



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MAKROFAJLARIN MERKEZİ SINIR SİSTEMİNİN NÖRAL  
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ANALİZİ**

FATMAGÜL İLAYDA AYDINLI

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

İSTANBUL-2022

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Fatmagül Hayda AYDINLI  
Tez Başlığı : Makrofajların Merkezi Sinir Sisteminin Nöral Hücreleri  
Üzerindeki Etkisinin Analizi  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 26.10.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Doç.Dr. Bilal Ersen KERMAN	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<b><u>Sınav Jüri Üyeleri</u></b>		
Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Dr.Öğr.Üyesi Deniz DURALI	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Dr.Öğr.Üyesi Kıymet Aslı K.AYDIN	Nişantaşı Üniversitesi	
Dr.Öğr.Üyesi Merve BEKER	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun  
..... tarih ve ..... sayılı kararı ile şekil  
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili**

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar olan bütün süreçlerde etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici davranışımın olmadığını beyan ederim.

Fatmagül İlayda AYDINLI



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsünün (SABİTA) bilimsel araştırmalara verdiği destek ve sağladığı olanaklar yapılmıştır. Sağladığı imkanlar için SABİTA Müdürü ve Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, doktora eğitimim boyunca yanımda olan, bilim insanı kişiliğinden ve insaniyetinden çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a,

Tezin oluşumundan tamamlanmasına kadar geçen süreçte fikirleriyle tezimi yönlendirmiş, tezimin tamamlanması için desteğini esirgememiş, yol göstericiliği ve sabrı için minnettar olduğum tez danışmanım Doç. Dr. Bilal Ersen Kerman'a,

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince desteklerini her zaman hissettiğim, yardımlarına her zaman başvurduğum ve artık dost olarak gördüğüm çalışma arkadaşlarım; Tuba Oğuz, Burcu Kurt Vatandaşlar, Emre Vatandaşlar, Zeynep Aladağ ve Eşref Çelik'e,

Çalışmalarım boyunca desteklerini ve varlıklarını hep hissettiğim SABİTA ailesine,

Hem hayatım boyunca hem de tez çalışmalarım süresince hiçbir özveriden kaçınmayan, benim için olanaksızları oldurabilen canım kardeşim Mert Kara'ya,

Manevi destekleri hiçbir zaman eksik etmeyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim başta sevgili annem Ayşe Aydınlı ve babam Mehmet Kemal Aydınlı'ya ve bütün aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. Miyelin ve Miyelin Oluşumu.....	7
4.2. Oligodendrositler.....	9
4.3. Merkezi Sinir Sisteminde Miyelinizasyon.....	10
4.4. Merkezi Sinir Sisteminde Demiyelinizasyon Süreci.....	12
4.5. Merkezi Sinir Sisteminde Remyelinizasyon Süreci.....	14
4.6. Makrofajlar.....	15
4.7. Makrofaj Aktivasyonu.....	18
4.8. Peritoneal Makrofajlar.....	20
4.9. Makrofajların Demiyelinizasyon ve Remyelinizasyon Süreçlerindeki Rollerini.....	22
4.10. <i>in vitro</i> Demiyelinizasyon ve Remyelinizasyon Modelleri.....	25
4.11. Multipl Skleroz.....	26
4.12. Proteome Analizi ile Aday Proteinlerinin Ortaya Konulması.....	28
4.13. Isı Şoku Protein Ailesi A (Hsp70) Üye 5 (HSPA5) Proteini.....	30
4.14. Ephrin Tip-A Reseptörü 7 (EPHA7) Proteini.....	32
4.15. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri.....	34
4.16. <i>In vivo</i> Demiyelinizasyon Modelleri.....	35
4.17. EAE Fare Modeli.....	37

<b>5. MATERYAL ve METOT.....</b>	<b>40</b>
5.1. Malzeme Listesi .....	40
5.2. Primer Oligodendrosit Kültürü .....	43
5.3. Peritoneal Makrofaj İzolasyonu .....	44
5.4. Primer Peritoneal Makrofaj Kültürü ve M1/M2 Makrofajına Farklılaştırılması	44
5.5. Oligodendrosit-Makrofaj <i>in vitro</i> Ortak Kültürü .....	45
5.6. İmmünohistokimyasal Boyama.....	45
5.7. MS Hastalarının ve Kontrollerinin Katılımı .....	46
5.8. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi .....	47
5.9. Akış Sitometrisi Analizleri.....	48
5.10. İkincil Hücre Kültürü .....	50
5.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	50
5.12. EAE Fare Modeli Oluşturulması.....	52
5.13. EAE Fare Modeli Skorlaması .....	53
5.14. EAE Fare Dalak Hücrelerinin Akış Sitometrisi ile Karakterizasyonu.....	54
5.15. EAE Fare Dalak Hücre Kültürü .....	56
5.16. İmmünohistokimyasal Boyama.....	56
5.17. Konfokal Mikroskopisi ile Görüntüleme .....	57
5.18. İstatistiksel Analiz.....	57
<b>6. BULGULAR</b>	<b>58</b>
6.1. M1 Makrofajları Ortak Kültürlerdeki Olgun Oligodendrositlerin Sayısını Azaltır .....	58
6.2. M1 Makrofajları Ortak Kültürde Oligodendrositleri Ölümüne Neden Olup Fagositoz ile Miyelin Kalıntılarını Temizler.....	63
6.3. M2 Makrofajları Ortak Kültürde Olgun Oligodendrositlerin Sayısını Arttır .....	64
6.4. Naif Makrofajlar Ortak Kültürde Oligodendrosit Olgunlaşmasını İndükler.....	66
6.5. MS Hastaları ve Sağlıklı Bireylerin PKMH'lerinde Monosit Gruplarının Belirlenmesi .....	68
6.6. HSPA5 ve EPHA7 Proteinlerinin Lokalizasyonunu Belirleme .....	73
6.7. HSPA5 ve EPHA7 Protein İfadelerinin Hücre Hatında Akış Sitometrisi ile Gösterimi.....	74

6.8. MS Hastalarına Ait Monosit Hücre Gruplarında HSPA5 İfadesi Sağlıklı Bireylere Göre Daha Az Tespit Edilmiştir.....	75
6.9. MS Hastalarına Ait Monosit Hücre Gruplarında EPHA7 İfadesi Sağlıklı Bireylere Göre Daha Değişiklik Tespit Edilmemiştir .....	76
6.10. EAE Modelinin Oluşturulması ve Skorlanması.....	77
6.11. EAE Model Farelerin Omuriliklerinde Demyelinizasyonun Gösterilmesi.....	80
6.12. EAE Farelerinden Elde Edilen Dalak Hücrelerinde HSPA5 İfadesinin Akış Sitometrisi ile Gösterimi .....	81
6.13. EAE Farelerinden Elde Edilen Dalak Hücreleri Kültürlerinde HSPA5 İfadesi Tespiti.....	83
<b>7. TARTIŞMA.....</b>	<b>85</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>94</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>95</b>
<b>10. ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>116</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>121</b>

## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

<b>ADEM</b>	Akut dissemine ensefalomyelit
<b>AGM</b>	Aort gonad-mezonefroz
<b>AHL</b>	Akut hemorajik lökoensefalit
<b>AIDS</b>	Edinsel bağışıklık eksikliği sendromu
<b>bFGF</b>	Fibroblast büyüme faktörü
<b>BIP</b>	Bağlayıcı immüoglobulin proteini
<b>BOS</b>	Beyin omurilik sıvısı
<b>BPM</b>	Büyük peritoneal makrofaj
<b>CCL4</b>	C-C kemokin ligandı 4
<b>CCL5</b>	C-C kemokin ligandı 5
<b>CCL8</b>	C-C kemokin ligandı 8
<b>CNTF</b>	Siliyer nörotrofik faktörü
<b>CSF-1</b>	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>CXCL10</b>	C-X-C kemokin ligandı 10
<b>CXCL2</b>	C-X-C kemokin ligandı 2
<b>CXCL4</b>	C-X-C kemokin ligandı 4
<b>CXCL9</b>	C-X-C kemokin ligandı 9
<b>CXCR4</b>	C-X-C kemokin reseptörü 4
<b>DMEM</b>	Dulbecco'nun modifiye vasatı
<b>DNAJC10</b>	DNAJ homolog alt ailesi C üyesi 10
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virüsü
<b>EM</b>	Elektron mikroskopi
<b>EPHA7</b>	Ephrin tip-A reseptörü 7
<b>EPM</b>	Ekstrapontin miyelinoliz
<b>ESM</b>	Ekstrasellüler matriks
<b>FBS</b>	Fetal sığır serumu
<b>Fizz1</b>	Resistin benzeri molekül alfa1
<b>GalC</b>	Galaktocerebrozit



<b>GM-CSF</b>	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>GNB4</b>	Guanin nükleotid bağlayıcı protein alt birimi beta-4
<b>GRP78</b>	Glikoz düzenleyici protein 78
<b>HELA</b>	Rahim ağzı kanseri hücre hattı
<b>HKH</b>	Hematopoietik kök hücre
<b>HS</b>	At serumu
<b>HSPA5</b>	Isı şoku protein ailesi a (Hsp70) üye 5
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	İnterferon-gama
<b>IL-10</b>	İnterlökin 10
<b>IL-12</b>	İnterlökin 12
<b>IL-13</b>	İnterlökin 13
<b>IL-18</b>	İnterlökin 18
<b>IL-23</b>	İnterlökin 23
<b>IL-33</b>	İnterlökin 33
<b>IL-4</b>	İnterlökin 4
<b>IL-6</b>	İnterlökin 6
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>KPM</b>	Küçük peritoneal makrofaj
<b>KPY</b>	Katlanmamış protein yanıtı
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>MAG</b>	Miyelin ilişkili glikoprotein
<b>MBP</b>	Miyelin bazik protein
<b>M-CSF</b>	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>MGL1</b>	Makrofaj galaktoz tipi lektin-1
<b>MGL2</b>	Makrofaj galaktoz tipi lektin-2
<b>MHC</b>	Majör histokompatibilite kompleksi
<b>MHC-I</b>	Majör histokompatibilite kompleksi-I
<b>MHC-II</b>	Majör histokompatibilite kompleksi-II
<b>MMP12</b>	Makrofaj metalloelastaz 12
<b>MMP9</b>	Makrofaj metalloelastaz 9

<b>MMR</b>	Mannoz reseptörü
<b>MOG</b>	Miyelin oligodendrosit glikoproteini
<b>MRC1</b>	Makrofaj mannoz reseptörü 1
<b>MS</b>	Multipl skleroz
<b>MSS</b>	Merkezi sinir sistemi
<b>MΦ</b>	Aktif edilmemiş makrofaj
<b>NBA</b>	Nükleotid bağlayıcı alan
<b>NG2</b>	Nöron-glial antijen 2
<b>NK</b>	Doğal öldürücü hücreler
<b>NT3</b>	Nörotrofin 3
<b>OLIG2</b>	Oligodendrosit transkripsiyon faktörü
<b>OÖH</b>	Oligodendrosit öncü hücreleri
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
<b>PDGF-AA</b>	Trombosit türevli büyüme faktörü-AA
<b>PI</b>	Propidyum iyodür
<b>PKMH</b>	Periferik kan mononükleer hücre
<b>PLP</b>	Proteolipid proteini
<b>PML</b>	İlerleyici multifokal lökoensefalopati
<b>PSS</b>	Periferik sinir sistemi
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute vasatı
<b>SBA</b>	Substrat bağlayıcı alan
<b>SOCS3</b>	Sitokin sinyalleme 3'ün baskılayıcısı
<b>SOX10</b>	SRY kutusu transkripsiyon faktörü 10
<b>SPM</b>	Santral pontin miyelinozis
<b>T3</b>	Triiyodotironin
<b>TGF-β</b>	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
<b>TIAM1</b>	T hücreli lenfoma invazyonu ve metastaz 1
<b>TLR</b>	Toll benzeri reseptör
<b>TNF</b>	Tümör nekroz faktörü
<b>TREM2</b>	Miyeloid hücre 2'de tetikleyici reseptör
<b>UVB</b>	Ultraviyole B ışığı

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1: Oligodendrosit ve schwann tarafından akson üzerine oluşturulan miyelinin yapısı. ....	7
Şekil 4.1.2: Miyelin tabakasının enine kesiti. Mavi: miyelin tabakası, gri: akson. d:akson çapı, D: akson-miyelin toplam çapı. ....	8
Şekil 4.2.1: Oligodendrosit hücrelerinin gelişimsel evreleri. ....	10
Şekil 4.3.1: Farklı aksoların miyelinleşme EM görüntüleri. ....	12
Şekil 4.4.1: Miyelin yapısının yıkılması. ....	13
Şekil 4.5.1: Merkezi sinir sisteminde remiyelinizasyon süreci. ....	15
Şekil 4.6.1: Makrofajların orijini ve gelişimi. ....	16
Şekil 4.6.2: Dokulara özgü makrofajların sınıflandırılması. ....	17
Şekil 4.7.1: Makrofajların polarizasyonu. ....	19
Şekil 4.8.1: Peritoneal makrofajların orijini. ....	21
Şekil 4.9.1: Makrofajların demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecindeki rolleri. ....	23
Şekil 4.11.1: MS'de gözlenen başlıca semptomlar. ....	27
Şekil 4.12.1: İnteraktom analizinin adımları. ....	29
Şekil 4.13.1: HSPA5'in protein yapısı. ....	31
Şekil 4.14.1: EPHA7 ve ligand etkileşimi. ....	33
Şekil 4.15.1: PKMH profilinin akış sitometrisinde gösterimi. ....	35
Şekil 4.17.1: EAE fare modeli oluşturma protokolü. ....	39
Şekil 5.8.1: Periferik kandan PKMH'lerin elde edilmesi. ....	48
Şekil 5.9.1: PKMH'lerin side-scatter/forward-scatter analizi ile gösterimi. ....	48
Şekil 5.16.1: Koronal planda omurilik bölgeleri. ....	57
Şekil 6.5.1: PKMH'lerindeki monosit hücre gruplarının CD14 ve CD16 yüzey belirteci ifadelerine göre ayrı ayrı kapılanması. ....	69
Şekil 6.5.2: RRMS (EDSS 0-3) hastalarına ait üç alt grup monosit popülasyon ortalamaları. ....	71
Şekil 6.5.3: Sağlıklı bireylere ait üç alt grup monosit popülasyon ortalamaları. ....	72
Şekil 6.5.4: RRMS (EDSS 0-3) ile sağlıklı bireylerin monosit alt grup popülasyon karşılaştırılması. ....	72

<b>Şekil 6.7.1:</b> HSPA5'i ifade eden HELA hücre popülasyon oranının gösterimi. ....	75
<b>Şekil 6.7.2:</b> EPHA7'i ifade eden HELA hücre popülasyon oranının gösterimi. ....	75
<b>Şekil 6.8.1:</b> RRMS EDSS (0-3) hastaları ve sağlıklı bireylerin monosit alt grup hücrelerinde HSPA5'in normalleştirilmiş medyan değerlerinin ortalaması .....	76
<b>Şekil 6.9.1:</b> RRMS EDSS (0-3) hastaları ve sağlıklı bireylerin monosit alt grup hücrelerinde EPHA7'in normalleştirilmiş medyan değerlerinin ortalaması.....	77
<b>Şekil 6.10.1:</b> EAE ve kontrol farelerinin kilo değişimi. ....	78
<b>Şekil 6.10.2:</b> EAE ve kontrol farelerinin klinik skorlaması.....	79
<b>Şekil 6.12.1:</b> HSPA5 ifadesinin EAE ve kontrol faresi dalak hücrelerinde akış sitometrisi ile gösterimi. ....	82
<b>Şekil 7.1:</b> Makrofajların oligodendrositler üzerindeki ikili rolü.....	88

## RESİMLER LİSTESİ

<b>Resim 6.1.1:</b> LPS ve IFN- $\gamma$ ile stimülasyondan sonra M1 makrofajlarına farklılaşan naif peritoneal makrofajlar. ....	59
<b>Resim 6.1.2:</b> Fare korteksinden olgun oligodendrositler oluşturmak için geliştirilen farklılaşma protokolü. ....	60
<b>Resim 6.1.3:</b> Oligodendrosit bakımından zengin kültürler aynı zamanda OÖH de içermektedir. ....	61
<b>Resim 6.1.4:</b> Oligodendrosit bakımından zengin kültür ile M1 makrofajlarının in vitro ortak kültür platformu. ....	62
<b>Resim 6.2.1:</b> M1 makrofajları miyelin yapısını tahrip ederek ve fagositoz yoluyla miyelin kalıntılarını alarak olgun oligodendrositlerin ölümüne neden olmuştur.. ....	64
<b>Resim 6.3.1:</b> M2 makrofajları in vitro ortak kültür koşullarında olgun oligodendrositlerinin sayısını arttırmıştır. ....	65
<b>Resim 6.4.1:</b> Naif makrofajların vitro ortak kültür koşullarında oligodendrositlerin farklılaşmasını indüklemiştir. ....	67
<b>Resim 6.6.1:</b> HSPA5 proteinin HELA hücrelerindeki ifadesi. ....	73
<b>Resim 6.6.2:</b> EPHA7 proteinin HELA hücrelerindeki ifadesi. ....	74
<b>Resim 6.10.1:</b> EAE fare modeli. ....	80
<b>Resim 6.11.1:</b> EAE fare omuriliğinde demiyelinizasyon bölgelerinin gösterilmesi. ....	81
<b>Resim 6.13.1:</b> EAE ve kontrol fare dalak makrofajlarında HSPA5 ifadesi tespiti. ....	83

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 4.12.1:</b> İnteraktom analizi sonucu öne çıkan 10 protein. ....	30
<b>Tablo 5.1.1:</b> Plastik ve kimyasal malzeme listesi.....	40
<b>Tablo 5.7.1:</b> MS hasta grupları ve sınıflandırmada kullanılan EDSS skor değerleri.47	
<b>Tablo 5.11.1:</b> cDNA sentezleme reaksiyon karışımı. ....	51
<b>Tablo 5.11.2:</b> cDNA sentezleme protokolü.....	51
<b>Tablo 5.11.3:</b> M2 karakterizasyonu için forward ve reverse primerler dizilimleri... 51	
<b>Tablo 5.11.4:</b> PZR protokolü. ....	51
<b>Tablo 5.13.1:</b> EAE fare modeli klinik skorlama .....	53
<b>Tablo 6.1.1:</b> MBP <sup>+</sup> ve SOX10 <sup>+</sup> hücrelerinin M1 ve oligodendrosit ortak kültürlerindeki hücre sayıları ve yüzdesi.....	62
<b>Tablo 6.3.1:</b> MBP <sup>+</sup> hücrelerinin M2 ve oligodendrosit ortak kültürlerindeki hücre sayıları ve yüzdesi.. ....	66
<b>Tablo 6.4.1:</b> MBP <sup>+</sup> ve SOX10 <sup>+</sup> hücrelerinin naif makrofaj ve oligodendrosit ortak kültürlerindeki hücre sayıları ve yüzdesi.....	68
<b>Tablo 6.5.1:</b> RRMS (EDSS 0-3) hastalarına ait üç alt grup monosit popülasyon yüzdeleri. ....	70
<b>Tablo 6.5.2:</b> Sağlıklı bireylere ait üç alt grup monosit popülasyon yüzdeleri. ....	71

## 1. ÖZET

### MAKROFAJLARIN MERKEZİ SINIR SİSTEMİNİN NÖRAL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ANALİZİ

Multipl Skleroz (MS), bireyin bağışıklık sistemi hücrelerin başında gelen monositler/makrofajların merkezi sinir sistemini (MSS) istila etmesiyle ürettikleri antikolar ve sitokinler ile miyelin yıkımına neden olduğu bir otoimmün demiyelinizan hastalıktır. Çalışmamızda ilk olarak, makrofajların oligodendrositler üzerindeki etkisini incelemek için bir *in vitro* ortak kültür platformu oluşturuldu. *in vitro* ortak kültürlerde oligodendrosit yüzey antijenine karşı bir antikor varlığında makrofajların direkt olarak oligodendrositleri tanınması sağlanmıştır. Sonuç olarak, M1 makrofajlarının olgun oligodendrositlerin sayısını azalttığını ve miyelini fagosite ettiğini ortaya konulmuştur. İlginç bir şekilde, aktif edilmemiş makrofajlar, M2 makrofajlara benzer olarak *in vitro* ortak kültür platformunda olgun oligodendrositlerin sayısını arttırmıştır. Bu şekilde oluşturulan *in vitro* ortak kültür platformunun oligodendrositler ve makrofajlar arasındaki doğrudan hücre-hücre etkileşimlerinin araştırılması için uygun olduğu gösterilmiştir. Paralelde, makrofajlar ile oligodendrositler arasında bir interaktom analizi geliştirilmiştir. MS hastalığı sırasında biyobelirteç olarak kullanılabilir -olası protein-protein etkileşim analizinden elde edilen- HSPA5 ve EPHA7 proteinleri öne çıkmıştır. HSPA5 proteinin MS hasta kanlarında sağlıklı bireylerinkine göre daha az ifade edildiği gösterilmiştir. HSPA5 proteinin makrofajlardaki ifadelerin demiyelinizasyon süresince değişim gösterip göstermediğini araştırabilmek için deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) fare modeli oluşturulmuştur. EAE farelerin dalaklarındaki monosit/makrofajlarda HSPA5 ifadelerinin sağlıklı farelere göre daha az olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** EPHA7, HSPA5, Makrofaj, Multipl Skleroz, Oligodendrosit

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 216S470 ve 218S495 numaralı projeler ve İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerini destekleme programı kapsamında 2018-06 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## **2. ABSTRACT**

### **THE INVESTIGATION OF EFFECT OF MACROPHAGES ON NEURAL CELLS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM**

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease in which the individual's immune system cells, monocytes/macrophages, invade the central nervous system (CNS) and cause the destruction of myelin with the produced antibodies and cytokines. In this thesis, an *in vitro* co-culture platform was established to study the effects of macrophages on oligodendrocytes. *in vitro* co-cultures allowed macrophages to directly recognize oligodendrocytes in the presence of an antibody against the oligodendrocyte surface antigen. As a result, it was revealed that M1 macrophages reduced the number of mature oligodendrocytes and phagocytosed myelin. Interestingly, non-activated macrophages increased the number of mature oligodendrocytes in the *in vitro* co-culture platform, similar to M2 macrophages. It was shown that the *in vitro* co-culture platform formed in this way is suitable for investigating direct cell-cell interactions between oligodendrocytes and macrophages. In parallel, an interactome analysis between macrophages and oligodendrocytes was developed. HSPA5 and EPHA7 proteins, which could be used as biomarkers during MS disease, obtained from possible protein-protein interaction analysis, came to the forefront. HSPA5 was less expressed in the blood of MS patients than in healthy individuals. An experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model was created to investigate whether the expression of HSPA5 proteins in macrophages changes during demyelination. It was determined that HSPA5 expressions were less in monocytes/macrophages in the spleens of EAE mice than in healthy mice.

**Keywords:** EPHA7, HSPA5, Macrophage, Multiple Sclerosis, Oligodendrocyte

This thesis was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) with projects numbered 216S470 and 218S495 and Istanbul Medipol University Scientific Research Project with project numbered 2018-06.



### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Miyelin, sinir hücrelerinde hızlı ve verimli sinyal iletimi için gerekli olan lipid bakımından zengin bir yapıdır ve aynı zamanda sinir hücrelerin aksonlarına metabolik ve trofik destek de sağlamaktadır (1). Merkezi sinir sisteminde (MSS), miyelin oluşumu, oligodendrosit öncü hücrelerinin (OÖH) proliferasyonu ve beyaz cevher alanlarına göçü ile başlamaktadır (2). Hedef aksonları tanıdıktan sonra, OÖH'ler, zarı aşan ve aksonları saran olgun miyelinleştirici oligodendrositlere farklılaşırlar (3). Büyüyen zarın uç kısımlarına doğru Galaktocerebrosit (GalC), miyelin bazık proteini (MBP), proteolipid proteini (PLP) ve miyelin oligodendrosit glikoproteininin (MOG) taşınmasıyla beraber çok katmanlı kompakt miyelin üretilmiş olur (4).

Miyelin yapısının bozulmasıyla meydana gelen demiyelinizasyon süreci içinde miyelin tarafından sarılan aksonlarda sinir uyarıları yavaşlar (1). Bu durum beraberinde oligodendrosit ölümleri ve akson yapısında bozukluklar da meydana getirebilmektedir. Miyelin yapısının yıkılmasıyla beraber ortaya çıkan inflamasyon durumunda ise miyeline karşı alınan reaksiyonla beraber çok daha fazla miyelin yıkımı ortaya çıkabilmektedir. Otoimmün demiyelinizan bir hastalık olarak bilinen Multipl Skleroz (MS)'de de buna benzer durumlar gelişmektedir (5). MS sıklıkla genç erişkinlerde görülen nörolojik problemlerin yanında ciddi fiziksel veya bilişsel yetersizliklere yol açabilen bir hastalıktır. Hastalığın relapslı remisyon MS (RRMS), birincil progresif MS (PPMS), ikincil progresif MS (SPMS) ve progresif remisyon MS (PRMS) olmak üzere alt tipleri mevcuttur (6). En yaygın alt tip olarak RRMS görülmektedir (yaklaşık olarak %87).

MS hastalığının teşhisinde ve tedavisinde önem teşkil eden "sklerozlu plaklar" daha çok pons ve omurilikte görülmektedir (7). Bu plaklar bağışıklık hücrelerinin MSS'ye infiltrasyonu ile beraber ortaya çıkan miyelin kaybı ve oligodendrosit ölümü sonucunda meydana gelmektedir. Miyelin yapısının tekrardan oluşturulması için hasarlı bölgeye OÖH'lerin göçü sonucunda ortaya çıkan remiyelinizasyon süreci ise hastalığın tüm evrelerinde görülmektedir (8). MSS'nin bu dikkate değer rejeneratif kapasitesi yaşla birlikte daha az verimli hale gelir ve MS gibi hastalıklarda klinik olarak anlamlı başarısızlık gösterebilmektedir (9).

MS sırasında, klinik çalışmalar ve deneysel hayvan modeli gözlemleri, MSS hücrelerinin, inflamatuvar süreç sırasında bağışıklık hücrelerini aktif eden sitokinler ve kemokinler ürettiğini göstermektedir (10,11). Ek olarak, OÖH'lerin MHC sınıf I moleküllerini yüksek oranda ifade etmesi bağışıklık hücrelerine antijenler sunmaktadır (12). Bu bağışıklık hücreleri miyelin kılıf bileşenlerine karşı otoreaktif hale gelip ve fokal inflamasyona neden olarak periferik dolaşımdaki fagositik hücrelerin MSS'ye infiltrasyonunun artmasına neden olmaktadır. MSS inflamasyonu sırasında aktif makrofajlar, miyelin parçalayarak ve miyelin kalıntılarını fagosite ederek demiyelinizan hastalığında immün düzenleyici araçlar olarak kritik bir role sahiptir (13,14). Makrofajların polarizasyonu çevrede mevcut olan uyarılara bağlıdır ve çoğunlukla fagositoz belirteçleri aktif makrofajlar üzerinde ifade edilmektedir (13). Aktif edilmiş makrofajların bir alt tipi, proinflamatuvar M1 makrofajlarıdır (15). M1 makrofajları, F4/80 ve CD11b gibi yüzey belirteçleri ve indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) artan aktivitesi ile karakterize edilmektedir (15–17). *in vitro* olarak, M1 makrofajları, lipopolisakkarit (LPS) ve interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ile indüksiyon yoluyla aktif edilmemiş makrofajlardan (M $\Phi$ ) ayırt edilebilmektedir (18).

MSS'de homeostazi sürdürmek için remiyelinizasyon, lokal OÖH'lerin aktivasyonu ve demiyelinizasyonun inhibisyonu ile gerçekleşmektedir. MSS'ye giren T hücreleri ve makrofajlar, aynı zamanda bu hücrelerin MSS'deki yerleşik benzerleri sitokinler, büyüme ve nörotrofik faktörler salgılar. Bu sayede OÖH'lerin demiyelinizan lezyonlara göç etmesine ve olgun oligodendrositlere farklılaşmasına neden olmaktadır (19–21). MSS'deki rejeneratif yanıtta yer alan makrofajlar, çoğunlukla anti-inflamatuvar veya M2 makrofajlar olarak bilinmektedir (22). M2 makrofajlar hasarlı dokunun onarımından sorumludur (23).

*in vitro* ortak kültürler, glia-immün etkileşimlerinin temel hücresel süreçlerini incelemek için yararlı araçlardır. Periton boşluğundan alınan makrofajlar, işlevsellikleri açısından stabil oldukları için *in vitro* deneylerde sıklıkla kullanılmaktadır (24,25). Peritoneal makrofajlar, *in vitro* miyelini fagosite kapasitesine sahiptir (26). Bu tezin ilk kısmında makrofajlar ile oligodendrositler arasındaki etkileşimin anlaşılabilmesi adına bir *in vitro* ortak kültür platformu oluşturmak hedeflenmiştir. Hücreler arası birebir etkileşimin hastalığın mekanizmasına ışık tutacağı düşünülmektedir. Peritoneal makrofajların

oligodendrositler üzerindeki doğrudan etkisini daha iyi gözlemlemek için bir oligodendrosit yüzey antijeni olan GalC'ye bağlanan bir antikor varlığında MΦ, M1 veya M2 makrofajları ile oligodendrositlerin *in vitro* ortak kültürlerini oluşturulması amaçlanmıştır.

Çalışma grubumuzun paralelede devam ettirdiği bir TÜBİTAK destekli projenin çıktısı olarak MS'i tanımlamak ve karşı tedavi geliştirmek adına interaktom analizi mevcuttur. İki ayrı hücre membranında ya da ortama salınan proteinler arasındaki interaksyonu bulmayı hedefleyen bu çalışmada toplam oligodendrositlerde 1517 protein, makrofajlarda 164 protein bulunup, tanımlanan 59730 interaksiyondan 3875'i hücreye özgü protein tespit edilmiştir. İnteraktomda merkezi olan protein-protein interaksyonlarının bağışıklık hücreleri ile oligodendrositler arasındaki etkileşimde, dolayısıyla MS'te daha önemli roller oynadığını hipotez ederek betweenness değeri yüksek olan proteinler belirlenmiştir. Öne çıkan 10 protein içinden HSPA5 ve EPHA7 tez çalışmasına dahil edilerek sinyal yolları analizi hedeflenmiştir. HSPA5, bağlayıcı immünoglobulin proteini (BiP) veya glikoz düzenleyici protein 78 (GRP78) olarak da adlandırılan ısı şoku protein ailesindedir (27). Yaygın olarak endoplazmik retikulumda (ER) bulunur. Hücre yüzeyinde bulunan izoformu hücre canlılığı, apoptoz ve bağışıklığın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (27). HSPA5 üzerine yapılan çalışmalar daha çok kanser alanında olduğundan MS hastalığındaki etkileri hakkında bilgiler kısıtlıdır. Bunun yanı sıra, Efrin tip A reseptörü 7 (EPHA7) protein ifadesi sağlıklı bireylere kıyasla MS hastalarının beyaz cevherinde yaklaşık 13 kat artmış olarak gözlenmiştir. İnteraktom analizinden elde ettiğimiz sonuçlarda ise betweenness değeri en yüksek olan protein EPHA7 olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında hem HSPA5 hem de EPHA7'nin MS hastalarından alınan kanlarda ifade seviyesine bakılması hedeflenmiştir.

*in vitro* çalışmalarının yanında MS hastalığının mekanizmasının daha iyi anlaşılması adına *in vivo* demiyelinizasyon çalışmaları sıklıkla yapılabilmektedir. Deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) farelerde MSS antijenleri kullanılarak indüklenen bir nörolojik bozukluklar bütünüdür (28). EAE'de genellikle saflaştırılmış miyelin kullanılarak var olan bağışıklık sistemi hücreleri miyeline karşı reaksiyon oluşturmaktadırlar (29). Kullanılan miyelin peptidine ve hayvana göre çeşitlilik gösterebilen EAE modellerinin başında MOG peptidi kullanılarak C57BL/6 farelerinde

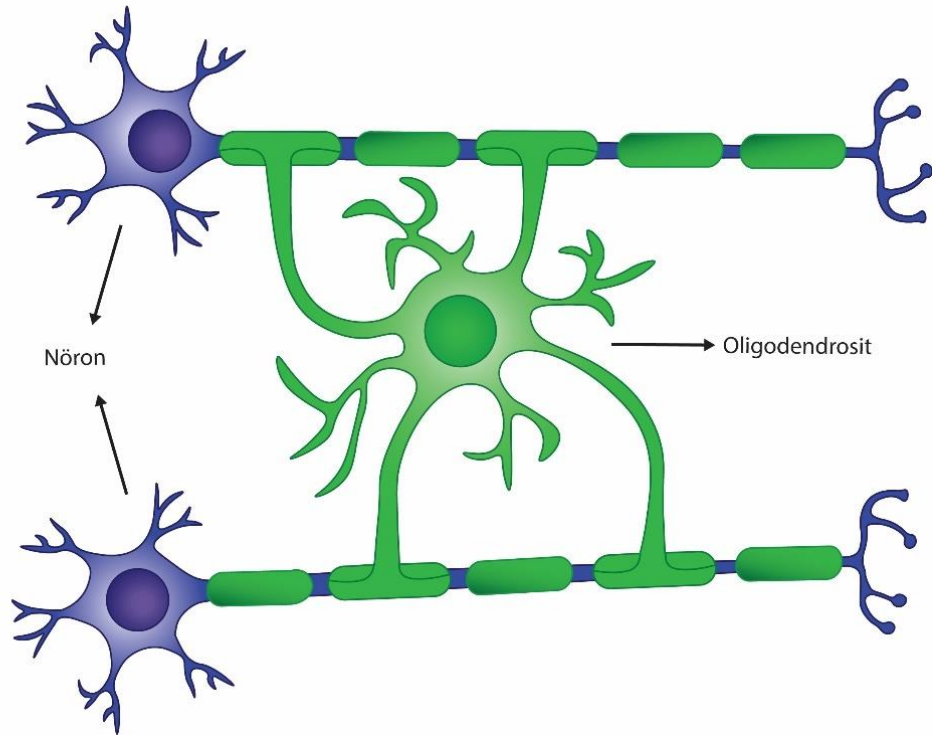
kronik ilerleyici bir hastalık indüklenir (30). Tezin ikinci kısmında, MS hastalarının kanlarından elde edilecek HSPA5 ve EPHA7 proteinleri ifadesi sonuçlarına göre EAE modelinde bu proteinlere ait sinyal yolağı çalışması yapılması hedeflenmektedir.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Miyelin ve Miyelin Oluşumu

Yapısal olarak miyelin plazma membranlarının lipit çeşitleri bakımından zengin uzantılarıdır (31). Merkezi sinir sistemi (MSS)'de bir makroglia hücresi olan oligodendroster tarafından oluşturulan miyelin, periferik sinir sistemi (PSS)'de ise schwann hücreleri tarafından oluşturulmuştur. Plazma membran uzantıları aksonlarını kat kat sararak sıkışmış bir kılıf haline gelmektedir (32). Bu şekilde aksonların miyelin ile sarılan kısımlarında elektriksel olarak izole bölgeler oluşmaktadır. Akson üzerinde miyelin tarafından sarılmamış bölgelere ranvier düğümleri denmektedir ve bu miyelinleşmemiş bölgeler atlamalı sinyal iletimini (saltatory) sağlar, böylece akson aksiyon potansiyeli iletim hızı maksimum seviyeye çıkmış olur (33) (Şekil 4.1.1).



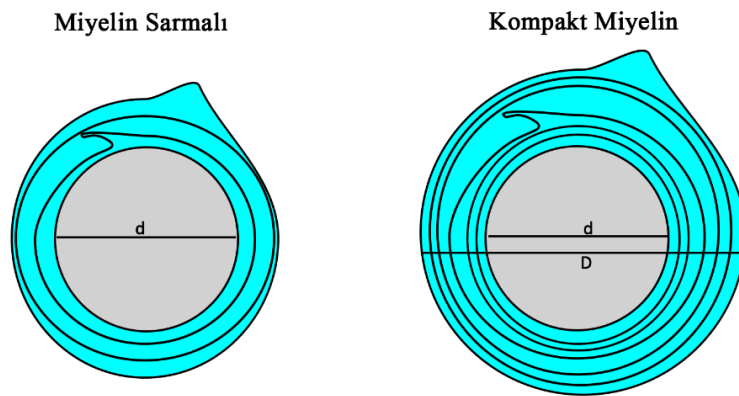
**Şekil 4.1.1:** Oligodendrosit ve schwann tarafından akson üzerine oluşturulan miyelinin yapısı.

Yapısal olarak miyelin kılıf 3 farklı kısımdan oluşmaktadır. Bunlar internod, juxtapanod ve paranod bölgeleridir (34). Aksonun miyelin kılıf ile sarıldığı bölgeler internodlar olarak bilinmektedir. Atlamalı sinyal iletiminin gerçekleştiği ranvier

düğümünün arasında bulunan internod kısımları sorunsuz ve hızlı sinyal iletimi için gereklidir. Internodlarda voltaj-kapılı-sodyum kanalları olmadığından ve yüksek dirençlere sahip olduğundan elektrik akımı bu bölgeleri atlayarak direkt voltaj-kapılı-sodyum kanalları bakımından oldukça zengin ranvier düğümlerine geçmektedir (35). Bu sayede sinyal iletimi gerçekleştirebilir.

Miyelin katmanlarının internodlarının iki ucundaki paranod bölgeleri aracılığıyla miyelin yapısı aksonlarla yüzey proteinleri aracılığı ile fiziksel temas kurabilmektedirler (36). Paranodların hemen yanında bulunan juxtapanod bölgelerinde de buna benzer bağlantılar görülmektedir. Miyelin kompakt hale geldiğinde artık sitoplazma içermezler fakat paranodların akson ile fiziksel temas kurduğu katmanlar içerisinde sitoplazma bulunmaktadır (37). Miyelin katmaları içeriği bakımından çok fazla lipid çeşitine sahiptir. Bunlar yüksek seviyelerde doymuş, uzun zincirli yağ asitleri içerir ve glikosfingolipidler (toplam lipidlerin ~%20 molar yüzdesi) ve kolesterol (toplam lipidlerin ~%40 molar yüzdesi) açısından zengindir (8). Lipitlerin yanı sıra miyelin yapısında %15-%30 arası proteinden bulunmaktadır (1).

Hem MSS'de hem de PSS'de bulunan aksonların üzerlerindeki miyelin tabakalarının kalınlıkları aynı değildir. Miyelinli bir aksonun iç-dış çapının oranına eşit olan g oranı (Şekil 4.1.2), iletim hızı ile ilişkilidir ve dolayısıyla aksonal fonksiyonu ve bütünlüğü yansıtır. G oranı cinsiyet ve yaş gibi değişken faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir (39). Yaşam boyunca değişme eğiliminde olduğunu ve yaş artıkça artma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir.



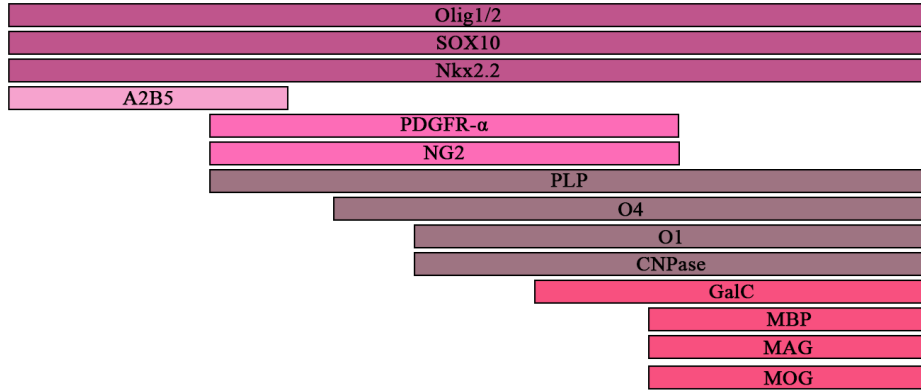
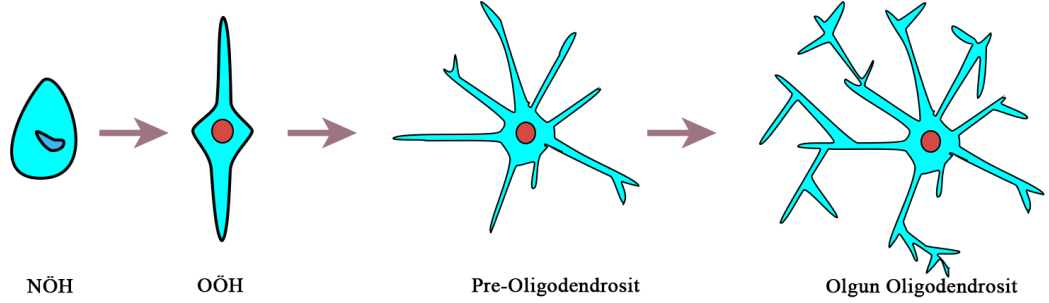
**Şekil 4.1.2:** Miyelin tabakasının enine kesiti. Mavi: miyelin tabakası, gri: akson. d:akson çapı, D: akson-miyelin toplam çapı.

## 4.2. Oligodendrositler

Oligodendrositler çok fazla uzantılara sahip ve sadece MSS'de bulunan bir makroglia hücre tipidir (40). MSS'deki başlıca görevi miyelin üretimi olan bu hücreler hem beyinde hem de omurilikte aksonların etraflarını sarmaktadır. Sonunda aksonların saracak yalıtkan myelin tabakasını üretmek için karmaşık bir çoğalma, göç, farklılaşma ve miyelinleşme programından geçmesi gereken bir hücre soyunun son ürünleridir (41). PSS'deki miyelinleşmenin aksine tek bir oligodendrosit hücresi uzantılarını 50 farklı aksonu sarabilecek şekilde uzatabilmektedir (42). Oligodendrositler miyelin oluşturmasının yanı sıra nöronlara yaşamsal fonksiyon sağlayabilen çeşitli faktörlerin de üretmesine katkı sağlamaktadır (43). Oligodendrositler, enerji metabolitlerini, sitoplazmik miyelin kanalları ve monokarboksilat taşıyıcılar aracılığıyla nöronlara aktarır, bu da piruvat ve laktat gibi kısa karbon zincirli enerji metabolitlerinin nöronlara hızlı bir şekilde iletilmesine izin vermektedir. Bu substratlar metabolize edilerek nöronlarda ATP sentezine katkıda bulunması adına kullanılmaktadır.

Oligodendrositler, kaynak olarak radyal glial hücreler, ventral ventriküler bölge ve dorsal omurilik ile beyin ve ön omurilikteki çoklu kökenlerden gelişmektedir (44). Embriyonik gelişim sırasında nöral tüpte ortaya çıkan nöral öncül hücreler (NÖH), oligodendrositler, astrositler ve nöronlar için ortak öncülerdir (45). NÖH'ler daha sonra oligodendrosit öncül hücrelere (OÖH) farklılaşmasıyla MSS'de oligodendrositlere farklılaşabilen hareket edebilen ve çoğalma kapasitesi yüksek progenitör hücrelerin havuzunu oluşturmaktadır. OÖH'lerin üretimi ön beyinden, dorsal ventrikülerden ve korteksten kaynaklanır (46). Farklı özel proteinlerin ifadesine dayanarak, oligodendrosit soy hücrelerinin kökeni ve gelişimi üç aşamaya ayrılabilir. OÖH'lerden başlayarak miyelin üretebilen olgun oligodendrosit hücrelere farklılaşana kadar hücreler buldukları aşamaya bağlı olarak farklı proteinleri ifade etmektedir (44). OÖH'lere özgü OLIG2, NG2 ve trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü- $\alpha$  (PDGFR- $\alpha$ ) proteinlerinin üretilmesi ilk aşamada tespit edilmiştir. İkinci aşama hücreleri olan olgunlaşmamış OÖH'ler bir önceki proteinlere ek olarak O4 proteinini ifade etmeye başlarlar. Son aşamada ise, miyelin üretebilen olgun oligodendrositler başlıca miyelin bazik protein (MBP), proteolipit protein (PLP), miyelin ilişkili glikoprotein (MAG), galaktoserebrozidaz (GalC) ve miyelin-

oligodendrosit protein (MOG) proteinlerini ifade edebilmektedir. Farklı aşamalarda farklı proteinlerin sentezlenmesi hücre gruplarının birbirinden ayrıştırılabilmesi için bir belirteç olarak kullanılabilir.



Şekil 4.2.1: Oligodendrosit hücrenin gelişimsel evreleri.

### 4.3. Merkezi Sinir Sisteminde Miyelinizasyon

Omurgalı hayvanlarda sinir sistemi, MSS ve PSS olmak üzere temelde iki ayrı bölümden oluşmaktadır. MSS ise iki farklı yapının bir araya gelmesiyle adlandırılır. Bu bölümlerden birini beyin iken diğer kısmı ise omuriliklidir. Ak madde ve boz madde adı verilen yapılar, beyin ve omurilik içinde görülen oluşumlardır (47). Beyinde dış kısım boz madde, iç kısım ak madde olarak ayrılır fakat omurilikte bu durum tam tersidir. Ak madde diye adlandırılan bölgelerde yoğunlukla akson uzantıları ve bu uzantıları saran miyelin yapıları bulunmaktadır. Boz madde diye adlandırılan bölgelerde ise nöron gövdeleri ve miyelinleşmemiş aksonlar mevcuttur.

