **98**(2): p. 102-9.
129. Kraus, J., et al., *CD45RA+ ICAM-3+ lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 2000. **102**(5): p. 326-32.
130. Kraus, J., et al., *Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells in vitro*. Ann Neurol, 2004. **56**(2): p. 192-205.
131. Vajkoczy, P., M. Laschinger, and B. Engelhardt, *Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels*. J Clin Invest, 2001. **108**(4): p. 557-65.
132. Laschinger, M., P. Vajkoczy, and B. Engelhardt, *Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo*. Eur J Immunol, 2002. **32**(12): p. 3598-606.
133. Huang, X., B. Hussain, and J. Chang, *Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms*. CNS Neurosci Ther, 2021. **27**(1): p. 36-47.
134. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 2955-63.
135. Johnson-Léger, C. and B.A. Imhof, *Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door?* Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 93-105.
136. Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, and B. Engelhardt, *Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(2): p. 181-90.
137. Steinman, L., *A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2253-6.
138. Wucherpfennig, K.W., *Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents*. The Journal of clinical investigation, 2001. **108**(8): p. 1097-1104.
139. Zarozinski, C.C. and R.M. Welsh, *Minimal bystander activation of CD8 T cells during the virus-induced polyclonal T cell response*. The Journal of experimental medicine, 1997. **185**(9): p. 1629-1640.

140. Tough, D.F., P. Borrow, and J. Sprent, *Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo*. *Science*, 1996. **272**(5270): p. 1947-1950.
141. Di Genova, G., et al., *Bystander stimulation of activated CD4+ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid*. *European journal of immunology*, 2010. **40**(4): p. 976-985.
142. Martino, G., et al., *Proinflammatory cytokines regulate antigen-independent T-cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients*. *Ann Neurol*, 1998. **43**(3): p. 340-9.
143. Lee, H.-G., et al., *Pathogenic function of bystander-activated memory-like CD4+ T cells in autoimmune encephalomyelitis*. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 709.
144. Ransohoff, R.M., *Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(8): p. 1074-7.
145. Lassmann, H. and M. Bradl, *Multiple sclerosis: experimental models and reality*. *Acta Neuropathol*, 2017. **133**(2): p. 223-244.
146. Oleszak, E.L., et al., *Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2004. **17**(1): p. 174-207.
147. Robinson, A.P., et al., *The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment*. *Handb Clin Neurol*, 2014. **122**: p. 173-89.
148. Skundric, D.S., *Experimental models of relapsing-remitting multiple sclerosis: current concepts and perspective*. *Curr Neurovasc Res*, 2005. **2**(4): p. 349-62.
149. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(4): p. 1079-106.
150. Glatigny, S. and E. Bettelli, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS)*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018. **8**(11).
151. deLuca, L.E.S., et al., *Substrain Differences Reveal Novel Disease-Modifying Gene Candidates That Alter the Clinical Course of a Rodent Model of Multiple Sclerosis*. *The Journal of Immunology*, 2010. **184**(6): p. 3174-3185.
152. Kipp, M., et al., *Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective*. *Brain Pathol*, 2017. **27**(2): p. 123-137.
153. Sriram, S. and I. Steiner, *Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 2005. **58**(6): p. 939-45.
154. Zendedel, A., C. Beyer, and M. Kipp, *Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection*. *J Mol Neurosci*, 2013. **51**(2): p. 567-72.
155. Blakemore, W.F. and R.J. Franklin, *Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008. **318**: p. 193-212.
156. McMurrin, C.E., C. Zhao, and R.J.M. Franklin, *Toxin-Based Models to Investigate Demyelination and Remyelination*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1936**: p. 377-396.
157. Hooijmans, C.R., et al., *Remyelination promoting therapies in multiple sclerosis animal models: a systematic review and meta-analysis*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 822.
158. Vega-Riquer, J.M., et al., *Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases*. *Curr Neuropharmacol*, 2019. **17**(2): p. 129-141.
159. Klatzo, I., *Neuropathological Aspects of Brain Edema**. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1967. **26**(1): p. 1-14.

160. Bakay, L., *Changes in Barrier Effect in Pathological States*, in *Progress in Brain Research*, A. Lajtha and D.H. Ford, Editors. 1968, Elsevier. p. 315-341.