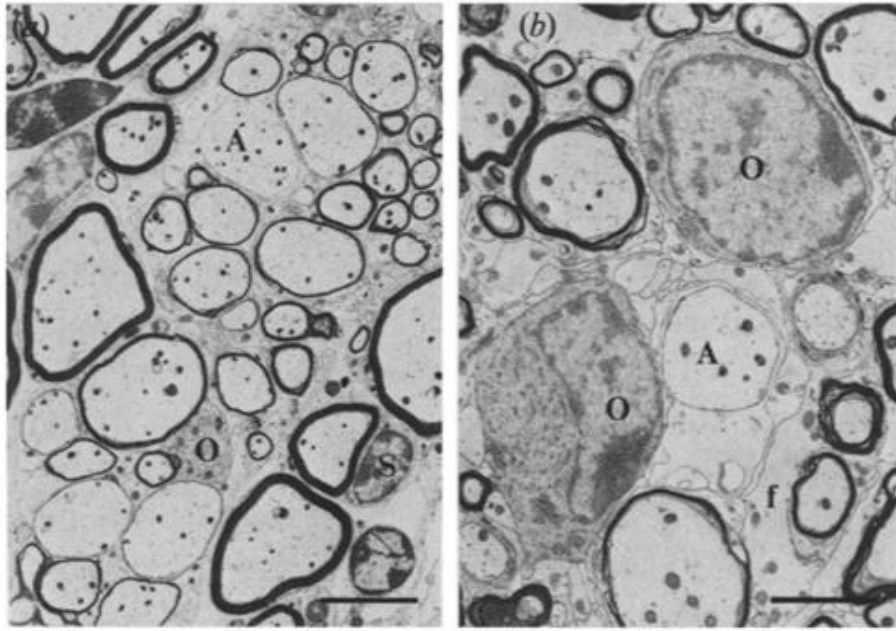
MSS'deki aksonların miyelinasyonu, oligodendrositlerin çok sayıda aksonu özelleşmiş bir zar ile sarması ile gerçekleşmektedir (48). Tek bir oligodendrositin miyelin kılıfları kalınlık ve uzunluk bakımından farklılık gösterebildiğinden, akson



kılıfını miyelin büyümesiyle koordine eden mekanizmalar oligodendrosit hücresi tarafından sağlanmaktadır. MSS’de oligodendrositler çok sayıda nöronal aksonu sarar ve aksonla yakından ilişkili katmanlı bir zar yapısı olan miyelin oluşturur (32). Miyelinleşme süresinde, miyelinleştirici oligodendrositler korteks ve omurilikteki germinal bölgelerde belirtilen OÖH’lerden üretilir ve bütün sinir sistemine önemli ölçüde göç ve çoğalma gösterir (49). Araştırmalara göre, embriyonik gelişim sırasında OÖH göçünün ön beyin boyunca dağılmak üzere beyin damar sistemi boyunca göç ederken, Wnt sinyali ve kemokin reseptörü C-X-C kemokin reseptörü tip 4 (CXCR4) yoluyla endotel hücreleri ile etkileşimler tarafından yönlendirildiğini göstermektedir (50). OÖH’ler normal koşullar altında ve demiyelinizan yaralanmaları takiben yeni oligodendrositler üretmeye devam ettikleri yetişkin CNS’de migrasyon ve motilite kapasitesini korumaktadır (51). OÖH dağılımının nöronal aralığı yöneten benzer moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenip düzenlenmediği bilinmemekle birlikte, deneysel olarak indüklenen bir OÖH ablasyon modelini inceleyen son çalışmalar, yetişkin MSS’de OÖH’lerin yeniden popülasyonu ve dağılımında netrin sinyallemesinin bir rolü olduğunu göstermiştir (52).

OÖH farklılaşması ve miyelinasyonu sırasında membran uzantıları ince zar aksonları saran çok katmanlı miyelin yapılarına dönüşmektedir (49). Bu dönüşüme hücre iskeletinin derin bir yeniden düzenlenmesinin eşlik ettiği bilinmektedir. Akson seçimi ve akson sarılması için birden fazla model fikri ortaya atılmıştır (53,54). Bu hipotezlerden biri yeni oluşan miyelin zarının, aksonu sarmadan önce, bir parça halıyı sarmaya benzer şekilde, akson boyunca bir tabaka oluşturacak şekilde uzunlamasına uzanmasıdır. Bununla birlikte yapılan elektron mikroskobu (EM) çalışmaları yeni oluşan miyelin kılıfının kalınlığının bir akson boyunca farklılık gösterdiğini ve miyelinin büyümesinin internod uzunluğu boyunca tekdüze olmama olasılığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.3.1). Hangi aksonların miyelinleşeceği tam olarak bilinmemekle beraber, genel olarak çapı 1 µm ve üstü kalınlıktaki aksonları sardığı görülmüştür (55). Ayrıca, 0.2 µm’den küçük çaplı aksonların da büyük bölümünün hiç miyelinlenmeden kaldığı bilinmektedir. Sonuç olarak akson çapının miyelinleşme süresince belirleyici bir role sahip olduğu gösterilmiştir.

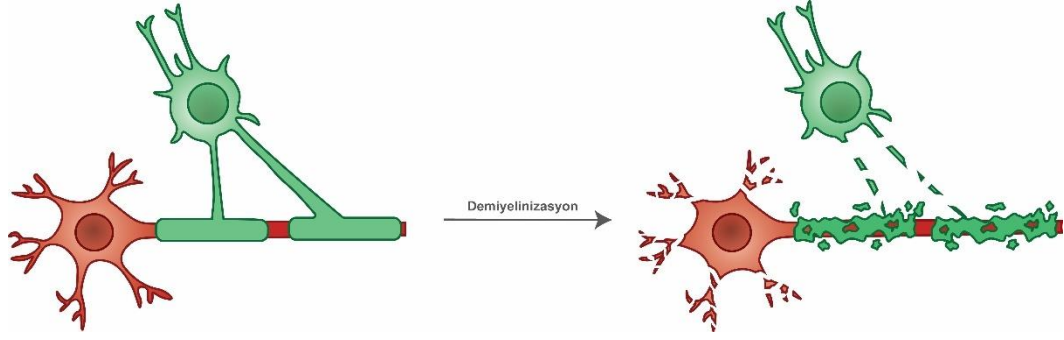
Oligodendrosit membranının miyelin kılıf oluşturma sırasında aksonlarla yakın temas halinde olduğu göz önüne alındığında, aksonal sinyallerin miyelinizasyon programını yönlendirmesi makul görünmektedir. Bununla birlikte, aksonların yokluğunda kültürlenmiş oligodendrositler, miyelin genlerini ekspres eder ve oligodendrositler, sabit aksonları ve sentetik lifleri miyelinleştirebildiği gözlemlenmiştir (56). Sonuç olarak, oligodendrositler miyelinizasyon süresince dış sinyaller ile de uyarılabilmektedir.



**Şekil 4.3.1:** Farklı aksoların miyelinleşme EM görüntüleri (57).

#### **4.4. Merkezi Sinir Sisteminde Demiyelinizasyon Süreci**

Demiyelinizasyon, beyindeki sinir liflerini, optik sinirleri ve omuriliği çevreleyen koruyucu miyelin kılıfa zarar veren herhangi bir durumu tanımlamaktadır (Şekil 4.4.1). Miyelin kılıfı hasar gördüğünde sinir uyarıları yavaşlar ve hatta durur ve nörolojik sorunlara neden olur (58). Bu nedenle miyelin hasarı sonucu MSS işlevleri aksar. Demiyelinizasyon, miyelin yıkımına yol açan patolojik olayların öncelikle miyelin kılıflarına veya miyelini oluşturan ve koruyan hücrelere yönlendirildiği, buna karşın aksonların nispeten korunduğu bir süreç olarak tanımlanabilmektedir (59). Miyeline yönelik inflamasyon reaksiyonlarının bazıları ikincil olarak aksonlara zarar verebilmektedir.



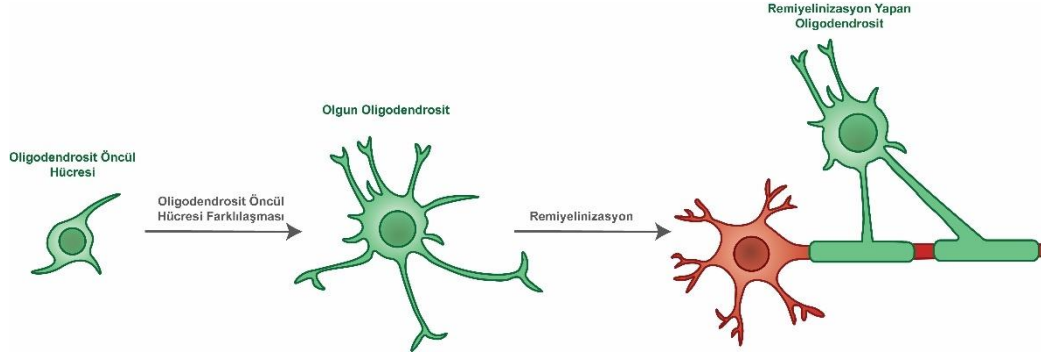
**Şekil 4.4.1:** Miyelin yapısının yıkılması.

Demyelinizasyon kaynakları birden fazla görülebilmektedir (60). MSS'de görülen demyelinizasyon patogenezinin göre birkaç kategoriye ayrılabilir: inflamatuvar süreçlere bağlı demyelinizasyon, viral demyelinizasyon ve edinilmiş metabolik düzensizliklerin neden olduğu demyelinizasyon. İnflamasyon kaynaklı demyelinizasyon hastaları şu şekilde sınıflandırılabilir: Multipl skleroz, akut diseminat ensefalomyelit (ADEM) ve akut hemorajik lökoensefalit (AHL) (61). Bunların en yaygın olan Multipl Skleroz (MS), klinik ve patolojik özelliklere göre dört ana alt tipe (klasik, akut, nöromiyelitis optika ve konsantrik skleroz) ayrılmıştır ve morfolojik ve immünohistokimyasal bulguların bir kombinasyonu temelinde plak tipleri daha da alt bölümlere ayrılmıştır. Hastalığa ait daha detaylı bilgi 4.10 numaralı başlıkta verilmiştir. İnsanlarda başlıca viral demyelinizasyon hastalık papovavirüs JC virüsünün neden olduğu ilerleyici multifokal lökoensefalopati (PML) (62). Ergenlerin yaklaşık %50'si ve yetişkinlerin %75'i JC virüsü enfeksiyonunun kanıtlarına sahiptir fakat genellikle asemptomatiktir (63). Virüs, B hücreleri, böbrek ve MSS'de gizli enfeksiyon oluşturur. Reaktivasyon, hücre aracılı bağışıklığın bozulduğu koşullarda, örneğin organ transplantasyonundan sonra, lösemili veya lenfoma hastalarında veya edinsel bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS) hastalarında meydana gelmektedir. Edinilmiş metabolik düzensizliklerin neden olduğu demyelinizasyon sınıfında en yaygın hastalıklar santral pontin miyelinozis (SPM) ve ekstrapontin miyelinozis (EPM). Çok nadiren, kronik alkolizm ve yetersiz beslenme (Marchiafava-Bignami hastalığı) ile birlikte demyelinizasyon meydana gelir (60).

#### 4.5. Merkezi Sinir Sisteminde Remyelinizasyon Süreci

Remyelinizasyon, miyelin hasarından sonra organizma tarafından oluşturulan bir yanıttır (64). MSS'nin hem gri hem de beyaz maddesi boyunca dağılmış olan OÖH'ler, miyelin hasarına yanıt olarak aktif olur, proliferasyona uğrar, hasar bölgesine göç eder ve olgun miyelinleştirici oligodendrositlere farklılaşır. Sonuç olarak, miyelin kaybı görülen yerde yapının tekrar oluşturulması hedeflenmektedir (65). Bu süreç organizmada doğal olarak düzenlenir ve sağlıklı bir MSS'de çok verimli olma eğilimindedir. MSS'nin bu dikkate değer rejeneratif kapasitesi yaşla birlikte daha az verimli hale gelir ve MS gibi hastalıklarda klinik olarak anlamlı başarısızlık gösterebilmektedir (66). Miyelin kılıfı olmadan nöronal fonksiyon ve hayatta kalma tehlikeye girer bu da aksonal dejenerasyona ve nörolojik fonksiyonda ilerleyici bozulmaya yol açmaktadır. Remyelinizasyonu artırmaya yönelik terapiler, kronik demiyelinizan hastalığın nörolojik düşüşünü önlemenin bir yolunu sunabilir. Bu tür tedavileri geliştirmek için, remiyelinizasyon sürecinin, dahil olan ana hücresel oyuncuların ve remiyelinizasyon başarısızlığının mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Remyelinizasyon dört farklı aşamada sınıflandırılabilir: (i) OÖH proliferasyonu; (ii) OÖH'lerin hasar alanına doğru göçü; (iii) OÖH farklılaşması ve (iv) olgunlaşmamış oligodendrositlerin miyelinsiz aksonlarla etkileşimi (67). Bu aşamalar, çeşitli hücre dışı faktörler ve hücre içi sinyaller tarafından düzenlenebilmektedir. MS'nin erken evresi remiyelinizasyon ve fonksiyonun geri kazanılması ile karakterize olmasına rağmen, remiyelinizasyon sonunda belirsiz nedenlerle sınırlı kalabilmektedir. Demiyelinizan MS lezyonlarının yaklaşık %70'inin bol OÖH içerdiği tahmin edilmektedir (68). Bu yetersiz OÖH farklılaşmasının en azından kısmen MS'de zayıf remiyelinizasyona katkıda bulunduğunu göstermektedir.

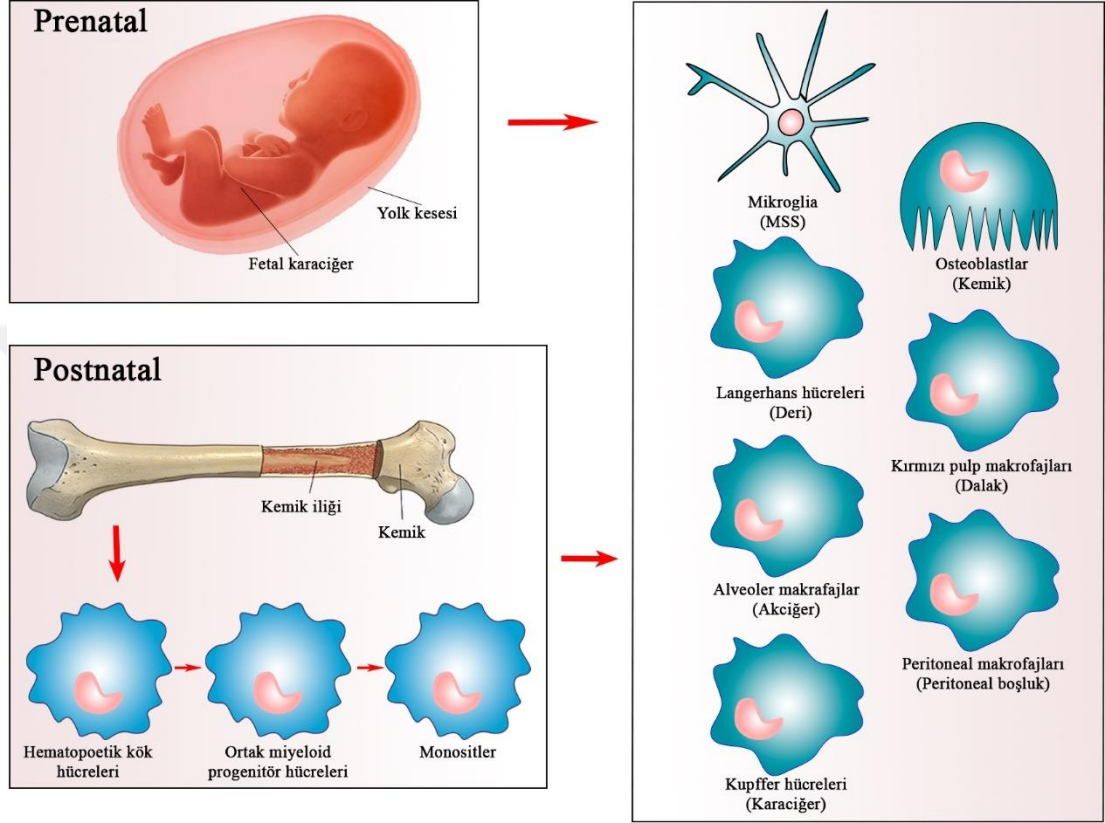


**Şekil 4.5.1:** Merkezi sinir sisteminde remiyelinizasyon süreci.

#### 4.6. Makrofajlar

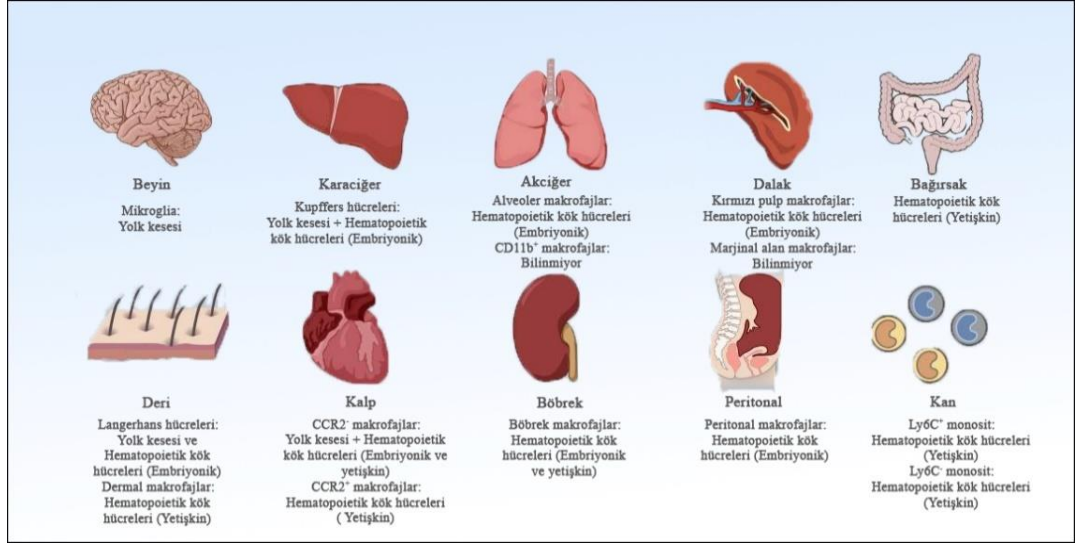
Periferik kandaki kemik iliği öncüllerinden ve ana monositlerden türetilen makrofajlar, doku hasarı veya enfeksiyonundan sonra konakçı dokuların homeostazına dönüşünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin çok işlevli hücreleridir (69). Bunu, büyük partikül maddeleri yutarak ve uzaklaştırarak ve ayrıca çevrelerindeki ortamın moleküler ve hücre yapısını değiştirerek başarabilmektedirler. Makrofajlar, 1970'lerin ortalarında keşfedilmeleri üzerine dahil edilen monositler ve dendritik hücreler ile birlikte kurulan mononükleer fagositoz sisteminin bir parçası olarak sınıflandırılmıştır (70). Makrofajlar mezoderm kaynaklı hematopoietik hücreler olarak kabul edilmektedir. Embriyonik hematopoez, bağımsız dalgalarda meydana gelir ve organlar arasında zamansal ve uzamsal olarak koordineli bir şekilde yer değiştirir. Kemirgenlerde, ilk dalga genellikle geçici olarak kabul edilir ve ekstraembriyonik yolk kesesinin kan adalarında embriyonik yedinci günde başlar. Onuncu günde embriyonun aort gonad-mezonefrozunun (AGM) hematojenik endotelinde ikinci bir dalga başlatılır. Bu kesin hematopoez olarak adlandırılan, çekirdeklenmiş eritrositler verir ve tam multihematopoietik soy potansiyeli barındıran sınırlı sayıda kök hücre üretir. Çoğunlukla AGM'den türetilen, fakat aynı zamanda yolk kesesinden türetilen hematopoietik progenitör hücreler daha sonra fetal karaciğeri kolonize eder, bu da geçici olarak hematopoezin baskın embriyonik bölgesi haline gelir. Yolk kesesi kan adalarında ilkel makrofajlar görülmektedir. Bu hücreler yolk kesesinden kan dolaşımının sağlanmasıyla yayılmaktadır (71). Postnatal orijin olarak kemik iliği gösterilmektedir (72). Dalak ve

kemikiliği gibi doğum sonrası murin birincil hematopoietik organları, dolaşım sistemi yoluyla fetal karaciğer kaynaklı hematopoietik progenitörler tarafından kolonize edilir ve nihayetinde özel nişlerde hematopoietik kök hücrelere (HKH) ev sahipliği yapar (Şekil 4.6.1).



Şekil 4.6.1: Makrofajların orijini ve gelişimi.

Makrofajlar, yetişkin memelilerde, büyük anatomik ve fonksiyonel çeşitlilik gösterdikleri tüm dokularda bulunurlar (73). Vücuttaki dokuların çoğu, dokuda yerleşik makrofaj popülasyonları içermektedir (Şekil 4.6.2) (74). Dokuda yerleşik makrofajlar son derece heterojendir; bu, doku işlevi ve homeostazın ayrılmaz bir parçası olan gelişim ve yetişkinlik sırasında dokuya özgü ve mikroanatomik nişe özgü işlevlerin gerekli bir sonucudur (75). Bu fenotiplerin kökenlerinin heterojenliğini ve içinde buldukları doku ortamının etkisini yansıtmaktadır. Bununla birlikte, bu hücreler, patojenler veya çevresel zorluklarla karşılaşmak için ayrı bir şekilde konumlandırıldıkları ve transkripsiyonel olarak programlandıkları doku savunmasının ön cephesinde bağışıklık koruyucuları olarak rolleriyle bilinmektedirler (76).



**Şekil 4.6.2:** Dokulara özgü makrofajların sınıflandırılması.

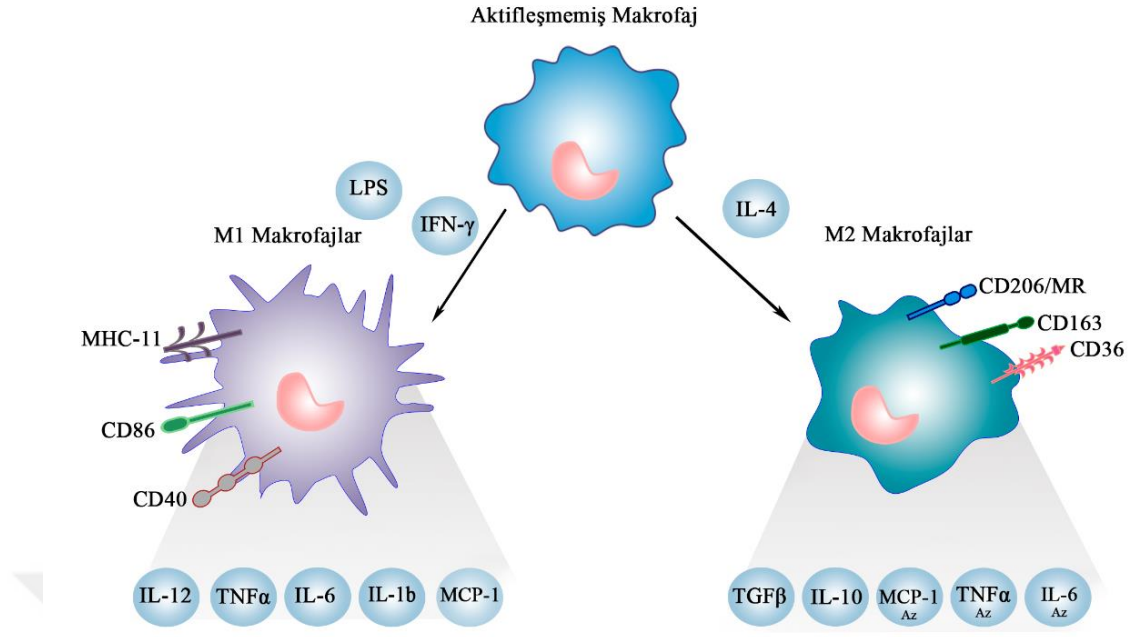
Makrofajlar, her dokuda bulunan ve homeostaz için gerekli olan doğuştan gelen bağışıklık hücreleridir (77). Makrofajlar, kararlı durum sırasında eritrositlerin geri dönüşümü ve temizlenmesi, apoptotik hücrelerin ve hücre kalıntılarının uzaklaştırılması, doku yeniden şekillenmesi ve bulaşıcı hastalığa karşı konak tepkilerinde yer alan profesyonel fagosite edebilme yeteneğine sahiptir (78). Makrofajların birinci rolünün homeostazı korumak olduğu için yabancı istilacılara karşı konak savunmasını, nekrotik ve apoptotik kalıntıların temizlenmesini ve yaralanmayı takiben doku yeniden şekillenmesini içermektedir. Bu rolleri dört temel doğuştan gelen işlev aracılığıyla yerine getirir: algılama, kemotaksis, fagositoz ve onarım. Makrofajlar, adaptif immün yanıtları teşvik etme yeteneğine sahip olsalar da bir yanıtı başlatmak için belirli bir antijene önceden maruz kalmayı gerektirmediklerinden, doğuştan gelen efektör hücreler olarak kabul edilmektedirler (79). Son on yılda birçok grubun yaptığı çalışma, makrofajların, doku ortamından kaynaklanan sinyallere yanıt olarak epigenetik olarak programlanmış, dikkate değer ölçüde plastik hücreler olduğunu ortaya koymaktadır (73). Makrofajlar, endokrin veya parakrin sinyallerini fagosite edilmiş hücrelerden, mikro veziküllerden ve hücre dışı matristeki moleküllerden kaynaklanan sinyallerle bütünleştirebilir. Ayrıca makrofajlar, dokuda yerleşik diğer hücre popülasyonları, yaralanma sırasında toplanan bağışıklık hücreleri ve hücre dışı proteinler üzerindeki yüzey reseptörleri ile doğrudan etkileşime girebilmektedir (80).

Makrofajların, sitotoksik ve proinflamatuvar mediatörler ürettikleri, istilacı mikroorganizmaları temizledikleri, apoptotik ve hasarlı hücreleri uzaklaştırdıkları ve tümör ilerlemesini teşvik ettikleri bilinen doku hasarına akut yanıtta rolü çok fazla araştırma alanı oluşturmuştur. Makrofajların doku hasarı ve doku onarımında sıklıkla farklı roller oynadığı rapor edilmiştir (81). Bu rollerin daha iyi anlaşılması için yaralanmayı indükleyen çevresel uyarın, yaralanmanın meydana geldiği yerleşik doku mikroçevresi ve makrofajların ontogenisi ile ilişkili faktörleri göz önünde bulundurarak anca elde edilebilmektedir. Ayrıca herhangi bir makrofaj popülasyonunun doku yaralanması ve onarımındaki rolü zamanla önemli ölçüde değişebilmektedir bu da bazen aynı model sistemdeki farklı sonuçları açıklayabilmektedir. Doku hasarı ve onarımı sırasında farklı makrofaj popülasyonlarının değişen rollerini anlayabilmek için makrofaj hücrelerine ait plastisitesinin anlaşılması gerekmektedir.

#### **4.7. Makrofaj Aktivasyonu**

Makrofajlar yaralanma veya enfeksiyondan sonra oluşturulan ipuçlarına yanıt olarak fizyolojilerini hızla değiştirebilen, dikkate değer ölçüde plastik hücrelerdir (82). Makrofajların aktivasyonu, immünolojinin, doku homeostazisinin, hastalık patogenezinin ve enflamasyonun çözülmesinde kilit bir alan olarak ortaya çıkmıştır. Çevredeki mikro-ortam makrofajların aktivasyon fenotipini büyük ölçüde belirlemektedir. Makrofajların büyüme faktörlerine ve makrofajlar tarafından tanınan sitokinler, mikroplar, enfeksiyon, fagositoz gibi dış ipuçlarına yanıt olarak aktivasyon durumlarını değiştirebilmektedir (83). Bu en basit şekilde iki karşıt fenotipten oluşan bir spektrum içinde sınıflandırılabilir: klasik olarak aktive edilmiş veya M1 ve alternatif olarak aktif edilmiş M2 makrofajlardır (84) (Figür 4.7.1) Makrofajların aktivasyonu her zaman makrofaj fonksiyonunun önemli bir ön şartı olarak görülmüştür (85). Bununla birlikte, uzun bir süre için makrofaj aktivasyonu temel olarak bağışıklık tepkileri bağlamında görülmüştür.





**Şekil 4.7.1:** Makrofajların polarizasyonu.

M1 makrofajlar, proinflatuar sitokinler üreten, patojenlere karşı dirence aracılık eden makrofajlar olarak tanımlanır, ancak bunlar aynı zamanda doku yıkımına da katkıda bulunur (86). Makrofajların klasik aktivasyonu, hücre aşağıdakiler gibi uyarıları aldığı anda meydana gelir: (1) IFN- $\gamma$ , esas olarak diğer hücre tipleri (Th1 hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri) tarafından salgılanır; (2) Gram-negatif bakterilerin dış zarının bir bileşeni olan lipopolisakarit (LPS); ve (3) proinflatuar sitokinlerin üretimini uyaran granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF). M1 makrofajları, IL-1p, TNF, IL-12 ve IL-18 gibi sitokinleri salgılamak için yüksek bir yetenek ile karakterize edilir; fenotipik olarak, yüksek seviyelerde ana majör histokompatibilite kompleksi-II (MHC-II), CD68 işaretçisi ve CD80 ve CD86 birlikte uyarıcı molekülleri ifade ederler (87,88). Son zamanlarda, M1 makrofajlarının sitokin sinyalleme 3'ün baskılayıcısı (SOCS3) olarak adlandırılan hücre içi proteinin ekspresyonunu yukarı düzenlediği, NO üreten indüklenbilir nitrik oksit sentazını (NOS2 veya iNOS) aktif ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, M1 makrofajları, belirli koşullar altında, sağlığa zararlı olabilen inflammatuar süreçleri şiddetlendirebilmektedir (89). Bununla birlikte M1 makrofajları çok sayıda patojeni fagosit etme yeteneğine sahiptir ve hücre içi bakterileri öldürebilmektedir. Makrofajlar klasik aktivasyon koşulları altındayken NO sentezi, mikroorganizmalar için demir veya besin

maddelerinin kısıtlanması ve fagozomun asitlenmesi ile mikrobisidal mekanizmaları başlatabilmektedirler.

Klasik yola zıt bir yoldan aktif olan makrofajlara M2 makrofajları adı verilmektedir (90). CSF-1, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  ve IL-13, mantarlar ve helmint enfeksiyonları gibi uyarıların, yüksek konsantrasyonlarda IL-10 üreten M2 alt popülasyon polarizasyonunu desteklediği gösterilmiştir (91). M2 makrofajlar, parazitlere, doku yeniden şekillenmesine, anjiyogenez ve alerjik hastalıklara verilen yanıtlarda merkezi bir rol oynar (92). Fenotipik olarak bu popülasyon, CD206 olarak da adlandırılan makrofaj mannoz reseptörünün (MMR) ifadesi ile karakterize edilmektedir. Fakat bir çalışmada M1 ve M2 makrofajları arasında CD206 ekspresyonunda ait trspit çalışmalarında hiçbir fark gözlemlenmemiştir ve M2 makrofajlarının spesifik özelliğinin CD200R membran glikoproteininin yukarı regülasyonu olduğunu öne sürdü (93). CD163 M2 belirteci olarak önerilmiştir fakat daha yakın zamanlarda insan dokusunda, CD163'ün yalnızca transkripsiyon faktörü CMAF ile kombinasyon halinde M2 makrofaj belirteci olduğu gösterilmiştir (94). Makrofaj galaktoz C tipi lektin ailesinin iki üyesi olan MGL1 ve MGL2, alternatif aktivasyon koşulları üzerine uyarılan makrofajlarda da eksprese edilmektedir (95). Son zamanlarda M-CSF veya IL-4 uyarıların M2 polarizasyonunu teşvik etme ile ilgili bir rolü vardır. M2 makrofajları, bu proteinin M2 polarizasyonu için bir işaretleyici olarak dahil edilmesini önermektedir (96).

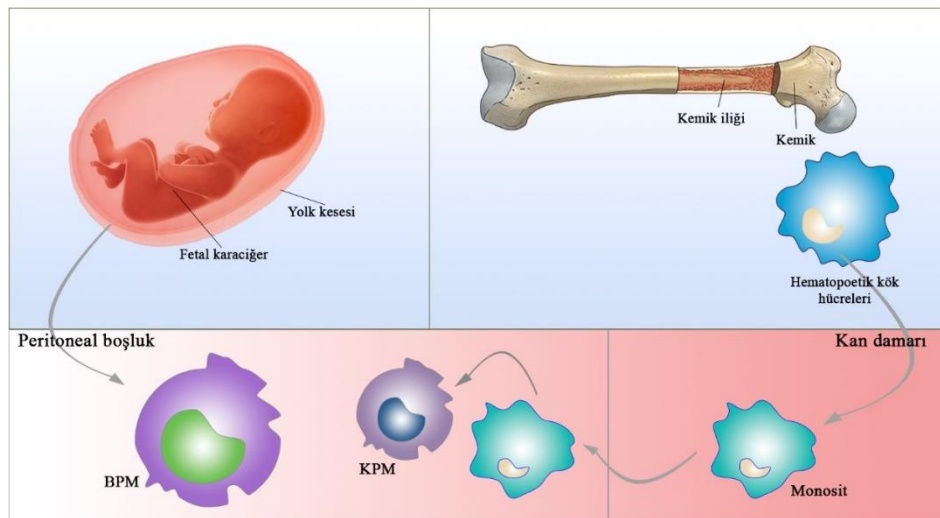
Ek olarak, beyin mikroglia, karaciğer Kupffer hücreleri, kemik osteoklastları ve akciğer alveolar makrofajlar gibi fenotipleri konumlarına benzersiz bir şekilde uyarlanmış özel yerleşik makrofajların alt kümeleri belirli bir uyarana yanıt olarak klasik veya alternatif aktivasyona doğru eğilebilmektedir (97,98).

#### **4.8. Peritoneal Makrofajlar**

Kararlı durum koşulları altında, akciğer, dalak ve peritoneal boşluğu dahil olmak üzere bazı dokular ve seröz boşluklar, farklı yerleşik makrofaj alt popülasyonları sunmaktadır (99). Peritoneal makrofajlar, çoklu efektör mekanizmalar ve immün düzenleyici işlevler yoluyla enfeksiyöz ve inflamatuvar hastalıklarda çok önemli bir rol oynamaktadır. Murin peritoneal makrofajları bu hücrelerin en çok çalışılan tiplerinden biri olmasına rağmen, homeostazda insan peritoneal makrofajları hakkında çok az şey

bilinmektedir (100). Bunun temel nedeni, bu hücrelerin sağlıklı donörlerden elde edilmesindeki zorluktur, bu da hücre içi sinyal yollarının araştırılmasını ve birincil insan olgun makrofajlarında sağlam ilaç tarama verilerinin ve doğrulamasının geliştirilmesini engellemiştir. Yapılan çalışmalarda insan peritoneal makrofajlarının fagositoz ve Toll-benzeri reseptörler (TLR) ve iltihaplanma dahil olmak üzere ana proinflamatuvar yolların aktivasyonu gibi fonksiyonel sinyal yollarına sahip olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen *in vitro* çalışmalar için insan peritoneal makrofajlarının elde edilmesindeki zorluklardan dolayı fare peritoneal makrofajları kullanılmaktadır.

Peritoneal boşluklarda iki farklı makrofaj alt grubu tanımlanmıştır: büyük peritoneal makrofaj (BPM) ve küçük peritoneal makrofaj (KPM) (Figür 4.8.1). Fare peritoneal makrofajları, hücre biyolojisi, gelişimi ve inflamatuvar yanıtlar açısından en iyi çalışılan makrofaj popülasyonları arasındadır. Peritoneal makrofajlar, enfeksiyonların ve inflamatuvar patolojilerin kontrolünde ve ayrıca immün yanıt sağlamlığının korunmasında kilit rol oynamaktadır. Bu yüzden inflamatuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (101,102). Fare peritoneal boşluktan fare başına yaklaşık  $1 \times 10^6$  makrofaj olduğu tahmin edilmektedir. Alınan hücre verimini arttırmak adına peritoneal boşluğuna tioglikolat gibi steril bir uyarıcı ajan enjekte edilmektedir. Tiyoglikolat enjeksiyonundan sonra, fare başına makrofaj verimi 10 kat artmaktadır. Fakat enjekte edilen Tiyoglikolat inflamatuvar bir yanıtı indükleyebileceği için makrofajlarda aktivasyona sebep olabilmektedir bu da naif makrofaj alımını engelleyebilmektedir.

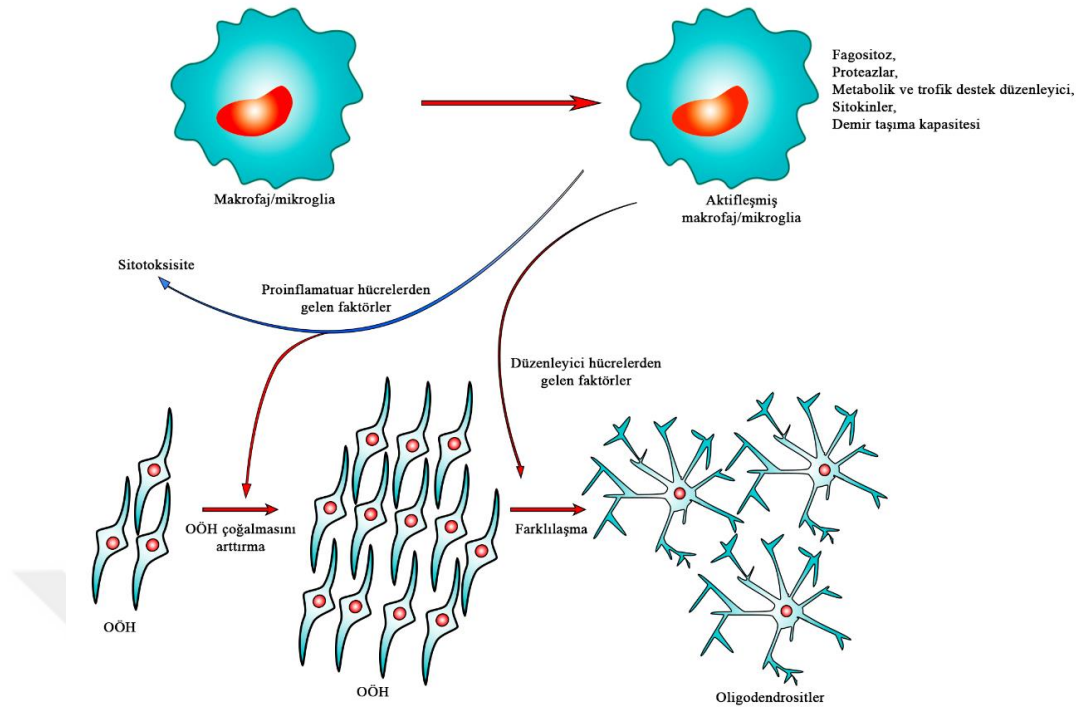


Şekil 4.8.1: Peritoneal makrofajların orijini.

Peritoneal makrofajların *ex vivo* olarak farklı uyaranlara maruz kalabilmesi belirli bir makrofaj alt tipinin fenotipini ve işlevlerini araştırmak için çok yararlı ve yaygın bir araç olmuştur. Bu hücrelerin sayısı, saflığı ve kültür kolaylığı onları çok çekici bir *in vitro* model yapmaktadır. Ateroskleroz gibi belirli bir patolojik durumda rol oynayan belirli bir makrofaj alt tipindeki düzenlenmiş yolakları kültürde araştırmak için, makrofajlar genellikle IFN- $\gamma$  + LPS (M1 makrofajlar) veya ile aktif edilmektedir (M2 makrofajlar) (103).

#### **4.9. Makrofajların Demiyelinizasyon ve Remiyelinizasyon Süreçlerindeki Rollerini**

Fare çalışmaları, mikrogliya ve yerleşik makrofajların yetişkinlik boyunca kendi kendini yenileyen popülasyonlar oluşturmak için gelişen dokulara göç ettiğini göstermiştir (104). MSS'nin yaralanması üzerine, bu hücreler, patojenlere karşı doğuştan gelen bir savunma mekanizması olarak birçok pro ve antiinflamatuvar sitokin ve kemokin salarak aktif hale gelmektedirler. Makrofajların ikili bir role sahip olmasından dolayı hem demiyelinizasyon hem de remiyelinizasyon süreçleri için ayrı ayrı olarak incelenmesi gerekmektedir. Makrofajlar bu süreçlerde farklı sinyallere yanıt olarak farklı fenotiplere farklılaşabilmektedirler (105). Çoğunlukla demiyelinizasyon sürecinde M1 makrofaj tipi görünürken remiyelinizasyon sürecinde ise M2 makrofaj tipi baskın görünmektedir (şekil 4.9.1).



**Şekil 4.9.1:** Makrofajların demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecindeki rolleri ((104)den modifiye edilmiştir.).

Demiyelinizasyon süresince makrofajlar tarafından gerçekleştirilen miyelin fagositozu MS dahil birçok merkezi ve periferik sinir sistemlerindeki demiyelinizan hastalıkların temel bir özelliği olarak bilinmektedir. MSS’de yerleşik halde bulunan mikroglialar tarafından da aynı fagositoz işlemleri gerçekleştirilebilmektedir (106). Yapılan çalışmalarda makrofajların miyelini demiyelinizasyon sürecindeki ana oyuncularmış gibi yok ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, demiyelinizasyonun başlatılması için Ranvier düğümleri, paranodlar ve internodlar dahil olmak üzere miyelinli liflerin belirli bölgelerini seçtiğini ve bu bölgelere lokalize olan spesifik bileşenlerin davranışında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Sonuç olarak makrofajların düzensizliği, otoimmüniteye ve kalıcı inflamatuvar hastalıklara yol açabilmektedir. Bilindiği üzere M1 makrofajları proinflamatuvar hücrelerdir (107). TLR ve  $INF-\gamma$  gibi ligandlarla tek başına veya mikrobiyal uyarılar veya sitokinlerle uyum içinde bağlanmasıyla klasik aktivasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadırlar. Bir diğer aktivasyon mekanizması olarak serumda bulunan immüoglobulin veya kompleman tarafından stimülasyonu gösterilebilir (108). Dinlenme durumundan M1 durumuna aktivasyonu ile beraber makrofajlar dallanan

hücre gövdesi ile TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 ve IL-23 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra CCL4, CCL5, CCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL2 ve CXCL4 dahil kemokinleri salgılamaya başlar. Ayrıca, iNOS ekspresyonu yoluyla nitrik oksit (NO) üretimi gerçekleşmektedir. Yapılan EAE model çalışmalarında, normal fizyolojik koşullar altında MSS'de infitire makrofajların az olmasına rağmen hastalık pik yaptığı dönemlerde koroid pleksus ve perivasküler boşluğu çevreleyen meninkslerde periferik makrofajların yoğun infiltrasyonu görülmektedir (109).

M1 makrofajlarının MSS'ye artan göç kabiliyetinin makrofajlardan CCR2 gibi kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin inflamasyona bağlı yüksek ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (110). Bununla beraber, CCL4'ün MSS'de daha fazla makrofaj birikimini ve efektör fonksiyonunu indüklediği bildirilmiştir

Hastalığın pik ve rezolüsyon fazları sırasında infiltre eden inflamatuvar hücreler iltihaplı lezyonlarda apoptoza ilerleyerek, iltihaplı bölgedeki infiltre hücre sayısında azalmaya neden olabilmektedir. Miyelin debirlerinin temizlenmesi sonraki fazda gerçekleşecek olan remiyelinizasyon ve fonksiyonel iyileşme için önemlidir (111). Miyelin debrilerin ortamda temizlenmesinde makrofajların önemli bir rolü olduğu doğrulanmıştır. Aktifleşmiş makrofajların üzerinde ifade edilen mannoz reseptörü CD206 ve haptoglobin-hemoglobin süpürücü reseptörü CD163'ün artan ekspresyonu ile makrofajlara ait plastisitenin ortaya çıkışını ve alternatif aktifleşmiş makrofaj olarak bilinen M2 tipi makrofajına doğru farklılaşması tespit edilmiştir. Bununla beraber, MMP9'un ayrıca aktif edilmiş makrofajların fagositik sürecinde önemli bir aracı olduğu düşünülmektedir (112). MSS yaralanmalarında monositler kemotaktik faktörlere tepki verir ve hasar bölgesine göç eder, amoeboid makrofajlara farklılaşır ve toksik olan ama aynı zamanda lezyon bölgesinin onarımına yardımcı olan bir dizi bağışıklık molekülü salgılayabilmektedir (104). Yapılan çalışmalarda, M2 makrofajlarının hastalık gelişimi boyunca M1 hücreleriyle birlikte var olduğu bilinmektedir fakat baskın hücre grubu M1 makrofajlarıdır. Hastalığın pik yapmasından sonra kademeli olarak CD206<sup>+</sup> M2 popülasyonu artış göstermiştir (109). Artan M2 makrofaj polülasyonu antiinflamatuvar sitokinleri ifade ederek inflamatuvar bir azalmaya katkıda bulunabilmektedir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda EAE baskılamada M2 hücrelerinin, önemli araçlar olduğu bilinen IL-4, IL-10, IL-13, IL-33 ve TGF- $\beta$  gibi çeşitli antiinflamatuvar sitokinleri saldığını da ortaya koymuştur

(113,114). Ayrıca, M2 hücrelerinin antiinflatuar sitokin profilleri Th2 ve Treg hücrelerinin inflamasyonlu MSS'ye alınmasını sağlar. Bunun sonucunda M2 hücreleri antiinflatuar işlevlerini uygulamak için Th2 hücreleri ve Treg hücreleri ile senkronize çalışmış olur (115).

#### **4.10. *in vitro* Demiyelinizasyon ve Remiyelinizasyon Modelleri**

*in vitro* modeller hücre-hücre etkileşimlerinin çalışmasına izin veren hücre hatlarının veya izole edilmiş memeli beyin hücrelerinin kültürlerinden oluşmaktadır (116). MSS hücre kültürleriyle ilgili çalışmalarda mikroglial hücreler (mezoderm), nöronlar, astrositler ve oligodendrositler ve ayrıca bunların öncü hücreleri (ektoderm) kullanılmaktadır. Bu çalışmalar hücrelerin MSS'de immün tepkisine rolünü tahmin edilmesini sağlayarak, biyokimyasal sinyaller gibi belirli sinyallere mikroglial tepkinin ve bu hücrelerin potansiyel aktivasyon mekanizmalarının analizini mümkün kılmaktadır. OÖH'lerin veya farklılaşmamış NKH kültürlerin, farklılaşmayı ve inflamatuvar faktörlerin etkisinin incelenmesine, oligodendrosit proliferasyonunu teşvik etmeyi amaçlayan yeni kimyasal bileşiklerin test edilmesine ve remiyelinizasyonu destekleyebilecek stratejilerin geliştirilmesine izin vermektedir (117).