161. Small, R.G. and W.A. Krehl, *Cerebral Swelling and Cerebral Edema**. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1952. **11**(2): p. 192-199.
162. Debijadi, R., et al., [*Contribution to the attempt of treatment of cerebral edema by simulated altitude*]. *Vojnosanit Pregl*, 1965. **22**(10): p. 621-4.
163. Klatzo, I., A. Piraux, and E.J. Laskowski, *The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1958. **17**(4): p. 548-64.
164. Perret, G.E. and J.W. Kernohan, *Histopathologic Changes of the Brain Caused by Intracranial Tumors (So-Called Edema or Swelling of the Brain)*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1943. **2**(4): p. 341-352.
165. PENFIELD, W. and W. CONE, *ACUTE SWELLING OF OLIGODENDROGLIA: A SPECIFIC TYPE OF NEUROGLIA CHANGE*. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 1926. **16**(2): p. 131-153.
166. Kalsbeck, J.E. and J.N. Cumings, *Experimental edema in the rat and cat brain*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1963. **22**: p. 237-47.
167. Feigin, I. and N. Popoff, *Neuropathological Changes Late in Cerebral Edema: The Relationship to Trauma, Hypertensive Disease and Binswanger's Encephalopathy*†‡*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1963. **22**(3): p. 500-511.
168. Torack, R.M., R.D. Terry, and H.M. Zimmerman, *The fine structure of cerebral fluid accumulation. II. Swelling produced by triethyl tin poisoning and its comparison with that in the human brain*. *Am J Pathol*, 1960. **36**(3): p. 273-87.
169. Aleu, F.P., R. Katzman, and R.D. Terry, *Fine structure and electrolyte analyses of cerebral edema induced by alkyl tin intoxication*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1963. **22**(3): p. 403-13.
170. Torack, R.M., R.D. Terry, and H.M. Zimmerman, *The fine structure of cerebral fluid accumulation. I. Swelling secondary to cold injury*. *Am J Pathol*, 1959. **35**(6): p. 1135-47.
171. Aleu, F.P., et al., *ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS IN CEREBRAL EDEMA ASSOCIATED WITH EXPERIMENTAL MOUSE GLIOMAS*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1964. **23**: p. 253-63.
172. Bakay, L. and J.C. Lee, *Ultrastructural changes in the edematous central nervous system. 3. Edema in shark brain*. *Arch Neurol*, 1966. **14**(6): p. 644-60.
173. Botta, J.A., Jr. and W.W. Carlton, *Isoniazid toxicosis in ducklings--studies on pyridoxine, niacin, glutamic acid, and arginine supplementation*. *Avian Dis*, 1967. **11**(4): p. 621-33.
174. Chiang, J., et al., *Cerebral ischemia. III. Vascular changes*. *Am J Pathol*, 1968. **52**(2): p. 455-76.
175. Cornog, J.L., N.K. Gonatas, and J.R. Feierman, *Effects of intracerebral injection of ouabain on the fine structure of rat cerebral cortex*. *Am J Pathol*, 1967. **51**(4): p. 573-90.
176. de Robertis, E., M. Alberici, and G.R.g. de Lores Arnaiz, *Astroglial swelling and phosphohydrolases in cerebral cortex of metrazol convulsant rats*. *Brain Research*, 1969. **12**(2): p. 461-466.
177. Chou, S.M. and H.A. Hartmann, *Electron microscopy of focal neuroaxonal lesions produced by beta-beta-iminodipropionitrile (IDPN) in rats. I. The advanced lesions*. *Acta Neuropathol*, 1965. **4**(6): p. 590-603.
178. Hirano, A., S. Levine, and H.M. Zimmerman, *Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1967. **26**(2): p. 200-13.

179. Hirano, A., H.M. Zimmerman, and S. Levine, *The fine structure of cerebral fluid accumulation. IX. Edema following silver nitrate implantation*. Am J Pathol, 1965. **47**(4): p. 537-48.
180. Luse, S.A. and B. Harris, *Brain ultrastructure in hydration and dehydration*. Arch Neurol, 1961. **4**: p. 139-52.
181. Lampert, P., *Electron microscopic studies on ordinary and hyperacute experimental allergic encephalomyelitis*. Acta Neuropathologica, 1967. **9**(2): p. 99-126.