Primer fare kültürleri oligodendrosit soy farklılaşma aşamalarının detaylı çalışmalarına uygun bir ortam oluşturmaktadır (118). Bu kültürlerde olgun miyelin üreten oligodendrositlerde MBP, PLP ve MOG proteinleri onlara karşı antikorlarla tanımlanabilmektedir. Bu sayede kompleks miyelin kılıfları kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Bunun yanı sıra insan hücre hatlarını da model oluşturabilmek için kullanılmaktadır (33,119). İnsan fetal oligodendrosit öncüleri, ölüm sonrası insan fetal omuriliği veya beyninden (18-23 haftalık gebelik) elde edilebilir. A2B5 antikoruna ile etiketlenmiş progenitörleri yakalayan sıçan anti-fare IgM ile kaplanmış immünomanyetik mikro boncuklar üzerinde ayırma ile %90'a kadar zenginleştirme sağlanabilmektedir. Oluşturan hücre hattı sonraki aşamalarda demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon çalışmaları için kullanılabilir.

#### 4.11. Multipl Skleroz

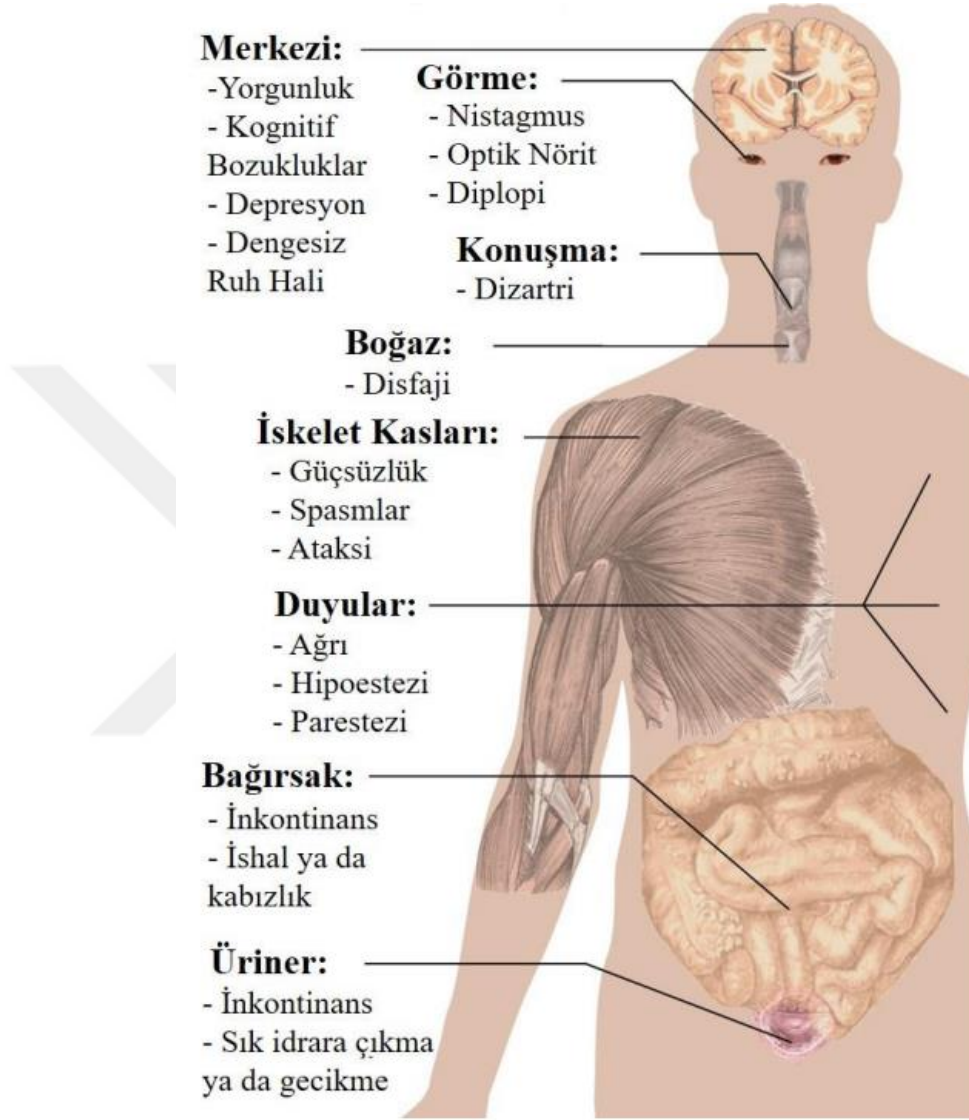
Demiyelinizasyon hastalıkları, aksonların nispi korunması ile miyelin kaybı ile tanımlanmaktadır (60). Bu, miyelin kılıflarına veya onları oluşturan hücrelere zarar veren hastalıklardan kaynaklanır. Bu hastalıklar, normal olarak miyelin oluşturma başarısız olduğu (bazen dismiyelinizasyon olarak tanımlanır) olanlardan ayrı tutulmaktadır. Demiyelinizan aksonlar atrofiye eğilimli ve sonunda dejenere olabileceği de demiyelinizan hastalıklar, aksonal dejenerasyonun önce meydana geldiği ve miyelinin degradasyonunun ikincil olduğu hastalıkları kapsamamaktadır.

MS, MSS'nin inflamatuvar demiyelinizan bir hastalığıdır (120). Sıklıkla genç erişkinlerde nörolojik problemlerin yanı sıra ciddi fiziksel veya bilişsel yetersizliklere yol açan otoimmün aracılı bir hastalıktır (Şekil 4.11.1). Fokal T lenfosit ve makrofaj infiltrasyonlarına bağlı multifokal inflamasyon alanları ve oligodendrosit ölümü, inflamatuvar hücreler ve ürünleri, demiyelinizan ve transekte aksonlardan oluşan MSS plaklarının oluşumuyla sonuçlanan miyelin kılıf yıkımının başlıca nedenleridir (121).

MS'nin alt tipleri sadece prognoz için değil, aynı zamanda tedavi kararları için de önemli kabul edilmektedir. Sınıflandırma şu şekilde yapılmaktadır: Relapslı remisyon MS (RRMS), birincil progresif MS (PPMS), ikincil progresif MS (SPMS) ve progresif remisyon MS (PRMS) (122). RRMS, öngörülemez akut ataklar ve ardından remisyon dönemleri ile karakterize en yaygın alt tiptir (yaklaşık %87). RRMS sırasında miyelin ve sinir liflerinde inflamatuvar ataklar meydana gelir. Aktifleştirilmiş bağışıklık hücreleri MSS'de görme bozuklukları, karıncalanma ve uyuşukluk, epizodik yorgunluk nöbetleri, bağırsak ve üriner sistem bozuklukları, spastisite ve öğrenme ve hafıza bozukluğu semptomları oluşturan lezyonlara neden olur (Şekil 4.11.1). MS hastalarının yaklaşık %10-15'ine omuriliğin sinirlerini büyük ölçüde etkileyen PPMS teşhisi konulmaktadır. PPMS hastaları daha az beyin lezyonuna sahip olma eğilimi gösterirler ve indüklenen semptomlar arasında yürüme, halsizlik, sertlik ve denge ile ilgili sorunlar yer almaktadır. RRMS'li hastaların yaklaşık %65'i daha sonra bu hastalığın ikinci aşaması olarak kabul edilen SPMS geliştirmektedir. Pek çok kişi artan zayıflık, bağırsak ve üriner sistem bozuklukları, yorgunluk, tutukluk, zihinsel bozukluklar ve psikolojik bozukluk yaşamaktadır. Son olarak, PRMS, hastaların yaklaşık %5'inde ortaya çıkan ve cinsel, bağırsak ve üriner sistem işlev bozukluğu, baş dönmesi ve depresyon ile birlikte göz ağrısı ve çift görme gibi semptomlarla ilişkili



olan en az görülen MS türü olarak bilinmektedir. MS genellikle 20-40 yaşları arasında tespit edilir fakat çocuklukta %1'den az, 50 yaşından sonra ise yaklaşık %2-10 oranında ortaya çıkabilmektedir (123,124).



**Şekil 4.11.1:** MS'de gözlenen başlıca semptomlar.

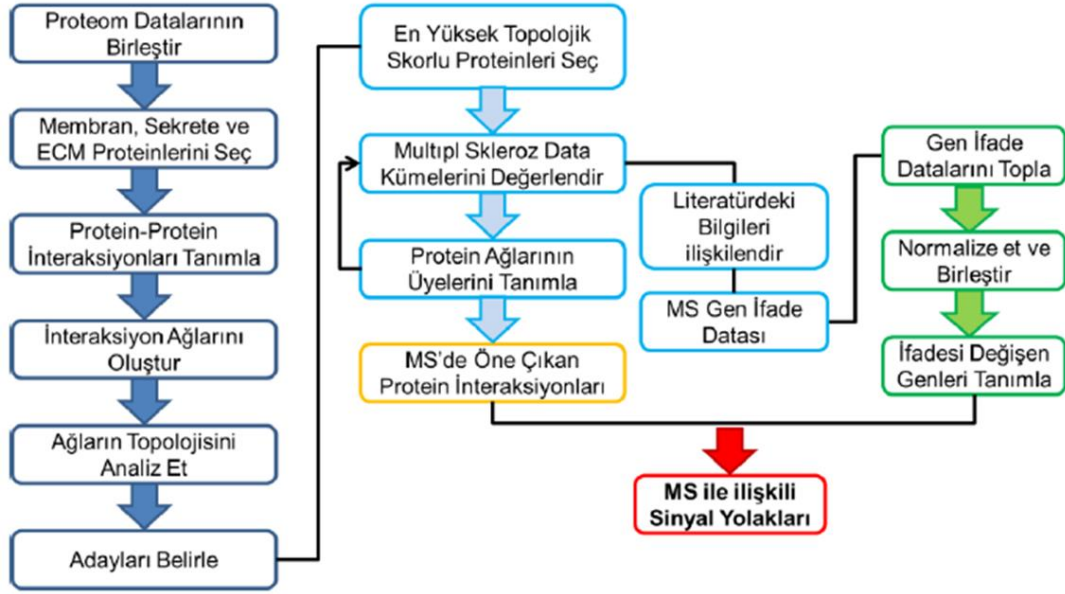
MS'in nedeninin tam olarak bilinmemesine rağmen birtakım önemli aşamalar belirtilmiştir (125). Birçok gen, özellikle D vitamini veya ultraviyole B ışığına (UVB) maruz kalma, Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu, obezite ve sigara içme gibi iyi tanımlanmış birkaç çevresel faktöre ek olarak hastalığa duyarlılığı orta derecede

artırmaktadır (126). Son zamanlarda yapılan çalışmalarca EBV'nin MS riskini artırma mekanizmasına ilişkin kanıtlar ortaya sunulmuştur (127).

MS'de görülen plaklar için ilk olarak orijinal tanımlamalarında periventriküler alanı, pons ve omuriliği etkileyen 'sklerozlu plaklar' olarak tanımlamıştır (128). Karakteristik patolojik özelliği demiyelinizan plaklara yol açan perivenüler inflamatuvar lezyonlardır. Bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonu ile beraber oligodendrosit hasarı ve demiyelinizasyon inflamasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Aksonlar, hastalığın erken evrelerinde nispeten korunmasına rağmen hastalık ilerledikçe geri dönüşü olmayan aksonal hasar gelişmektedir. MS hastalarının beyin omurilik sıvısında (BOS) oligoklonal IgG bantlarının varlığı ve aktif lezyonlarda IgG birikimi uzun süredir bu hastalığın ayırt edici özellikleri olarak bilinmektedir (129). Ek olarak, artan kanıtlar, dolaşımdaki monositlerden ve yerleşik makroglıadan türetilen makrofajların MS patogeneğinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. MS hastalarından alınan otopsi örnekleri, aktif lezyonlarda miyelin debrisini içeren makrofajlar ortaya çıkarmıştır. Son olarak, remiyelinizasyon, en yaygın olarak ilerleyici hastalıkta olmak üzere tüm hastalık evrelerinde görülmektedir (130).

#### **4.12. Proteome Analizi ile Aday Proteinlerinin Ortaya Konulması**

MS'in de içinde olduğu nörodejeneratif hastalıklarda oligodendrositler, makrofajlar ve T hücreleri ile ilgili proteom ve ekspresyon datalarının her bir hücre için ayrı ayrı elde edildiği bulunmuştur (131–135). Çalışma grubumuzun 218S495 numaralı TÜBTİAK destekli projesinin çıktısı olarak ortaya konulan ve MS'i tanımlamak ve ona karşı tedavi geliştirmek için yapılan interaktom analizi mevcuttur. Geliştirilen proteomik ve biyoinformatik yöntem ile MS'te rol alan hücreler arası etkileşimde rol alan sinyal yollarını belirlenmiştir. Bu zamana kadar yapılan proteom analizlerinin aksine geliştirilen interaktom analizinde, iki ayrı hücrede bulunan membran proteinleri veya hücre dışı proteinler arasındaki interaksiyonlardan yola çıkarak hücre içinde etkili sinyal yollarını bulmaya yönelik çalışma mevcuttur. İnteraktom analizine detaylı olarak bakıldığında, ilk aşamada bir çoklu-omiks yöntemi görülmektedir (Şekil 4.12.1).



Şekil 4.12.1: İnteraktom analizinin adımları.

Daha önceki çalışmalara ait datadan yararlanarak protein-protein interaksiyonlarının haritaları oluşturulmuştur. Bu interaksiyon haritalarından membranda, ekstrasellüler matrikste (ESM) veya sekrete olmayan proteinleri elenmiştir. Bu sayede, hücreler arası interaksiyonda görev alabilecek proteinlerden oluşan listeler oluşturulmuştur. Çalışmada oligodendrositlerde 1517 protein, makrofajlarda 164 protein bulunup, tanımlanan 59730 interaksiyondan 3875'i hücreye spesifik proteinler arasında olduğu tespit edilmiştir. İnteraksiyonda bulunan proteinler arasında en merkezi konumda olanları belirlemek için betweenness değerleri hesaplanmıştır. Betweenness değeri, protein ağlarında bir interaksiyondan geçen en kısa yolların belirlenmesi ile hesaplanır ve betweenness değeri yüksek olan interaksiyonların ağ üzerindeki etkisi yüksektir. İnteraktomda merkezi olan protein-protein interaksiyonlarının bağışıklık hücreleri ile oligodendrositler arasındaki etkileşimde, dolayısıyla MS'te daha önemli roller oynadığını hipotez ederek betweenness değeri yüksek olan proteinleri belirlenmiştir. Yayınlanmış olan gen ifade analizlerini toplayıp normalize ederek MS ve sağlıklı bireyler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir şekilde hastalarda farklı ifade edilen genler belirlenmiştir. Topolojik analiz ve gen ifade analizini hem

makrofaj-oligodendrosit hem de T hücresi-oligodendrosit interaktomları üzerinde uygulayarak öne çıkan 10 protein belirlenmiştir (Tablo 4.12.1). Ortaya çıkan aday proteinlerinden HSPA5 ve EPHA7 tez çalışmasına dahil edilerek sinyal yollarını için analizlere tabii tutulmuştur.

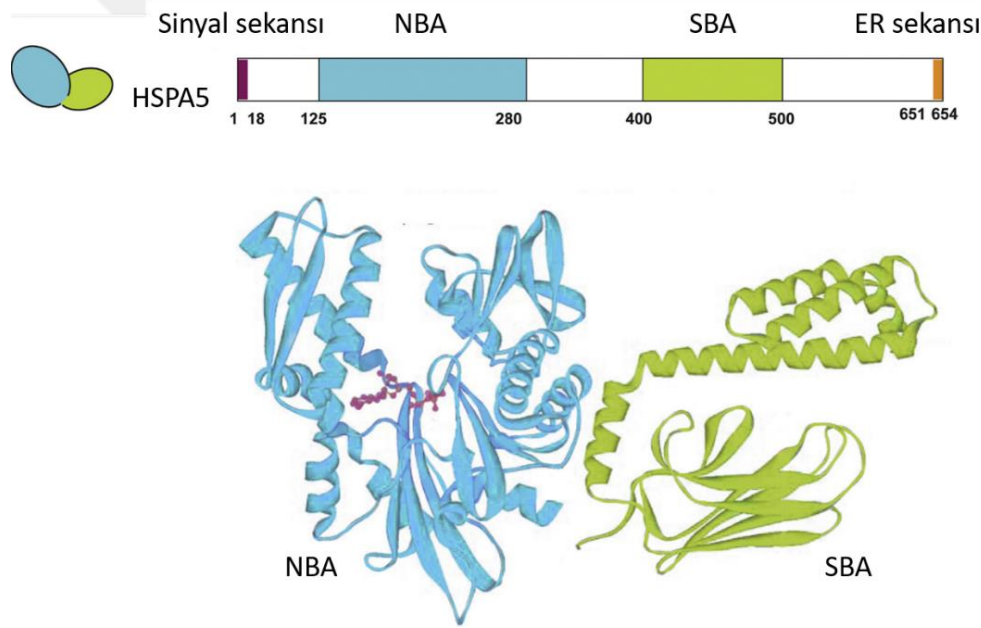
**Tablo 4.12.1:** İnteraktom analizi sonucu öne çıkan 10 protein.

Gen İsmi	UniprotID	P Değeri	Betweenness
EPHA7	Q15375	0.000141416407636228	0.19046835
HRAS	P01112	0.0173715572330032	0.03740533
HSPD1	P10809	0.0141524561309676	0.02295946
TF	P02787	0.00336686399358605	0.01705349
MYH14	Q7Z406	0.000809518308240333	0.01464166
HSPA5	P11021	0.198843845164399	0.01324923
HSPA8	P11142	0.975458563016211	0.01111337
HSP90AB1	P08238	0.0849307585647357	0.00870939
YWHAZ	P63104	0.189090005836202	0.00816913
ALB	P02768	NA	0.01211876

#### 4.13. Isı Şoku Protein Ailesi A (Hsp70) Üye 5 (HSPA5) Proteini

Bağlayıcı immünoglobulin proteini (BiP) veya glikoz düzenleyici protein 78 (GRP78) olarak da adlandırılan ısı şoku protein ailesi A (Hsp70) üye 5 (HSPA5) (OMIM: 138120), insanlarda HSPA5 geni tarafından kodlanan bir proteindir (136). HSPA5 yaygın olarak endoplazmik retikulumda (ER) bulunur. ER stresli olduğunda, HSPA5 çekirdeğe, mitokondriye ve diğer proteinlerle kompleks oluşturan hücre yüzeyine yer değiştirebilmektedir (27). HSPA5 farklı dokularda yaygın olarak ifade edilmektedir ve ökaryotik türler arasında korunmaktadır. Genetik yapıya ve mikro çevreye bağlı olarak çeşitli yarı ömür uzunlukları vardır. Bu protein, bir nükleotid bağlayıcı alan (NBA) ve substrat bağlayıcı alan (SBA) olmak üzere iki yapısal alan içermektedir (Şekil 4.13.1). Bu iki alan arasındaki etkileşim, HSPA5'nin ATPase aktivitesini ve substrat bağlama kabiliyetini kolaylaştırır, BiP'nin proteinleri ER'ye yerleştirmesine, ER'de protein substratlarını katlamasına ve tutmasına, katlanmamış protein yanıtın (KPY) başlatmasına ve ER ile ilişkili bozulmaya yardımcı olmasına izin vermektedir. Hücre yüzeyinde, HSPA5 hücre proliferasyonu, hücre canlılığı,

apoptoz ve doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığın düzenlenmesinde çok işlevli bir rol oynamaktadır. ER stres yanıtının temel düzenleyicisi olarak protein katlanmasında ve kalsiyum dengesinde rol alan ana şaperon proteindir (137). Ayrıca plazma zarında bulunan bir reseptör veya yardımcı reseptör olarak hareket ederek sinyal iletiminde yer almıştır. HSPA5, olası DNAJC10/ERdj5'in substratından salınmasını kolaylaştırmak için DNAJC10/ERdj5 ile etkileşimi yoluyla proteinlerin doğru katlanması ve yanlış katlanmış proteinlerin bozunmasını yönetmektedir (27). ERN1/IRE1 aracılı KPY anahtar baskılayıcısı olarak görev yapmaktadır. DNAJB9/ERdj4 tarafından ERN1/IRE1'in luminal bölgesine alınan gerilmemiş endoplazmik retikulumda, ERN1/IRE1'in dimerizasyonunu bozarak ERN1/IRE1'i inaktif eder. ER'da yanlış katlanmış proteinin birikmesi, ERN1/IRE1'den HSPA5/BiP'nin salınmasına neden olur ve homodimerizasyona ve ardından ERN1/IRE1'in aktivasyonuna sebep olur.



**Şekil 4.13.1:** HSPA5'in protein yapısı (136).

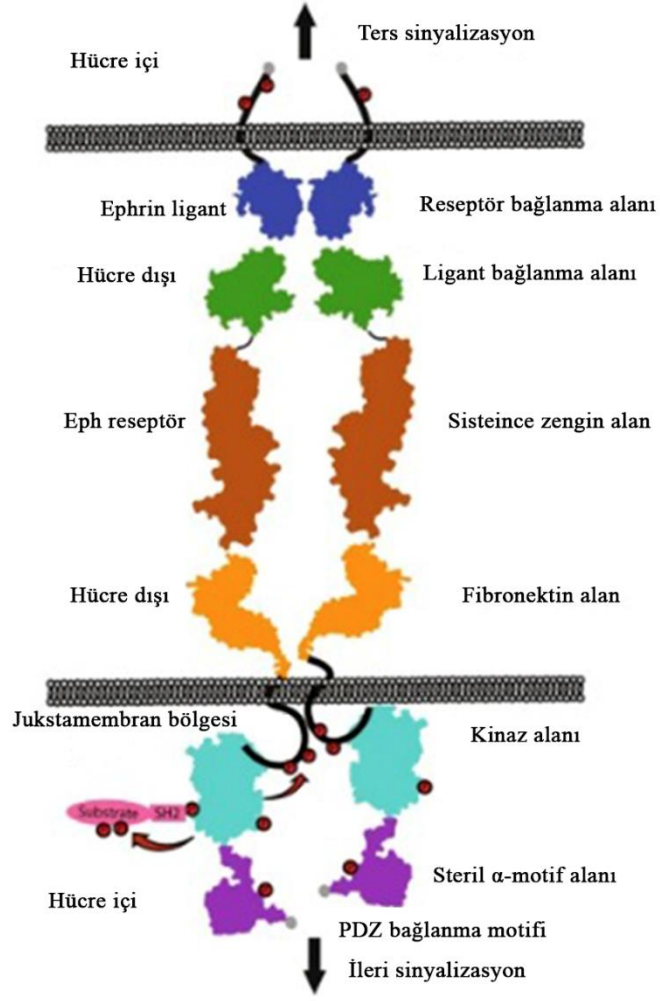
Küçük proteinlerin ER boyunca translasyon sonrası taşınmasında yardımcı bir rol oynar. SEC61 kanalı oluşturan translokon kompleksi için bir allosterik modülatör olarak işlev görebilir, muhtemelen bu öncülerin SEC61 kanalına verimli bir şekilde yerleştirilmesini sağlamak için SEC62 ile iş birliği yapmaktadır. HSPA5 dahil olmak üzere bu stres proteinlerinin düzensizlikleri, kanserler, immünolojik hastalıklar,

kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, obezite, felç ve bulaşıcı hastalıklar dahil olmak üzere birçok insan hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. HSPA5 kanser tedavilerinde hedeflenmektedir ve diğer ilgili hastalıklarda uygulama için umut vermektedir (136).

HSPA5 proteininin inhibisyonu kanser tedavilerinde yeni bir terapötik yaklaşım olarak faydalı olabileceği düşünülmüştür (138). Neoplastik büyüme, önemli miktarda yeni protein sentezini gerektirir. Bu durumda, KPY, ER aracılığıyla işlenen yüksek protein akışıyla başa çıkmak ve ER homeostazını korumak için hiperaktif edilir. KPY'de yer alan kilit proteinlerden biri HSPA5/GRP78/BiP'dir. Aslında, bir protein şaperonunun işlevini yerine getirmenin yanı sıra, HSPA5 ayrıca KPY'nin ana düzenleyicisi olarak kabul edilir. Bu nedenle, HSPA5'in melanomlu hastalarda tümör progresyonu, tümör boyutu ve kötü sonuç artışı ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bu nedenle KPY ve özellikle HSPA5, melanom tedavisinde ilginç alternatif hedefler olarak görünmektedir. HSPA5/BiP'yi hedefleyen yeni bir molekül olan HA15 ile inhibisyonu gerçekleştirilmektedir (139). HSPA5'i spesifik olarak inhibe ederek hem *in vitro* hem de *in vivo* görülen bir etki olan otofaji ve apoptozun birlikte indüklenmesiyle kanser hücrelerinin ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir.

#### **4.14. Ephrin Tip-A Reseptörü 7 (EPHA7) Proteini**

Efrin tip-A reseptörü 7 (EPHA7), EPHA7 geni tarafından kodlanan bir proteindir (140). Bu gen, protein-tirozin kinaz ailesinin ephrin reseptör alt ailesine aittir. EPH ve EPH ile ilgili reseptörler, özellikle sinir sistemindeki gelişimsel olaylara aracılık etmede rol oynamıştır. Eph reseptör proteini tirozin kinaz ailesi ve onun aynı kökenli ligandları olan ephrinlerin, esas olarak itici aktivitenin aracılık ettiği aksonal büyüme, sinaps oluşumu ve hedef tanıma ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (141). EPHA7, beş farklı ephrin A ligandı ile oldukça rastgele bir şekilde etkileşime giren sekiz reseptör tirozin kinazın bir alt sınıfının bir üyesidir (142) (Figür 4.14.1). Efrin ligandları membrana bağlıdır, bu da hücre-hücre etkileşiminde ve trans-sinaptik sinyalleşmede bir rol olduğunu göstermektedir. Bu yüzden sinaptik plastisiteyi düzenlemek için ephrin-Eph etkileşimleri önerilmiştir.



Şekil 4.14.1: EPHA7 ve ligand etkileşimi (143)'dan modifiye edilmiştir).

EPHA7 hücreler arasında sinyal iletiminde yaygın olarak yer almakla beraber hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyip nöral tüplerin ve beyin gelişimine katılmaktadır (144). Ek olarak, EPHA7 ayrıca tümör destekleyici ve tümör baskılayıcı olarak ikili bir role sahiptir. Çeşitli mekanizmalar yoluyla hücre proliferasyonu, göçü ve apoptoza katılabilir ve tümör farklılaşmasını, evrelemesini ve prognozunu etkileyebilmektedir. Bu sebeple EPHA7 potansiyel bir teşhis belirteci ve tümör tedavisi hedefi olabilir. EPHA7'nin, gen promotörünün hipermetilasyonuna bağlı olarak aşağı regüle edilmiş ekspresyonun bulunduğu foliküler lenfomada bir tümör baskılayıcı olduğu öne sürülmüştür (143). Foliküler lenfoma fare modelinin hayatta kalma oranı, EPHA7 ekspresyonu baskılandığında, tümör baskılayıcı p53'ün

yıkılmasıyla sergilenen etkiye eşdeğer olarak önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (145). Başka bir çalışmada, EPHA7'nin prostat kanserinde de tümör baskılayıcı olduğu gösterilmiştir (146).

Eph reseptörlerinin ve ephrin ligandlarının bağışıklık hücresi aktivasyonuna aracılık edebileceğine dair kanıtlar çalışmalarda gösterilmiştir (147). Fakat buna rağmen Eph-ephrin ligasyonundan kaynaklanan sinyalleme aktivasyonu nasıl etkilediği ve bu işlemin bu moleküllerin farklı immün hücre alt kümeleri üzerindeki cis ve trans içindeki ifadesinin nasıl etkilendiği açık bir soru olarak kalmaktadır. MS lezyonlarının aksonlarında ephrin-A1, EPHA3, EPHA4 ve EPHA7 ekspresyonunda artış gözlenmiştir (148). Ephrin-B1 ve ephrin-B2'nin de yakın zamanda hem deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE)'nin fare modelinde hem de insan MS'de MSS'ye T hücresi göçüne dahil olduğu gösterildi. Sonuç olarak bu moleküllerin MS'e aracılık etmedeki potansiyel önemini göstermektedir.

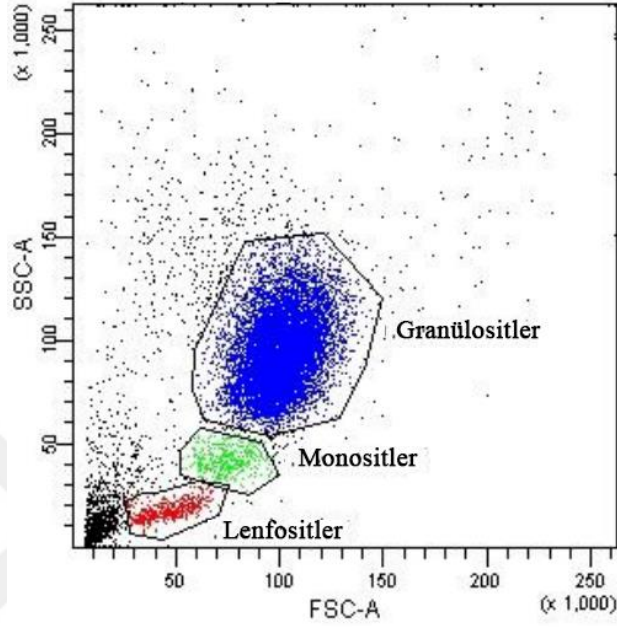
#### **4.15. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri**

İnsan periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) periferik kandan izole edilir ve yuvarlak çekirdeğe sahip herhangi bir kan hücresi (yani lenfositler, monositler, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) veya dendritik hücreler) olarak tanımlanmaktadır (149). PKMH eldesi için çoğunlukla gradient ayırıştırma yöntemi kullanılmaktadır. Kırmızı kan hücrelerine ve granüositlere (nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller) karşılık gelen hücre fraksiyonu, yoğunluk gradient santrifüjleme ile tam kandan çıkarılmaktadır. PKMH'ler düşük yoğunluklu fraksiyonda (üst fraksiyon) kalan hücre popülasyonunu oluştururken, kırmızı kan hücreleri daha yüksek bir yoğunluğa sahip olduğu için alt fraksiyonda bulunur (150).

PKMH'ler, lenfositleri (T hücreleri, B hücreleri ve NK hücreleri), monositleri ve dendritik hücreleri içermektedir. İnsanlarda, bu popülasyonların sıklığı bireyler arasında farklılık gösterir, ancak tipik olarak, lenfositler %70-90, monositler %10 ila %20 aralığındadır (Figür 4.15.1). Dendritik hücreler ise nadirdir ve sadece %1-2'dir. Lenfosit popülasyonundaki hücre tiplerinin frekansları arasında %70-85 CD3<sup>+</sup> T hücreleri, %5-10 B hücreleri ve %5-20 NK hücreleri bulunur. CD3<sup>+</sup> lenfositleri, kabaca 2:1 oranında CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinden oluşur. Aktivasyondan sonra, CD4<sup>+</sup> T hücre alt kümesi, Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, foliküler yardımcı (Tfh)



hücreler ve farklı düzenleyici hücreler gibi çeşitli efektör hücre alt kümelerine dönüşebilmektedir .CD4+ yardımcı T hücreleri, immün homeostaz ve inflamasyonun temel araçlarıdır (149).



Şekil 4.15.1: PKMH profilinin akış sitometrisinde gösterimi.

Biyobelirteçler kanda bulunsa da yüksek derecede parçalanmadan dolayı dakika tespiti zorlu bir konu olmaya devam etmektedir. Fakat monositler, lenfositler ve NK hücreleri içeren PKMH'ler, bağışıklık sistemi işlevselliklerine ve bağışıklıkla ilgili olaylara yüksek oranda katkıda bulunur; bu nedenle bozulmamış bir biyobelirteç kaynağı sağlamaktadır (151).

#### 4.16. *In vivo* Demiyelinizasyon Modelleri

DeneySEL modeller, hastalık anlayışımızı ilerletmek, spesifik ve etkili tedavilerin tasarımında çok önemlidir. MS'in deneySEL modellerinin geliştirilmesi hayvanlardaki demiyelinizan hastalıkların insan MSS hastalıklarından önemli ölçüde farklı olduğu göz önüne alındığında özellikle zordur (130,152). MS mekanizmasının anlaşılmasında 3 farklı deneySEL model geliştirilmiştir. *In vivo* demiyelinizasyon modellerinin arasında kuprizon modeli, Theiler'in murin ensefalomyelit virüsü enfeksiyonu (TMEV) ve son olarak da EAE modeli mevcuttur.

Kuprizon modeli toksik demiyelinizasyon bir modelidir (153). Bu modelde, genç yetişkin farelerin bakır şelatör kuprizon (bis-sikloheksanon oksaldihidrazon) ile beslenmesi daha sonra demiyelinizasyona yol açan oligodendrositlerin hücre ölümüne neden olmaktadır (154). Kuprizon uygulamasının neden sadece oligodendrositlerde belirli bir hücre ölümüne yol açtığı bilinmemektedir, ancak kuprizon bir bakır şelatördür ve bu da bakıra bağlı mitokondriyal enzimler sitokrom oksidaz ve monoamin oksidazın inhibisyonuna yol açmaktadır (155). Demiyelinizasyonun altında yatan kesin mekanizma bilinmemektedir ancak toksisitenin mitokondriyal stres ve doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisinin bir kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (156). Kuprizon ile indüklenen demiyelinizasyon, miyelin kılıflarına birincil bir saldırıdan ziyade oligodendrositlerin dejenerasyonuna sebep oluyor gibi görünmektedir. Kuprizona maruz kalan fareler, yoğun reaktif gliozis, mikroglia aktivasyonu ve önemli oligodendrosit apoptozu sergiler, akut demiyelinizasyonu, fareler düzenli yemle beslenirken tedavinin çıkarılmasını takip eden haftalarda meydana gelen spontan demiyelinizasyon takip etmektedir. Bununla birlikte, kuprizon tedavisi 12 haftaya veya daha uzun süreye uzatıldığında, demiyelinizasyon çok seyrek olup, bir kronik demiyelinizasyon modeli ile sonuçlanır. Fareler daha yüksek dozda kuprizona maruz kalırsa, bu karaciğerde megamitokondri oluşumuna yol açabilmektedir ve bu modelde mitokondriyal disfonksiyonun çokça görülmektedir. Bununla birlikte, spontan demiyelinizasyon, nörotoksinin kesilmesinden 4 gün sonra gözlemlenebilir, bu nedenle kuprizon modelini, demiyelinizasyonu önleyebilecek ve demiyelinizasyonu uyarabilecek faktörleri incelemek için uygun bir model haline getirmektedir.

Theiler murin ensefalomyelit virüsü (TMEV), Picornavirales takımına, Picornaviridae familyasına, Cardiovirus cinsine ait tek sarmallı bir RNA virüsüdür. TMEV 1934'te farelerin MSS'inde akut polioensefalomyeliti indükleyen bir ajan olarak keşfedilmiştir (157). İntraserebral aşılamaı takiben, bazı fare suşları enfeksiyondan bir ila birkaç ay sonra başlayan kronik, inflamatuvar, demiyelinizan bir bozukluk geliştirmektedir (158,159). TMEV enfeksiyonunun akut fazı sırasında, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri ve anti-viral antikorlar, MSS'ye girerek immün aracılı doku hasarına neden olmadan gri cevherden viral temizliğe katkıda bulunmaktadır. Ancak kronik faz sırasında, aynı immün efektör bileşenler beyaz cevherde bulunarak

immünopatolojide anahtar rol oynamaktadır (160). Genel olarak immün efektör hücrelerin, antikorların ve sitokinlerin rollerini netleştirmek için fonksiyon kazanımı ve fonksiyon kaybı yaklaşımları, CD4<sup>+</sup> T yardımcı hücreleri dahil olmak üzere anti-viral proinflamatuvar efektör moleküllerin/hücrelerin rollerinin anlaşılması için bu model kullanılabilir.

#### **4.17. EAE Fare Modeli**

EAE, bağışıklık tepkisini arttırmak için bir adjuvant içinde emülsiyon haline getirilmiş MSS antijenleri ile bağışıklamanın ardından laboratuvar hayvanlarında indüklenen bir nörolojik bozukluklar bütünüdür (28). EAE'de genellikle saflaştırılmış miyelin, rekombinant proteinler ya da miyelin proteinlerinin ensefalitojenik peptitlerini kullanır. Miyelin hasarından dolayı ortaya çıkan iltihabın yanı sıra nörodejenerasyon da MS patolojisinde görülen önemli bir özelliğidir. Bu, ikincil ilerleyici EAE'nin, kortikal demiyelinizasyon modellerinin ve deneysel inflamatuvar nörodejeneratif ve spastik hastalıkların gelişmesine yol açmıştır.

İlk olarak başka bir çalışmanın yan etkisi olarak tespit edilen EAE, aşı hazırlanmasında MSS antijenlerine karşı oluşan kontaminasyona bağlı felç olarak görülmüştür (161). Bu çalışmaların sonucunda virüs enfeksiyon yanıtından daha çok MSS'nin alerjik bir tepki gösterdiği görülmüştür. Daha detaylı bir analiz için deney yapılan hayvanların MSS dokuları alınıp maymunlarda ve tavşanlarda yeniden üretilmiştir. Oluşan bu alerji, deneysel alerjik ensefalomyelit veya deneysel otoimmün ensefalomyelit adının ortaya çıkmasına neden olmuştur.

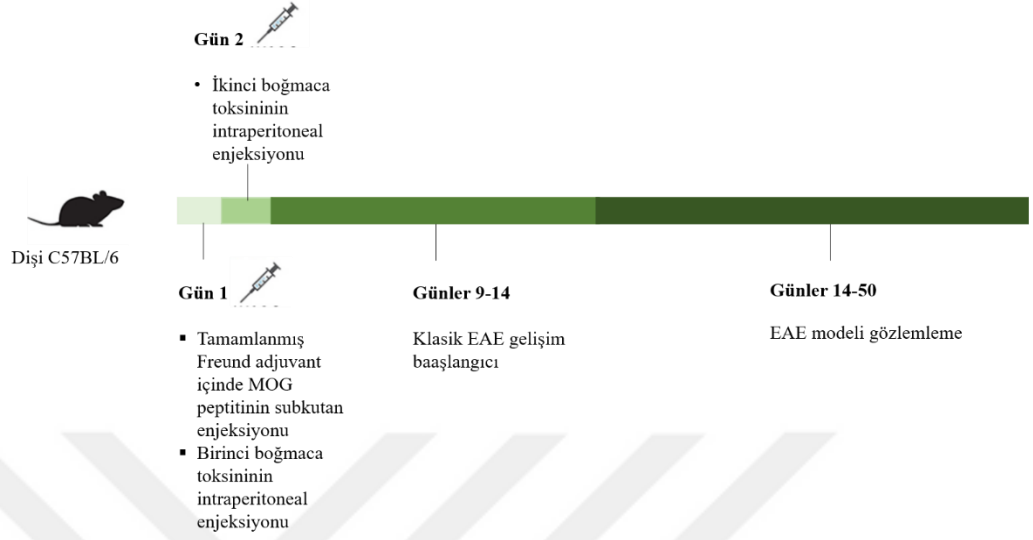
EAE, MSS'deki miyelin proteinlerine karşı bir otoimmün reaksiyon ile karakterize edilmektedir (29). EAE'yi indüklemek için iki farklı protokol kullanılabilir bundan ilki miyelin antijenlerine karşı spesifik olarak etki eden aktif edilmiş T-lenfositlerin uygulanması ikinci ise miyelin türevli peptitlerin uygulanmasıdır (162) (Şekil 4.17.1). Her ikisinde spesifik antijenik miyelin proteinlerine karşı bir immün reaksiyon gerçekleşmektedir. EAE'yi indüklemek için miyelin bazik proteini (MBP), proteolipid proteini (PLP), miyelin oligodendrosit glikoproteini (MOG) ve bunların birkaç ensefalitojenik epitopu gibi farklı tipte peptitler kullanılmaktadır (163). Bu peptitler genellikle Freund adjuvan çözeltisi içinde çözündürülen deri altı enjeksiyon

yoluyla uygulanmaktadır. Ayrıca EAE'nin bazı çalışmalarda Freund adjuvanı olmadan da indüklenebileceği gösterilmiştir (164).

EAE modelinde immün hücrelerden ana araçlar CD4<sup>+</sup> T lenfositleridir (165). CD4<sup>+</sup> T lenfositleri çoğunlukla Th1 ve Th17 altgrupları halinde bulunmaktadır. Bu hücreler MSS'ye girdiklerinde miyelin proteinlerini ve olgun oligodendrositleri hedef alarak miyelin bozulmasına, aksonal hasara ve oligodendrosit apoptoza neden olmaktadır (166). İmmünizasyon işlemine boğmaca toksininin eklenmesi, lenfositlerin kan-beyin bariyerinden (KBB) geçişini kolaylaştırmaktadır (30) (Şekil 4.17.1). T hücrelerinin beyne göçüne tipik olarak monosit ve/veya makrofaj infiltrasyonu ve aktivasyonu eşlik etmektedir (167). Bununla beraber, MSS'de bulunan yerleşik mikroglialar aktivasyona uğrayarak oluşan demiyelinizasyona katkıda bulunurlar (168). Tüm bu hücre tiplerinin kemokinler ve sitokinler gibi inflamatuvar araçları üretilip salındığı, böylece aksonal hasara ve demiyelinizasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

EAE modelinde enjeksiyondan 9-14 gün sonra öncelikle omurilikle sınırlı demiyelinizasyon zirvesine ulaşılmaktadır (Şekil 4.17.1). Spesifik olarak, felç kuyruktan başlayıp daha sonra arka uzuvları etkilemektedir (169). EAE modelinin patolojik özellikleri hem kullanılan peptidin çeşidine hem de kullanılan hayvan tipine göre önemli ölçüde değişmektedir. Örneğin, C57BL/6 farelerinde, MOG'nin ensefalitojenik epitoplari, kronik ilerleyici bir hastalığı indüklerken, NOD/Lt ve SJL farelerinde ve Lewis sıçanlarında bunlar, değişken şiddette kronik, tekrarlayan bir hastalığa neden olur (30,170). B6 ve SJL fareleri, MBP immünizasyonuna direnç göstermektedirler fakat MOG immünizasyonunda iyi yanıt vermektedirler. Ayrıca SJL farelerinde fareler daha önce miyelin oligodendrosit glikoproteini için özgü bir T hücresi reseptörü taşımak üzere tasarlanmışsa kendiliğinden tekrarlayan bir EAE indüklenebilmektedir (171). Son olarak hastalığın seyri yaş ve cinsiyete göre farklılık

gösterebilmektedir. Örneğin, SJL, ASW ve NZW dişileri erkeklere kıyasla MS'e benzeyen daha yüksek bir EAE insidansı göstermektedir (172).



**Şekil 4.17.1:** EAE fare modeli oluşturma protokolü.

## 5. MATERYAL ve METOT

### 5.1. Malzeme Listesi

Tez çalışması boyunca kullanılan tüm malzemeler Tablo 5.1.1’de verilmiştir.