182. Rosomoff, H.L. and F.T. Zugibe, *Distribution of intracranial contents in experimental edema*. Arch Neurol, 1963. **9**: p. 26-34.
183. Van Harreveld, A., H. Collewijn, and S.K. Malhotra, *Water, electrolytes, and extracellular space in hydrated and dehydrated brains*. Am J Physiol, 1966. **210**(2): p. 251-6.
184. Nilsson, G., et al., *A New Colour Reaction on Copper and Certain Carbonyl Compounds*. Acta Chemica Scandinavica, 1950. **4**: p. 205-205.
185. Sastry, K.V., et al., *Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy*. Anal Biochem, 2002. **306**(1): p. 79-82.
186. Carlton, W.W., *Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, α -benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1966. **8**(3): p. 512-521.
187. Carlton, W.W., *Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity*. Life Sci, 1967. **6**(1): p. 11-9.
188. Carlton, W.W., *Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, α -benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone*. Toxicol Appl Pharmacol, 1966. **8**(3): p. 512-21.
189. Suzuki, K., *Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone*. Science, 1969. **163**(3862): p. 81-2.
190. Guerrero-Castillo, S., et al., *Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species*. J Bioenerg Biomembr, 2011. **43**(3): p. 323-31.
191. Suzuki, K. and Y. Kikkawa, *Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxaldihydrazone)*. Am J Pathol, 1969. **54**(2): p. 307-25.
192. Hemm, R.D., W.W. Carlton, and J.R. Welser, *Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 1971. **18**(4): p. 869-82.
193. Pattison, I.H. and J.N. Jebbett, *Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice*. Res Vet Sci, 1971. **12**(4): p. 378-80.
194. Kesterson, J.W. and W.W. Carlton, *Histopathologic and enzyme histochemical observations of the cuprizone-induced brain edema*. Exp Mol Pathol, 1971. **15**(1): p. 82-96.
195. Blakemore, W.F., *Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice*. J Neurocytol, 1972. **1**(4): p. 413-26.
196. Blakemore, W.F., *Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone*. J Neurol Sci, 1973. **20**(1): p. 63-72.
197. Ludwin, S.K., *Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1978. **39**(6): p. 597-612.
198. Barres, B.A., et al., *Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival*. Development, 1993. **118**(1): p. 283-95.

199. Chang, A., et al., *Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2002. **346**(3): p. 165-73.
200. D'Ercole, A.J., et al., *The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system*. Mol Neurobiol, 1996. **13**(3): p. 227-55.
201. Franklin, R.J., *Why does remyelination fail in multiple sclerosis?* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(9): p. 705-14.
202. García-Segura, L.M., et al., *Interaction of the signalling pathways of insulin-like growth factor-I and sex steroids in the neuroendocrine hypothalamus*. Horm Res, 1996. **46**(4-5): p. 160-4.
203. Mason, J.L., et al., *Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination*. J Neurosci, 2000. **20**(15): p. 5703-8.
204. Stangel, M. and C. Trebst, *Remyelination strategies: new advancements toward a regenerative treatment in multiple sclerosis*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2006. **6**(3): p. 229-35.
205. Ludwin, S.K., *An autoradiographic study of cellular proliferation in remyelination of the central nervous system*. Am J Pathol, 1979. **95**(3): p. 683-96.
206. Ludwin, S.K., *Chronic demyelination inhibits remyelination in the central nervous system. An analysis of contributing factors*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1980. **43**(4): p. 382-387.
207. Lindner, M., et al., *Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination*. Neurosci Lett, 2009. **453**(2): p. 120-5.
208. Bakker, D.A. and S.K. Ludwin, *Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases*. J Neurol Sci, 1987. **78**(2): p. 125-37.
209. Kondo, A., T. Nakano, and K. Suzuki, *Blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in twitcher and cuprizone-intoxicated mice*. Brain Res, 1987. **425**(1): p. 186-90.
210. Herder, V., et al., *Lack of cuprizone-induced demyelination in the murine spinal cord despite oligodendroglial alterations substantiates the concept of site-specific susceptibilities of the central nervous system*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011. **37**(6): p. 676-84.
211. Torkildsen, O., et al., *The cuprizone model for demyelination*. Acta Neurol Scand Suppl, 2008. **188**: p. 72-6.
212. Remington, L.T., et al., *Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1713-24.
213. Emerson, M.R., S. Biswas, and S.M. LeVine, *Cuprizone and piperonyl butoxide, proposed inhibitors of T-cell function, attenuate experimental allergic encephalomyelitis in SJL mice*. J Neuroimmunol, 2001. **119**(2): p. 205-13.