**Tablo 5.1.1:** Plastik ve kimyasal malzeme listesi.

<b>Plastik malzemeler</b>	<b>Marka, Katalog numarası</b>
Santrifüj tüpü (50 ml)	Nest, 602002
Santrifüj tüpü (15 ml)	Nest, 601002
Ependorf (1.5 ml)	Nest, 615001
Ependorf (2 ml)	Nest, 620011
Ependorf (0.6 ml)	Nest, 605601
Cam tabanlı petri	WPI, FD35PDL-100
Plastik tabanlı petri	ThermoFisher, 130180
Hücre Kazıyıcısı	BIOLOGIX, 70-1250
Petri kabı (100mm)	Nest, 704004
Petri kabı (150mm)	ThermoFisher, 168381
6 kuyucuklu plaka	Corning, 3516
96 kuyucuklu plaka	Corning, 3596
35 mm plastik petri	Thermo, 130180
T25 Flask	Nest, 707003
T75 Flask	Sarstedt, 83-3911-002
<b>Kimyasallar</b>	<b>Marka, Katalog numarası</b>
1X PBS	Multicell, 311-010-CL
Trypsin Enzim	Gibco, 25200-056
DMSO	Sigma, D8418
DMEM	Multicell, 319-005-CL
FBS	Sigma, F4135
N2 Supplement	Thermo Fisher, 17502048
B27 Supplement	Thermo Fisher, 12587010
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	R&D Systems, 233-FB-025

Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	R&D Systems, 236-EG-200
Laminin	Sigma, L2020
Trombosit kökenli büyüme faktörü- $\alpha$ (PDGF- $\alpha$ )	Biovision, 4482-10
Triiodothyronine (T3)	Sigma, T6397
Nörotrofin-3 (NT3)	Biovision, 4306-10
Siliar nörotrofik faktor (CNTF)	Biovision, 4017-20
Agarose	Multicell, D1-LE
DNA Ladder	BioLabs, N0550S
Sığır Serum Albumin (BSA)	Sigma, A9418
Keçi serumu	Sigma, G9023
Tween-20	Sigma, P9416
Triton-X	Sigma, T8787
DAPI	Sigma, D9542
Fluoromount	Sigma, 1002728406
Antibiyotik/antimikotik	Wisent Bioproducts, 450-115-EL
Gliserol	Multicell, 800-040-EL
L-15	Multicell, 323-050
RPMI 1640	Gibco, 21875-034
DMEM yüksek glikoz	Gibco, 21969-035
GlutaMAX	Gibco, 35050-061
Papain	Sigma, P4762
DNase	Biomatik, A2442
Hank'in dengeli tuz çözeltisi (HBSS)	Sigma, H9269
DAPI	Sigma, D9542
Propidyum İyodür	Invitrogen, P3566
Safeview	Abm, G108
Ficoll-Paque PREMIUM	GE Healthcare, 17-5442-02
Recombinant İnsan M-CSF Proteini	R&D, 216-MC-010
2-Merkaptoetanol	Merck, 8.057.400.250

Sıvı Hücre Kaldırma Enzimi	Corning, 25-056-CI
HEPES Tampon Solüsyon (1 M)	Capricorn, HEP-B
At serumu	Capricorn, HOS-1A
MOG (35-55) peptiti	Anaspec, AS-60130-10
Boğmaca toksini	Sigma, P7208-50UG
Tamamlanmamış Freund Adjuvantı	Sigma, F5506
M. tuberculosis H37 Ra	BD, 231141
Rekombinant Fare IL-4	Biolegend, 574302
LPS	Sigma, L4391-1MG
İnsan IFN- $\gamma$ Proteini	Genscript, Z02915-100
<b>Kitler</b>	<b>Marka, Katalog numarası</b>
RNA izolasyon kiti	MN, 740955.50
cDNA izolasyon kiti	Biolabs, NEB M3010
Taq polimeraz	Biolabs, M0486L
<b>Primer antikor</b>	<b>Marka, Katalog numarası</b>
Anti-NG2	Millipore, AB5320
Anti-Sox10	Millipore, AB5727
Anti-MBP	Biorad, MCA409S
Anti-GalC	Millipore, MAB342
Anti-Cd11b	Novus, nb11089474
Anti-iNOS	Abcam, ab178945
Anti-EphrinA1	ThermoFisher, 34-3300
Anti-EphrinA3	ThermoFisher, 36-7500
Anti-EphrinA4	ThermoFisher, 34-3700
Anti-EphrinA5	ThermoFisher, 38-0400
Anti-EphA7	Santa Cruz, sc-393973
<b>İkincil antikor</b>	<b>Marka, Katalog numarası</b>
Keçi anti Tavşan-488	AAT Bioquest, iFlour, 16800
Keçi anti Tavşan- 555	AAT Bioquest, iFlour, 16803
Keçi anti Tavşan-633	AAT Bioquest, iFlour, 16638
Keçi anti Fare- 488	AAT Bioquest, iFlour, 16735



Keçi anti Fare-555	AAT Bioquest, iFlour, 16460
Keçi anti Fare- 633	AAT Bioquest, iFlour, 16478
Keçi anti Sıçan-488	Jackson Immuno., 112-545-003
Keçi anti Sıçan-647	Jackson Immuno., 112-605-003
<b>Konjüge antikor</b>	<b>Marka, Katalog numarası</b>
Anti-EPHA7-PE	Bioss, bs-7034R-PE
Anti-HSPA5-PE (Anti-GRP78 BiP)	Novus Biologicals, NBP1-06274PE
Anti-F4/80-Alexa 488	E-BioScience, 53-481-82
Anti-CD4-APCCy7	Sony, 2102590
Anti-CD3-BV421	Sony, 2102170
Anti-CD16-FITC	Biolegend, 302006
Anti-CD14-APC	Biolegend, 301808
<b>İzotip antikor</b>	<b>Marka, Katalog numarası</b>
Polyclonal Tavşan IgG-PE	SouthernBiotech, 0111-09
Fare IgG1-FITC	Biolegend, 400108
Fare IgG2a-APC	Biolegend, 400220

## 5.2. Primer Oligodendrosit Kültürü

P0-P2 yavruları, %70 etanol ile steril edildikten sonra dekapite edildi. Dekapite edilen farelerden alınan korteks, diseksiyon için %1 Glutamax ve %1 Antibiyotik içeren soğutulmuş L15 vasatının içine alındı. Daha sonra korteks 2 veya 3 parçaya bölündü. Parçaların bulunduğu diseksiyon vasatının içine 1 U/ml Papain eklenerek parçalar 45 dakika boyunca 4°C'de ajitatörün içinde enzimatik bölünmeye tabii tutuldu. Gevşetilen doku, mekanik ayırma işlemi gerçekleştirilmek için küçülen boyutlarda pipet uçlarından geçirildi. Daha sonra 900 RPM'de 3 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pelet, %10 FBS ve 0,1 mg/ml DNase eklenmiş diseksiyon vasatı ile tekrar çözdürüldü ve oda sıcaklığında 15 dakika ajitatörde bırakıldı. Daha sonra 900 RPM'de 3 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Elde edilen hücreler daha önceden Poly-L-ornitin (1:200) ile kaplanmış sekiz kuyucuklu cam kültür plakalarına (kuyucuk/1,5x10<sup>5</sup> hücre) kültür vasatında çözülerek ekildi (37°C, %5 CO<sub>2</sub>). Kültür vasatı: DMEM (yüksek glikoz) içinde %1 Glutamax, %1 Antibiyotik, %5 FBS, %5 at

serumu ve 1 µg/ml Laminin. İlk haftada hücrelerin bulunduğu vasata 10 ng/ml PDGF-AA ve 10 ng/ml bFGF eklendi. 2 ya da 3 günde bir vasat değişimi yapıldı. İkinci hafta hücreler içinde %1 Glutamax, %1 Antibiyotik, %1 N2, %2 B27, 10 ng/ml CNTF, 5ng/ml NT3, 40 ng/ml T3 ve 1 µg/ml Laminin içeren vasata geçirildi. Aynı şekilde 2 ya da 3 günde bir vasat değişimi yapıldı. İki haftanın sonunda sadece 40 ng/ml T3 ve 1 µg/ml Laminin içeren vasata geçirildi. Sonuç olarak olgun oligodendrositce zengin kültür elde edildi.

### **5.3. Peritoneal Makrofaj İzolasyonu**

CO<sub>2</sub> ile ötenazi uygulanan yetişkin BALB/c erkek fareler çok bekletmeden bir strafor bloğu üzerine sırt üstü sabitlendi. Fareler %70 etanol ile sterilize edildikten sonra deri makas ve forseps ile kesildi. %3 FBS içeren 5 ml PBS 22g bir iğne kullanılarak periton boşluğuna enjekte edildi. Abdominale masaj yapılarak periton boşluğundaki hücreler enjekte edilen PBS'e alındı. 22g iğne uçlu enjektörle periton boşluğundan sıvı çekildi. Elde edilen hücre süspansiyonu 1500 RPM'de 8 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.

### **5.4. Primer Peritoneal Makrofaj Kültürü ve M1/M2 Makrofajına Farklılaştırılması**

Peritoneal boşluktan toplanan hücreler %10 FBS, 1.5M HEPES, %1 Glutamax ve %1 Antibiyotik içeren RPMI vasatında altı oyuklu plastik kuyulara ekildi (37°C, %5 CO<sub>2</sub>). Kuyu başına 2x10<sup>6</sup> hücre ekildi. Peritoneal makrofajlar 4 saat sonra yapışık hale geldiklerinden dolayı bu peritoneal boşluğundan izole edilen diğer hücre tiplerinden ayrılabilirler. Yapışmayan hücreler, iki kez Ca<sup>+2</sup> Mg<sup>+2</sup> içermeyen PBS ile nazikçe yıkayarak uzaklaştırıldı. Toplam peritoneal hücrelerinin yaklaşık %30'u yapışık hücreler olan makrofajlardır.

Peritoneal saf makrofajlar (MΦ), kültür vasatına 100 ng/ml IFN-γ ve 20 ng/ml LPS eklenerek 48 saat boyunca M1 makrofajına farklılaştırıldı. M2 makrofajlarının farklılaşması için ise kültür vasatına 20 ng/ml IL-4 eklenerek ile 48 saat boyunca inkübe edildi.

Hücreleri kaldırmak için MΦ, M1 ve M2 hücreleri Ca<sup>+2</sup> Mg<sup>+2</sup> içermeyen önceden ısıtılmış (37°C) PBS ile iki kez yıkandı. Önceden ısıtılmış (37°C) 1 ml

Cellstripper enzimatik olmayan hücre ayrışma solüsyonu her kuyucuğa ilave edildi ve 37°C'de 40 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine PBS eklenip pipetleme yapılarak hücre süspansiyonu elde edildi ve 1500 RMP'de 8 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra elde edilen MΦ, M1 ve M2 makrofajları toplandı ve sonraki deneylerde kullanıldı.

### **5.5. Oligodendrosit-Makrofaj *in vitro* Ortak Kültürü**

İki haftalık farklılaşma protokolünden sonra elde edilen olgun oligodendrositler, GalC antikoru içeren DMEM içinde 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra, fazla miktarda GalC'yi uzaklaştırmak için hücreler PBS ile yıkandı. M1, M2 ve MΦ hücreleri %1 Glutamax, %1 Antibiyotik, %1 N2, %2 B27, 40ng/ml T3 ve 1 µg/ml Laminin içeren DMEM vasatında çözülüp oligodendrositlerce zenginleştirilmiş kültürlerle (kuyu başına  $5 \times 10^4$  makrofaj) ilave edildi. Ortak kültürler 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edildi.

### **5.6. İmmünohistokimyasal Boyama**

Oligodendrosit, makrofaj, makrofaj-oligodendrosit ortak kültürleri, dalak kültürleri ve Hela kültürleri aşağıda belirtildiği gibi immünohistokimyasal boyamaya tabii tutulmuştur.

Yapışık hücreler için yapılan immünohistokimyasal boyama aşağıdaki gibidir. Hücreler, vasatın uzaklaştırılması için iki kez PBS ile yıkandı ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca %4 paraformaldehit (PFA) ile fiksleildi. Fiksasyondan sonra PBS ile yıkanan hücreler oda sıcaklığında 45 dakika bloke edildi ve bloklama solüsyonu olarak PBS içinde %3 BSA, %1 normal keçi serumu ve %0,1 Tween-20 kullanıldı.

Makrofaj-Oligodendrosit ortak kültürler, aşağıdaki birincil antikorlarla 4°C'de gece boyunca seyreltme solüsyonunda inkübe edildi: MBP (sıçan, 1:100), CD11b tavşan 1:500), Sox10 (tavşan, 1:200) ve 488-konjuge monoklonal anti-F4/80 (sıçan, 1:500). Seyreltme solüsyonu: PBS içinde %3 BSA, %1 normal keçi serumu ve %0,1 Triton X-100. Ertesi gün hücreler, %0,1 Tween-20 içeren PBS ile iki kez yıkandı ve ardından seyreltme çözeltisi içinde ikincil Alexa Fluor-konjuge antikorlar (sıçan veya tavşan IgG) ile oda sıcaklığında 3 saat süreyle inkübe edildi.

Makrofaj kültürleri, aşağıdaki birincil antikorlarla 4°C'de gece boyunca seyreltme solüsyonunda inkübe edildi: anti-CD11b (tavşan 1:500), 488-konjuge anti-F4/80 (sıçan, 1:500), anti-iNOS (tavşan, 1:500). Ertesi gün hücreler, %0,1 Tween-20 içeren PBS ile iki kez yıkandı ve ardından seyreltme çözeltisi içinde ikincil Alexa Fluor-konjuge antikorlar (sıçan veya tavşan IgG) ile oda sıcaklığında 3 saat süreyle inkübe edildi. Son olarak hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve DAPI ile zıt boyama yapıldı. Slaytlar kapatma medium ile kapatıldı ve 4°C'de saklandı.

Dalak hücresi kültürleri aşağıdaki birincil antikorlarla 4°C'de gece boyunca ya da 30 dakika seyreltme solüsyonunda inkübe edildi: 488-konjuge monoklonal anti-F4/80 (sıçan, 1:500), anti-iNOS (tavşan, 1:500), PE-konjuge anti-EPHA7 (tavşan, 1:500) ve PE-konjuge anti-HSPA5 (tavşan, 1:500). Konjuge olmayan antikor boyaması için ertesi gün hücreler, %0,1 Tween-20 içeren PBS ile iki kez yıkandı ve ardından seyreltme çözeltisi içinde ikincil Alexa Fluor-konjuge antikorlar (sıçan veya tavşan IgG) ile oda sıcaklığında 3 saat süreyle inkübe edildi. Konjüge olan antikorlar için 30 dakika sonra yıkama işlemine geçildi. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve DAPI ile zıt boyama yapıldı. Slaytlar kapatma medium ile kapatıldı ve 4°C'de saklandı.

HSPA5 ve EPHA7 proteinlerinin ifade lokasyonlarının tespiti için Hela hücre hattında aşağıda belirtildiği gibi immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Hela hücre hattı yapışık hücrelerden oluştuğundan üst basamakta belirtilen fiksasyon ve bloklama basamakları uygulanmıştır. Hela hücre kültürleri konjüge olan EPHA7 ve HSPA5 antikorları ile boyandı. PE-konjuge anti-EPHA7 (tavşan, 1:500) ve PE-konjuge anti-HSPA5 (tavşan, 1:500) ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. Negatif kontrol boyaması olarak IgG-PE kullanıldı ve aynı boyama protokolü onun için de uygulandı. 30 dakika sonra yıkama işlemine geçildi. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve DAPI ile zıt boyama yapıldı. Slaytlar kapatma medium ile kapatıldı ve 4°C'de saklandı.

## **5.7. MS Hastalarının ve Kontrollerinin Katılımı**

MS hastalarının katılımı Relapslı Remisyon MS erken dönem grubu (EDSS 0-3) olarak gerçekleşmiştir. Bu tez çalışmasına toplamda okuz iki tane hasta katılmıştır (Tablo 5.7.1). Bu hastalara yaş ve cinsiyet olarak benzer olan sağlıklı bireylerin katılımı kontrol deneyleri olarak gerçekleşmiştir. Tez çalışmasına katılan sağlıklı birey

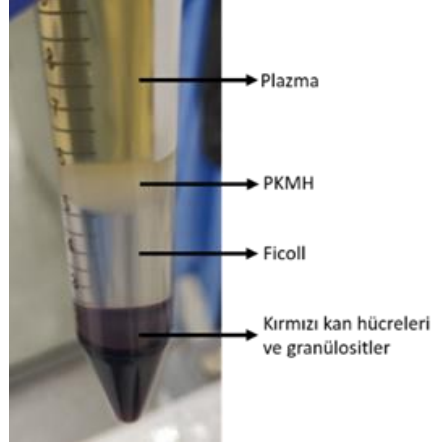
sayısı yirmi dördttür. Ayrıca protokollerin optimizasyonu için çeşitli yaşlarda sağlıklı bireylerin de projeye katılımı sağlanmıştır. Hastaların ve sağlıklı bireylerin katılımı İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 10840098-604.01.01-E.34157 sayılı kararına göre gerçekleşmiştir. Hastalardan ve sağlıklı bireylerin kan örnekleri onam formuna uygun olarak alınmıştır.

**Tablo 5.7.1:** MS hasta grupları ve sınıflandırmada kullanılan EDSS skor değerleri.

Hasta Grubu		EDSS Skoru	Katılan Hasta Sayısı
Relapslı Remisyon MS	Erken Dönem	0-3	32
Sağlıklı Birey		0	24

### 5.8. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi

Hasta ve kontrol bireylerinden alınan kanlar EDTA'lı mor kapaklı kan tüplerinde bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Çöken kan sayesinde yukarıda kalan serum uzaklaştırıldı. Serum ulaştırmak daha saf PKMH eldesi için önemli bir basamaktır. Daha sonra kalan kan örnekleri 1:1 oranında 2.5mM EDTA içeren 1X PBS ile seyreltildi. Seyreltilen kan 3:4 oranında Ficoll üzerine yayıldıktan sonra, 20 dakika boyunca 2200 RPM'de hızlanma ivmesi 1 ve yavaşlama ivmesi 0 olacak şekilde santrifüj edildi (Şekil 5.8.1). Santrifüj sonrasında plazma katmanı ile Ficoll katmanı arasında bulunan mononükleer hücreler, ince uçlu pastör pipet yardımı ile toplanıp 1500 RPM'de 10 dakika boyunca tekrar santrifüjlenerek hücrelerin çökmeleri sağlandı. Hücre peleti %5 FBS içeren PBS'te çözündürülüp akış sitometrisi analizlerine hazır hale getirildi. Deneyden deneye geçişle birlikte her bir örnekten en az  $12 \times 10^6$  hücre elde edilebildi. Akış sitometrisi analizi için yeterli hücre ayrıldıktan sonra kalan hücreler pellet haline getirilip RNA izolasyonu için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

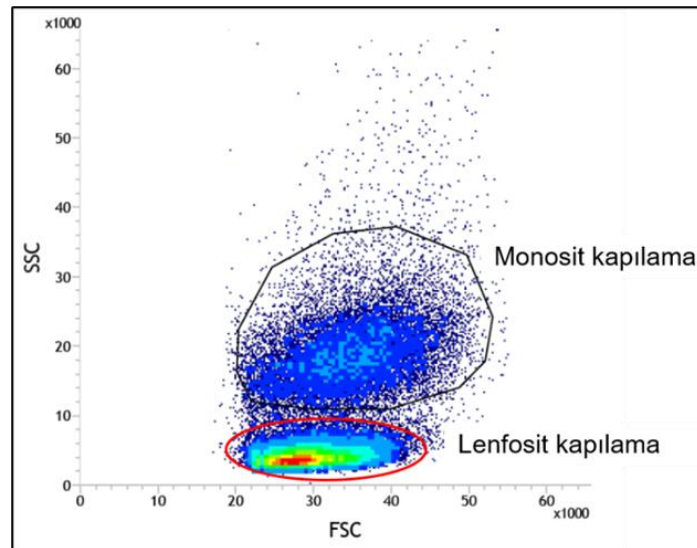


Şekil 5.8.1: Periferik kandan PKMH'lerin elde edilmesi.

### 5.9. Akış Sitometrisi Analizleri

Akış sitometrisi analizleri için BD Influx Cell Sorter with Bioprotect IV Safety Cabinet cihazı kullanılmıştır.

MS hastalarında ve sağlıklı bireylerlere ait PKMH izolasyonundan sonra, monosit ve lenfosit hücre grupları akış sitometrisinde boylarına ve şekillerine göre (side scatter) SSC ve (forward scatter) FSC sinyal analizi ile belirlendi (Şekil 5.9.1). Yapılan ficoll ayrıştırmasından dolayı elde edilen PKMH profilinde granüositler bulunmamaktadır.



Şekil 5.9.1: PKMH'lerin side-scatter/forward-scatter analizi ile gösterimi.

Daha sonrasında monosit alt grubu hücre analizinin yapılabilmesi için PKMH'lerdeki monosit hücre grupları CD14 ve CD16 yüzey belirteçleri ile işaretlendi. Yüzey belirteçlerinin boyanması için kullanılan protokol aşağıdaki gibidir. MS hastalarından ve sağlıklı bireylerden izole edilen PKMH'ler her bir kuyucağa 300.000 hücre gelecek şekilde %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %10 FBS içeren RPMI vasatında 96lı kuyucuklu hücre kültürü plaklara ekimi yapıldı. Plaka 1500 RPM'de 7 dakika santrifüjlenerek vasat uzaklaştırıldı. Yüzey antikoru boyaması öncesi 10 dakika boyunca oda sıcaklığında her kuyu için 50 µl boyama tamponuna (Staining buffer) 0.75 µl Fc Blok eklenerek bloklama yapıldı. Yüzey boyaması için APC-konjuge anti-CD14 ve FITC-konjuge anti-CD16 kullanıldı. İzotip kontrol için ise, fare IgG2a-APC ve fare IgG1-FITC kullanıldı. Fc Blok içeren boyama tamponu ile süspanse edilen her bir kuyucuğa 0.75 µl antikor eklenip 4°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Her kuyuya 200 µl Boyama Tamponu ekleyip hacim atırıldıktan sonra 1500 RPM'de 7 dakika santrifüjlendikten sonra ve süpernatant atıldı. Pellet 200 µl PBS ile çözüldükten sonra akış sitometrisi analizi için hazır hale getirildi.

EPHA7 ve HSPA5 proteinlerini MS hastalarında ve sağlıklı bireylerde ifade seviyelerinin tespiti için akış sitometrisi analizi kullanılmıştır. Hem EPHA7 hem de HSPA5 proteini hücre içinde ve yüzeyinde bulunduğu için akış sitometrisi için yapılan hücre içi boyama tekniği kullanılmıştır. Bunun için her bir proteinin ifade edildiği Hela hücre hattında akış sitometrisi için boyama optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyondan sonra MS hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan PKMH'lerde monositlerde EPHA7 ve HSPA5 ifade seviyesine aşağıdaki detaylı bir şekilde belirtilen protokol ile bakılmıştır.

Monositlere ait yüzey boyama protokolünü takiben hücre içi boyama protokolü aşağıdaki gibi uygulanmıştır. 300.000 sayıda PKMH bulunan her bir kuyuya 100 µl BD Fix solüsyonu eklenip 4°C'de 20 dakika inkübe edildi. Fiksasyonun ardından hücreler 1500 RPM'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 100 µl 1X BD Perm/Wash eklenerek 1 kere 1500 RPM'de 7 dakika santrifüj yapıldı. Yıkama işleminin ardından özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak için hücreler, 45 dakika boyunca oda sıcaklığında 100 µl bloklama solüsyonu (%3 bovine serum albumin, %0,3 sodyum azid, %1 keçi serumu, %0,1 Triton X-100) içinde bekletildi. Bloklama solüsyonunu uzaklaştırmak için hücreler 1500 RPM'de 7 dakika

santrifüj edildi. EPHA7 ve HSPA5 proteinlerini hedeflemek için PE-konjuge anti-EPHA7 ve PE-konjuge anti-HSPA5 konjüge primer antikor kullanılmıştır. İzotip kontrol için de IgG-PE kullanılmıştır. 15 µl 1x BD Perm/Wash içinde 0.75 µl konjüge primer ve izotip eklenerek 4°C'de 30 dakika inkübe edildi. Hücre çekirdeklerini işaretlemek için üzerlerine DAPI eklenerek akış sitometrisi ile analiz edildi.

### **5.10. İkincil Hücre Kültürü**

Hela hücre hattı rutin olarak kullanılmak için kendi laboratuvarımızda mevcuttur. Her bir tüpte  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde dondurulmuş tüpler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmaktadır. Ekim yapılmadan önce tüpler  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik bir su banyosunda hafifçe çalkalayarak eritilmiştir. Çözülmenin hızlı olmasına dikkat edilmiştir (yakalaşık 2 dakika). Çözünen hücrelerin üzerine %10 FBS, %1 Antibiyotik ve %1 Glutamax içeren RPMI vasat eklenerek DMSO'nun uzaklaştırılması için 1200 RPM'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra hücre pelleti taze vasat ile çözüldükten sonra T25'lik flasklara ekimi yapılmıştır. %80 yoğunluğa ulaşıldığında ise vasatın aspirasyonunu takiben hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 750 µl Tripsin/EDTA eklendi. 2-3 dakika inkübatörde bekledikten sonra, hücreler kaldırıldı. 1000 RPM'de 3 dakika santrifüj sonrası süpernant kısmı atıldı. PBS'te çözümlenerek hücre sayımı gerçekleştirildi. Akış sitomerisi analizi için hücreler 5.9. numaralı bölümde anlatıldığı gibi boyanmıştır. İmmunositokimyasal boyamalı için ise 5.6. numaralı bölümde anlatıldığı gibi boyanmıştır.