214. Maña, P., et al., *Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation*. J Neuroimmunol, 2009. **210**(1-2): p. 13-21.
215. Almuslehi, M.S.M., et al., *CD8 T-cell Recruitment Into the Central Nervous System of Cuprizone-Fed Mice: Relevance to Modeling the Etiology of Multiple Sclerosis*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 43.
216. Goldberg, J., et al., *Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes*. Cell Mol Neurobiol, 2013. **33**(8): p. 1087-98.
217. Hesse, A., et al., *In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(2): p. 362-9.

218. Kesterson, J.W. and W.W. Carlton, *Monoamine oxidase inhibition and the activity of other oxidative enzymes in the brains of mice fed cuprizone*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1971. **20**(3): p. 386-95.
219. Venturini, G., *Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo*. *J Neurochem*, 1973. **21**(5): p. 1147-51.
220. Acs, P., et al., *Distribution of oligodendrocyte loss and mitochondrial toxicity in the cuprizone-induced experimental demyelination model*. *J Neuroimmunol*, 2013. **262**(1-2): p. 128-31.
221. Hoppel, C.L. and B. Tandler, *Biochemical effects of cuprizone on mouse liver and heart mitochondria*. *Biochem Pharmacol*, 1973. **22**(18): p. 2311-8.
222. Zirngibl, M., et al., *Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination*. *Mol Neurodegener*, 2022. **17**(1): p. 34.
223. Carlton, W.W., *Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone*. *Experimental and Molecular Pathology*, 1969. **10**(3): p. 274-287.
224. Hiremath, M.M., et al., *Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice*. *J Neuroimmunol*, 1998. **92**(1-2): p. 38-49.
225. Carlton, W.W., *Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone*. *Exp Mol Pathol*, 1969. **10**(3): p. 274-87.
226. Silvestroff, L., et al., *Cuprizone-induced demyelination in the rat cerebral cortex and thyroid hormone effects on cortical remyelination*. *Exp Neurol*, 2012. **235**(1): p. 357-67.
227. Oakden, W., et al., *Early regional cuprizone-induced demyelination in a rat model revealed with MRI*. *NMR Biomed*, 2017. **30**(9).
228. Adamo, A.M., et al., *Remyelination after cuprizone-induced demyelination in the rat is stimulated by apotransferrin*. *Exp Neurol*, 2006. **198**(2): p. 519-29.
229. Kanno, T., et al., *Hexachlorophene and cuprizone induce the spongy change of the developing rat brain by different mechanisms: the role of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)*. *J Vet Med Sci*, 2012. **74**(7): p. 837-43.
230. Buyukmihci, N., F. Goehring-Harmon, and R.F. Marsh, *Retinal degeneration during clinical scrapie encephalopathy in hamsters*. *J Comp Neurol*, 1982. **205**(2): p. 153-60.
231. Kimberlin, R.H., S.C. Collis, and C.A. Walker, *Profiles of brain glycosidase activity in cuprizone-fed Syrian hamsters and in scrapie-affected mice, rats, Chinese hamsters and Syrian hamsters*. *J Comp Pathol*, 1976. **86**(1): p. 135-42.
232. Chen, Z., et al., *Cuprizone does not induce CNS demyelination in nonhuman primates*. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015. **2**(2): p. 208-13.
233. Sansom, B.F., I.H. Pattison, and J.N. Jebbett, *Permeability of blood vessels in mice affected with scrapie or fed with cuprizone*. *J Comp Pathol*, 1973. **83**(4): p. 461-6.
234. Xing, Y.L., et al., *Adult neural precursor cells from the subventricular zone contribute significantly to oligodendrocyte regeneration and remyelination*. *J Neurosci*, 2014. **34**(42): p. 14128-46.
235. Berghoff, S.A., et al., *Dietary cholesterol promotes repair of demyelinated lesions in the adult brain*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14241.
236. Matsushima, G.K. and P. Morell, *The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system*. *Brain Pathol*, 2001. **11**(1): p. 107-16.

237. Ludwin, S.K., *Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity*. Lab Invest, 1978. **39**(6): p. 597-612.
238. Jurevics, H., et al., *Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination*. J Neurochem, 2002. **82**(1): p. 126-36.
239. Silvestroff, L., et al., *Cuprizone-induced demyelination in CNP::GFP transgenic mice*. J Comp Neurol, 2010. **518**(12): p. 2261-83.
240. Norkute, A., et al., *Cuprizone treatment induces demyelination and astrocytosis in the mouse hippocampus*. J Neurosci Res, 2009. **87**(6): p. 1343-55.
241. Yang, H.J., et al., *Region-specific susceptibilities to cuprizone-induced lesions in the mouse forebrain: Implications for the pathophysiology of schizophrenia*. Brain Res, 2009. **1270**: p. 121-30.
242. Hoffmann, K., et al., *Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice*. Exp Neurol, 2008. **210**(2): p. 308-21.
243. Gudi, V., et al., *Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination*. Brain Res, 2009. **1283**: p. 127-38.
244. Plant, S.R., H.A. Arnett, and J.P. Ting, *Astroglial-derived lymphotoxin-alpha exacerbates inflammation and demyelination, but not remyelination*. Glia, 2005. **49**(1): p. 1-14.
245. Franco-Pons, N., et al., *Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination*. Toxicol Lett, 2007. **169**(3): p. 205-13.
246. Hibbits, N., et al., *Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination*. ASN Neuro, 2009. **1**(3).
247. Adamczyk, M., et al., *The Expression of Activation Markers CD25 and CD69 Increases during Biologic Treatment of Psoriasis*. Journal of Clinical Medicine, 2023. **12**(20): p. 6573.
248. Schumann, J., et al., *Differences in CD44 Surface Expression Levels and Function Discriminates IL-17 and IFN- γ Producing Helper T Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132479.
249. Au - Seibenhener, M.L. and M.C. Au - Wooten, *Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice*. JoVE, 2015(96): p. e52434.
250. Bonin, R.P., C. Bories, and Y. De Koninck, *A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments*. Mol Pain, 2014. **10**: p. 26.
251. Vöikar, V. and S.C. Stanford, *The Open Field Test*, in *Psychiatric Vulnerability, Mood, and Anxiety Disorders: Tests and Models in Mice and Rats*, J. Harro, Editor. 2023, Springer US: New York, NY. p. 9-29.
252. Ludowyk, P.A., D.O. Willenborg, and C.R. Parish, *Selective localisation of neuro-specific T lymphocytes in the central nervous system*. Journal of Neuroimmunology, 1992. **37**(3): p. 237-250.
253. Jones, R.E., et al., *Nonmyelin-Specific T Cells Accelerate Development of Central Nervous System APC and Increase Susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis1*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(2): p. 831-837.
254. Chakir, H., et al., *"Bystander polarization" of CD4+ T cells: activation with high-dose IL-2 renders naive T cells responsive to IL-12 and/or IL-18 in the absence of TCR ligation*. Eur J Immunol, 2003. **33**(7): p. 1788-98.

255. Zhang, X., et al., *Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15*. *Immunity*, 1998. **8**(5): p. 591-9.
256. Zhan, J., et al., *The Cuprizone Model: Dos and Do Nots*. *Cells*, 2020. **9**(4).
257. Toomey, L.M., et al., *Cuprizone feed formulation influences the extent of demyelinating disease pathology*. *Scientific Reports*, 2021. **11**(1): p. 22594.
258. Lindner, M., et al., *Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2008. **34**(1): p. 105-14.
259. Mason, J.L., et al., *Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(5): p. 1673-82.
260. Procaccini, C., et al., *Animal models of Multiple Sclerosis*. *Eur J Pharmacol*, 2015. **759**: p. 182-91.
261. Marena, S., et al., *Visual Evoked Potentials to Monitor Myelin Cuprizone-Induced Functional Changes*. *Front Neurosci*, 2022. **16**: p. 820155.
262. Hedström, A.K., et al., *Factors affecting the risk of relapsing-onset and progressive-onset multiple sclerosis*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2021. **92**(10): p. 1096-1102.
263. Kipp, M., *How to Use the Cuprizone Model to Study De- and Remyelination*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. **25**(3): p. 1445.
264. Taylor, L.C., W. Gilmore, and G.K. Matsushima, *SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(3): p. 467-79.
265. Nicola, M.A., et al., *Neuroprotective effects of rutin against cuprizone-induced multiple sclerosis in mice*. *Inflammopharmacology*, 2024. **32**(2): p. 1295-1315.
266. Zhen, W., et al., *An Alternative Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination Mouse Model*. *ASN Neuro*, 2017. **9**(4): p. 1759091417725174.
267. *Abstracts*. *Neurogastroenterology & Motility*, 2023. **35**(S2): p. e14637.
268. Titus, H.E., et al., *Pre-clinical and Clinical Implications of "Inside-Out" vs. "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2020. **14**.
269. Zirngibl, M., et al., *Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination*. *Molecular Neurodegeneration*, 2022. **17**(1): p. 34.
270. Acs, P., et al., *17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice*. *Glia*, 2009. **57**(8): p. 807-14.
271. Sághy, É., et al., *TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis*. *Glia*, 2016. **64**(12): p. 2166-2180.
272. Sen, M.K., et al., *Suppression of the Peripheral Immune System Limits the Central Immune Response Following Cuprizone-Feeding: Relevance to Modelling Multiple Sclerosis*. *Cells*, 2019. **8**(11).
273. Roufagalas, I., et al., *Novel cell-based analysis reveals region-dependent changes in microglial dynamics in grey matter in a cuprizone model of demyelination*. *Neurobiology of Disease*, 2021. **157**: p. 105449.
274. Locatelli, G., et al., *Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity*. *Nature Neuroscience*, 2012. **15**(4): p. 543-550.
275. Kaddatz, H., et al., *Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment*. *Glia*, 2021. **69**(4): p. 925-942.
276. Avşar, T., et al., *Investigation of neuro-inflammatory parameters in a cuprizone induced mouse model of multiple sclerosis*. *Turkish Journal of Biology*, 2021. **45**: p. 644 - 655.

277. Emerson, M.R., S. Biswas, and S.M. LeVine, *Cuprizone and piperonyl butoxide, proposed inhibitors of T-cell function, attenuate experimental allergic encephalomyelitis in SJL mice*. Journal of Neuroimmunology, 2001. **119**(2): p. 205-213.
278. Sen, M.K., et al., *The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis*. Glia, 2022. **70**(7): p. 1215-1250.
279. Faizi, M., et al., *Toxicity of cuprizone a Cu(2+) chelating agent on isolated mouse brain mitochondria: a justification for demyelination and subsequent behavioral dysfunction*. Toxicol Mech Methods, 2016. **26**(4): p. 276-83.
280. Sen, M.K., et al., *Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2019. **107**: p. 23-46.
281. Meca-Lallana, V., et al., *Deciphering Multiple Sclerosis Progression*. Frontiers in Neurology, 2021. **12**.
282. Harris, V.K., et al., *Efficacy of intrathecal mesenchymal stem cell-neural progenitor therapy in progressive MS: results from a phase II, randomized, placebo-controlled clinical trial*. Stem Cell Research & Therapy, 2024. **15**(1): p. 151.
283. Mitra, N.K., et al., *Locomotor and histological changes in a cuprizone-induced animal model of multiple sclerosis: comparison between alpha-tocopherol and fingolimod*. Res Pharm Sci, 2022. **17**(2): p. 134-142.
284. Takao, K. and T. Miyakawa, *Light/dark transition test for mice*. J Vis Exp, 2006(1): p. 104.
285. Booher, W.C., et al., *Anxiety-related defensive behavioral responses in mice selectively bred for High and Low Activity*. Genes Brain Behav, 2021. **20**(7): p. e12730.
286. Walf, A.A. and C.A. Frye, *The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 322-8.
287. Xu, H., et al., *Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone*. Behavioral neuroscience, 2009. **123**(2): p. 418.
288. Olechowski, C.J., J.J. Truong, and B.J. Kerr, *Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. Pain, 2009. **141**(1-2): p. 156-64.
289. Tolomeo, A.M., et al., *Biodistribution of Intratracheal, Intranasal, and Intravenous Injections of Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in a Mouse Model for Drug Delivery Studies*. Pharmaceutics, 2023. **15**(2): p. 548.
290. Smolders, J., et al., *T-cell surveillance of the human brain in health and multiple sclerosis*. Seminars in Immunopathology, 2022. **44**(6): p. 855-867.