### **5.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

M2 makrofajlarının karakterizasyonu için PZR analizi yapılmıştır. M2 hücrelerinin RNA izolasyonu, üretici tarafından sağlanan protokolda (MACHEREY-NAGEL) açıklandığı gibi yapıldı. RNA konsantrasyonları Nanodrop kullanılarak ölçüldü. cDNA, üretici talimatlarına göre (Tablo 5.11.1) LunaScript™ RT SuperMix Kiti kullanılarak her total RNA örneğinden 1 µg sentezlendi (Tablo 5.13.2) M2 makrofaj belirteçleriyle (Tablo 5.13.3) ie gen ekspresyon seviyesinin tayini için PZR protokolü üretici talimatlarına göre uygulandı (Tablo 5.13.4).



**Tablo 5.11.1:** cDNA sentezleme reaksiyon karışımı.

<b>Bileşenler</b>	<b>Hacim (µl)</b>
LunaScript RT SuperMix (5X)	4
RNA örneği (1 µg)	Konsantrasyona göre değişim gösterebilir
Nükleaz içermeyen su	20 µl'ye tamamlanma
Total hacim	20

**Tablo 5.11.2:** cDNA sentezleme protokolü.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
25°C	2 dk
55°C	10 dk
95°C	1 dk
4°C	∞

**Tablo 5.11.3:** M2 karakterizasyonu için forward ve reverse primerler dizilimleri.

<b>Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
Fizz1	TGCCAATCCAGCTAACTATCC	GTGGTCCAGTCAACGAGTAAG
GAPDH	TCACCACCATGGAGAAGGC	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA

**Tablo 5.11.4:** PZR protokolü.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
95°C	5 dk
95°C	30 sn
58°C	30 sn
72°C	30 sn
Adım 2'ye git	34X
72°C	5 dakika
4°C	∞

## 5.12. EAE Fare Modeli Oluşturulması

Kronik EAE modeli oluşturulmak için 6-10 haftalık C57BL/6 dişi fare kullanılmıştır. Tercihen 6 haftalığa yakın fareler kullanıldı. Yapılan immünizasyon stres faktöründen çok fazla etkilendiğinden model oluşturulmadan önce farelerin ortama uyum sağlamaları için bir hafta önceden davranış odasına alındı. İmmünizasyon için yapılan enjeksiyonlar ve klinik skorlama için yapılacak olan davranış deneyleri aynı kişi tarafından yapılmış olup hayvanların stres seviyesi en azda tutulmuştur. Farelerin kullanıldığı tüm deneyler, İstanbul Medipol Üniversitesi hayvan bakım ve kullanım komitesinin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Fareler patojen içermeyen koşullar altında tutulmuştur, yiyecek ve suya erişimleri sağlanmıştır. Kontrol grubuna olarak MOG<sub>35-55</sub> peptiti yerine PBS ile immünizasyonu yapılmıştır. Ayrıca kontrol grubuna boğmaca toksin enjeksiyonları da yapılmıştır.

İmmünizasyon için ilk olarak enjekte edilecek olan MOG<sub>35-55</sub> peptit emülsiyonu hazırlanmıştır. Liyofilize halde gelen MOG<sub>35-55</sub> peptiti ddH<sub>2</sub>O içinde son konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür. Fare başına 200 µg MOG<sub>35-55</sub> peptit kullanılmıştır. Hazırlanan peptit çözeltilisi 20 °C'de saklanmıştır. Daha sonrasında mycobacterium tüberkülosiz H37RA hazırlanması için bir şişe (100 mg) toz halinde gelen içeriği bir havanın içine konulmuştur. İnce bir toz elde etmek için havanda dövülmüştür. Üzerine 10 ml tamamlanmamış Freund adjuvantı eklenerek 4°C'de saklanabilen 10 mg/ml tamamlanmış Freund adjuvant elde edebilmek için stok solüsyonu elde edilmiştir. İmmünizasyon sırasında tamamlanmış stok Freund adjuvantı tamamlanmamış Freund adjuvantı ile son konsantrasyon 2 mg/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. İçeriği dolayısıyla çökelti oluşturabilen bir solüsyon olduğundan her kullanımdan önce iyice karıştırılmasına dikkat edilmiştir. Viskoz bir yapıya sahip olduğundan da hacim kaybı yaşanabileceği için hesaplamalar ona göre ayarlanmıştır. Son olarak, 1 mg/ml son konsantrasyon olacak şekilde tamamlanmış Freund adjuvant ile MOG<sub>35-55</sub> peptit çözeltilisini 1:1 oranında karıştırılmıştır. MOG<sub>35-55</sub> emülsiyonu için 27 G kanül ve tamamlanmış Freund adjuvantı için 20 G kanül kullanılmıştır. Hava kabarcıklarından kaçınılıp her iki enjektör de üç yollu bir valf ile bağlanmıştır. Emülsiyonlar bir şiringadan diğerine gönderilerek iyi bir emülsifikasyon oluşturmak için en az 10 dakika boyunca iyice karıştırılmıştır. Çözelti

beyaz, katı ve viskoz olmalı ve faz ayrımı olmamalıdır. Hazırlanan emülsiyonlardan enjektör içinde 4°C'de 30 dakika tutulmuştur.

Boğmaca toksinini hazırlanma aşaması için 100 µg/ml stok solüsyonu için 500 µl ddH<sub>2</sub>O içinde toz halinde olan 50 µg boğmaca toksini çözülüp 4°C'de saklanmıştır. Enjeksiyonun yapılacağı zaman PBS ile 1:50 oranında seyreltilmiştir. 200 µl içinde 400 ng boğmaca toksini olacak şekilde enjeksiyona hazır hale gelmiştir.

İmmünizasyon aşamasında her fareye 1:1 oranında hazırlanmış olan MOG<sub>35-55</sub>/tamamlanmış Freund adjuvantından 200 µl olacak şekilde enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon sırasında viskoz yapıda olan emülsiyondan bir miktar kayıp olacağı için gerekli miktarın 1,5-2 katı kadar hazırlanmıştır. Fareler izofluran ile anestezi altında tutulup deri altı enjeksiyonları yapılmıştır. 200 µl emülsiyon deri altında 4 farklı bölgeye verilmiştir. Verildiği bölgede katı bir şekil oluşturması beklenmiştir. İmmünizasyondan bir saat sonra boğmaca toksini enjeksiyonu yapılmıştır. İmmünizasyonun yapılacağı gün ve ondan sonraki gününde intraperitoneal olarak her bir hayvana 200 µl PBS içinde 400 ng boğmaca toksini olacak şekilde enjekte edilmiştir. Genel protokole ek olarak, immünizasyonda verimi arttırabilmek adını bir hafta sonra yapılan prosedür tam olarak aynı şekilde tekrar edilmiştir.

### 5.13. EAE Fare Modeli Skoruması

EAE fare modeli skoruması iki aşamada yapılmıştır. İlki hayvanlara ait ağırlık değişiminin takibidir. EAE'nin başlangıcı tipik olarak, hastalık aktivitesinin bir göstergesi olarak kullanılabilen kilo kaybı ile ilişkilidir. Kilo değerlendirmeleri immünizasyondan sonra iki günde bir yapılmıştır. Diğer değerlendirme ise fareler üzerinde takip edilen klinik skorumadır. İki günde bir yapılan takiplerle farelere ait semptomlara göre puanlama yapılarak klinik skoruması tutulmuştur. Puanlama tablo 5.13.1'de verilmiştir.

**Tablo 5.13.1:** EAE fare modeli klinik skoruması

<b>Klinik Skor</b>	<b>Klinik Bulgu</b>
0	Normal yürüyüş, kuyruğun normal hareket etmesi ve kuyruğun tabandan tutulduğunda yuvarlak bir nesnenin etrafını sarması.

1	Normal yürüyüş ve kuyruk ucunun düşmesi.
2	Normal yürüyüş ve kuyruk düşmesi.
3	Yürümde koordinasyon bozukluğu ve kuyruk sürme fakat arka uzuvların kısırmaya tepki vermesi.
4	Yürümde koordinasyon bozukluğu, bir arka uzvun sürüklenmesi, kuyruk sürme ve bir arka uzvun kısırmaya yanıt vermemesi.
5	Her iki arka uzuvların sürüklenmesiyle koordine olmayan yürüyüş, kuyruk sürme ve her iki arka uzuv kısırmaya yanıt vermemesi.
6	Koordine olmayan yürüyüş, ön ayakların vücudu çekmek için mücadele etmesi, ön ayakların kısırmaya tepki vermesi ve kuyruk sürme.
7	Farenin hareket edememesi, bir ön ayak parmağın kısırmaya tepki vermesi ve kuyruk sürme.
8	Farenin hareket edememesi, her iki ön ayak parmağın kısırmaya tepki vermemesi ve kuyruk sürme.
9	Solunumun değişmesi ve hareketin olmaması.
10	Ölüm.

#### 5.14. EAE Fare Dalak Hücrelerinin Akış Sitometrisi ile Karakterizasyonu

EAE ve kontrol fareler immünizasyondan sonraki 20. günde sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilmeden önce izofloren ile anestezi altında intrakardiyak perfüzyon yapılmıştır. Perfüzyon öncesi farelerden dalaklarını toplanıp PBS içinde buz üstüne alınmıştır. Perfüzyon için periton bölgesinden kalbe ulaşmak için farenin deri ve kaburgalarının kaldırılıp sol antriuma kesi atılmıştır. İnsülin iğnesinin takılı olduğu pompa ile kalbin sol ventrikülüne girilip sırasıya önceden soğutulmuş 15 ml PBS verilip kan toplanmıştır. Sonrasında da 15 ml %4 PFA verilerek fikse edilmiştir. Alınan beyin ve omurilikler bir gece %4 PFA içinde bekletildikten sonra %30 süzkroz solüsyonuna gerilmiştir. Sonraki işlemler için 4°C'de saklanmıştır.

Dalak hücrelerinin izolasyonu için PBS içinde bekletilen dalak 35 mm plastik petri içinde bulunan izolasyon vasatının içine alınmıştır. İzolasyon vasatı: RPMI, %10 FBS, %1 antibiyotik, %1 glutamax. Mekanik parçalama için dalaklar ilk olarak 3-4

parçaya bölünmüştür ve buzlu cam slaytların pürüzlü kenarları arasında ezilerek vasatın içinde süspansiyon olacak şekilde bırakılmıştır. Daha sonra bu süspansiyon sırasıyla 18 G, 21 G ve 26 G enjektör uçları kullanarak mekanik izolasyona devam edildi. Her bir enjektör ucu için 3 kez işlem tekrarlandı. Sonra 15 ml falcona toplanıp 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Kırmızı kan hücrelerinden kurtulmak için 1ml PBS ile çözülüp, önceden ısıtılmış 10 ml liziz tamponunda 3-5 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 200 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Dalak hücresi süspansiyonu daha sonra akış sitometrisi için hem yüzey hem de hücre içi boyama protokolüne tabii tutulmuştur. Hücreler ilk olarak 96lı kuyucuklu hücre kültürü plaklara her bir kuyucuğa 300.000 hücre gelecek şekilde ekimi yapılmıştır. Plaka 1500 RPM'de 7 dakika santrifüjlenerek vasat uzaklaştırıldı. Yüzey antikor boyaması öncesi 10 dakika boyunca oda sıcaklığında her kuyu için 50 µl boyama tamponuna 0.75 µl Fc Blok eklenerek bloklama yapıldı. Yüzey boyaması için Alexa 488-konjuge anti-F4/80 kullanıldı. Fc Blok içeren boyama tamponu ile süspanse edilen her bir kuyucuğa 0.75 µl antikor eklenip 4°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Her kuyuya 200 ul Boyama Tamponu ekleyip hacim atırıldıktan sonra 1500 RPM'de 7 dakika santrifüjlendikten sonra ve süpernatant atıldı. Hücre içi boyaması için yüzey boyama protokolünü takiben hücre içi boyama protokolü aşağıdaki gibi uygulanmıştır. 300.000 sayıda PKMH bulunan her bir kuyuya 100 ul BD Fix solüsyonu eklenip 4°C'de 20 dakika inkübe edildi. Fiksasyonun ardından hücreler 1500 RPM'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 100 µl 1X BD Perm/Wash eklenerek 1 kere 1500 RPM'de 7 dakika santrifüj yapıldı. Yıkama işleminin ardından özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak için hücreler, 45 dakika boyunca oda sıcaklığında 100 µl bloklama solüsyonu (%3 bovine serum albumin, %0,3 sodyum azid, %1 keçi serumu, %0,1 Triton X-100) içinde bekletildi. Bloklama solüsyonunu uzaklaştırmak için hücreler 1500 RPM'de 7 dakika santrifüj edildi. HSPA5 proteinini hedeflemek için PE-konjuge anti-HSPA5 konjüge primer antikor kullanılmıştır. İzotip kontrol için de IgG-PE kullanılmıştır. 15 µl 1x BD Perm/Wash içinde 0.75 µl konjüge primer ve izotip eklenerek 4°C'de 30 dakika inkübe edildi. Hücre çekirdeklerini işaretlemek için üzerlerine DAPI eklenerek akış sitometrisi ile analiz edildi.

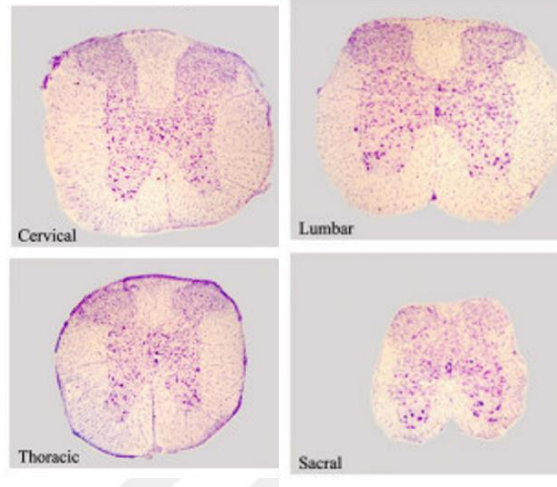
### **5.15. EAE Fare Dalak Hücresi Kültürü**

Dalak hücresi süspansiyonu hücre kültürü analizlerinde kullanılmak için 1500 RPM'de 7 dakika santrifüjlenerek pellet haline getirilmiştir. Hücrelerin bir kısmını %10 DMSO içeren FBS'te çözülüp -80°C'de saklanmıştır. Hücre ekim vasatı olarak %10 FBS, %1 antibiyotik, %1 glutamax ve 10 µg/ml MCSF içeren RMPI kullanılmıştır. Hücreler sekiz kuyucuklu cam kültür plakalarına (kuyucuk/500.000 hücre) kültür vasatında çözülerek ekildi (37°C, %5 CO<sub>2</sub>). 3 gün sonra yüzen hücreler toplanıp vasat değişimi yapılmıştır. 7. günün sonunda sonunda vasata değişimi yapıp hücreler immunositokimyasal boyamaya tabii tutulmuştur.

### **5.16. İmmünohistokimyasal Boyama**

EAE ve kontrol farelerinden elde edilen omuriliklerden kriyostat kullanılarak 10 µm kesitler elde edilmiştir. Omuriliklere ait kesitlerin bölgeleri literatüre göre sınıflandırılmıştır (Şekil 5.16.1). Sınıflandırılan bölgelere göre demiyelinizasyon belirlenmiştir. Alınan kesitler daha sonra kullanılmak amacıyla -20°C'de saklanmıştır. İmmünohistokimyasal boyama için oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra kurumadan PBS ile yıkanacaktır. Slaytların üzerindeki kesitlerin etrafı PAP-PEN ile çizilip üzerine bloklama solüsyonu (%3 bovine serum albumin, %0,3 sodyum azid, %1 keçi serumu, %0,1 Triton X-100) eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilecektir. Birincil antikor eklenip, 2 saat oda sıcaklığında veya gece boyunca 4°C'de inkübe edilecektir. Ertesi gün 3x5 dakika PBS ile yıkanacaktır. Slaytlatın üzerine ikincil antikor eklenip 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilecektir. Slaytlar 3x5 dakika PBS ile yıkanıp daha sonrasında DAPI ile 5 dakika oda sıcaklığında boyanacaktır. 5 dakika PBS ile yıkanıp kapama solüsyonu damlatılıp coverslip ile kapatılacaktır. Görüntüleme zamanına kadar 4°C'de saklanacaktır. Birincil antikorlar: anti-MBP

(sıçan, 1:100), ikincil antikorlar: Alexa Fluor-konjuge antikorlar (sıçan veya tavşan IgG).



**Şekil 5.16.1:** Koronal planda omurilik bölgeleri. Servikal, torakal, lomber ve sakral kısımları gösterilmiştir.

### 5.17. Konfokal Mikroskopi ile Görüntüleme

Görüntüler Zeiss LSM 800 konfokal mikroskobu, Zeiss LSM 780 konfokal mikroskobu, Zeiss (model) Spinning Disk konfokal mikroskobu ve Zeiss 880 Airy Scan mikroskobu üzerinde alındı ve Zen (Zeiss) ve ImageJ (NIH) ile işlendi. Hücre sayımları için slaytların isimleri değiştirilip kör edildi ve rastgele seçilen bölgelerden görüntüler yakalandı. Hücre sayımı çift kör olarak yapıldı.

### 5.18. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software Inc., CA, ABD) kullanıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda Student t testi, çoklu karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA kullanıldı. Tüm hata çubukları, ortalamanın standart hatasını gösterir.  $<0.05$  olan P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). *in vitro* deneyler, ayrı kültür preparatlarından en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. MS ve sağlıklı bireyler için yapılan akış sitometrisinde analiz olarak iki yönlü ANOVA kullanıldı (\* $p < 0.1$ ; \*\*  $p < 0.05$ ).

## 6. BULGULAR

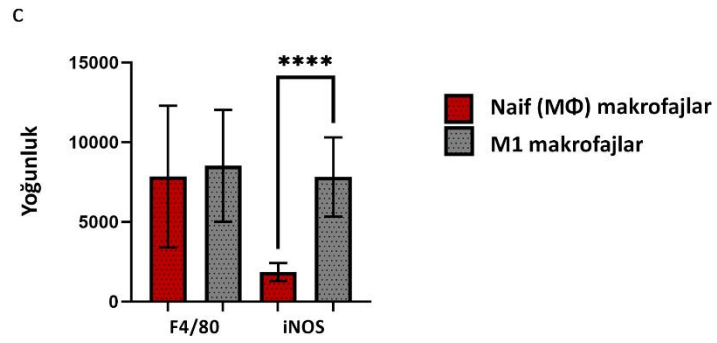
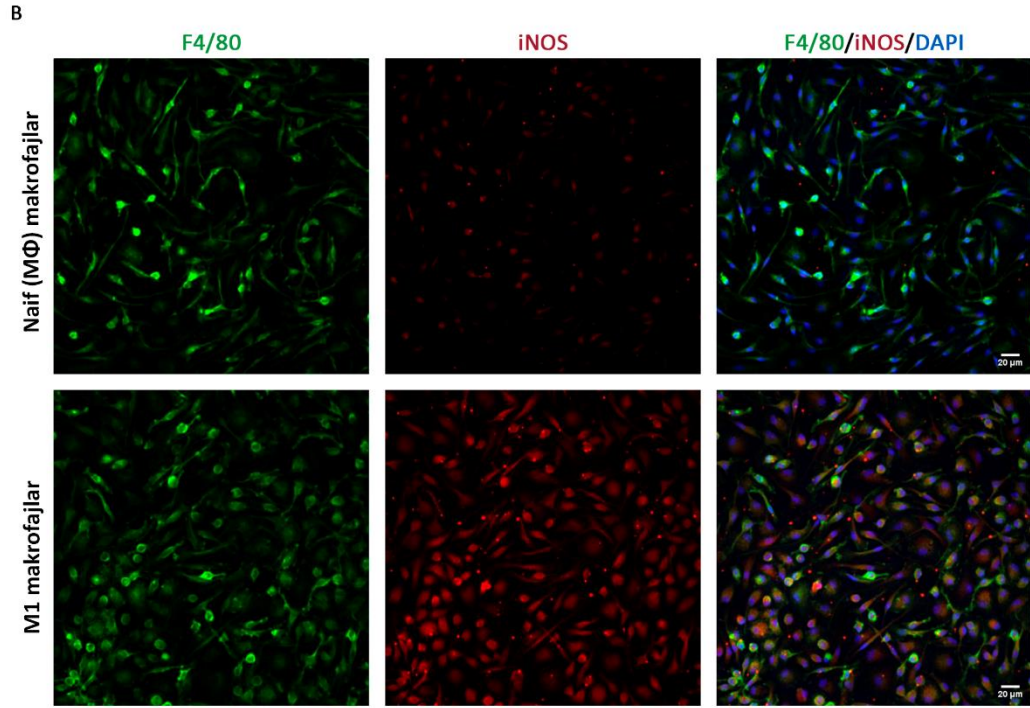
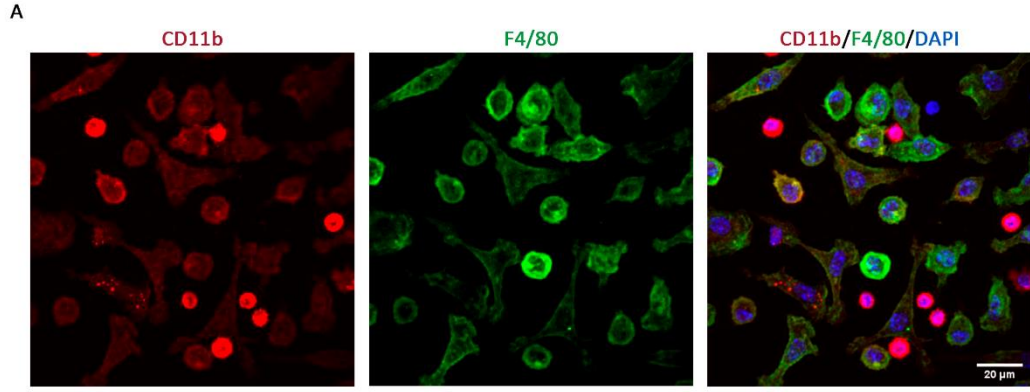
### 6.1. M1 Makrofajları Ortak Kültürlerdeki Olgun Oligodendrositlerin Sayısını Azaltır

Peritoneal makrofajlar, *in vitro* deneylerde sıklıkla kullanılan ve fagositoz kapasitesi olan hücrelerdir. Bu nedenle, *in vitro* model için bu hücreler seçilmiştir. CD11b ve F4/80 membran antikorları ile makrofaj karakterizasyonunu Şekil 6.1.1.a'da gösterilmiştir. Peritonealden elde edilen makrofajlar hem CD11b için hem de F4/80 ifadesi için pozitifdir.

İlk olarak, peritoneal naif makrofajların proinflamatuvar makrofaj olan M1 alt tipi makrofajlarına farklılaşma durumunu tespit edilmiştir. Naif makrofajların LPS ve IFN- $\gamma$  ile stimülasyonu, fibroblastikten yuvarlak bir şekile doğru fenotip değişikliğine neden olmuştur (Resim 6.1.1.b). M1 farklılaşmasıyla beraber hücrelerde iNOS üretimini önemli ölçüde artmıştır (Resim 6.1.1.b ve 6.1.1.c). Bu veriler, naif makrofajlarının M1'e farklılaşma yeteneğinin, başka bir *in vitro* platformda oligodendrositler üzerinde proinflamatuvar bir makrofaj etkisi olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

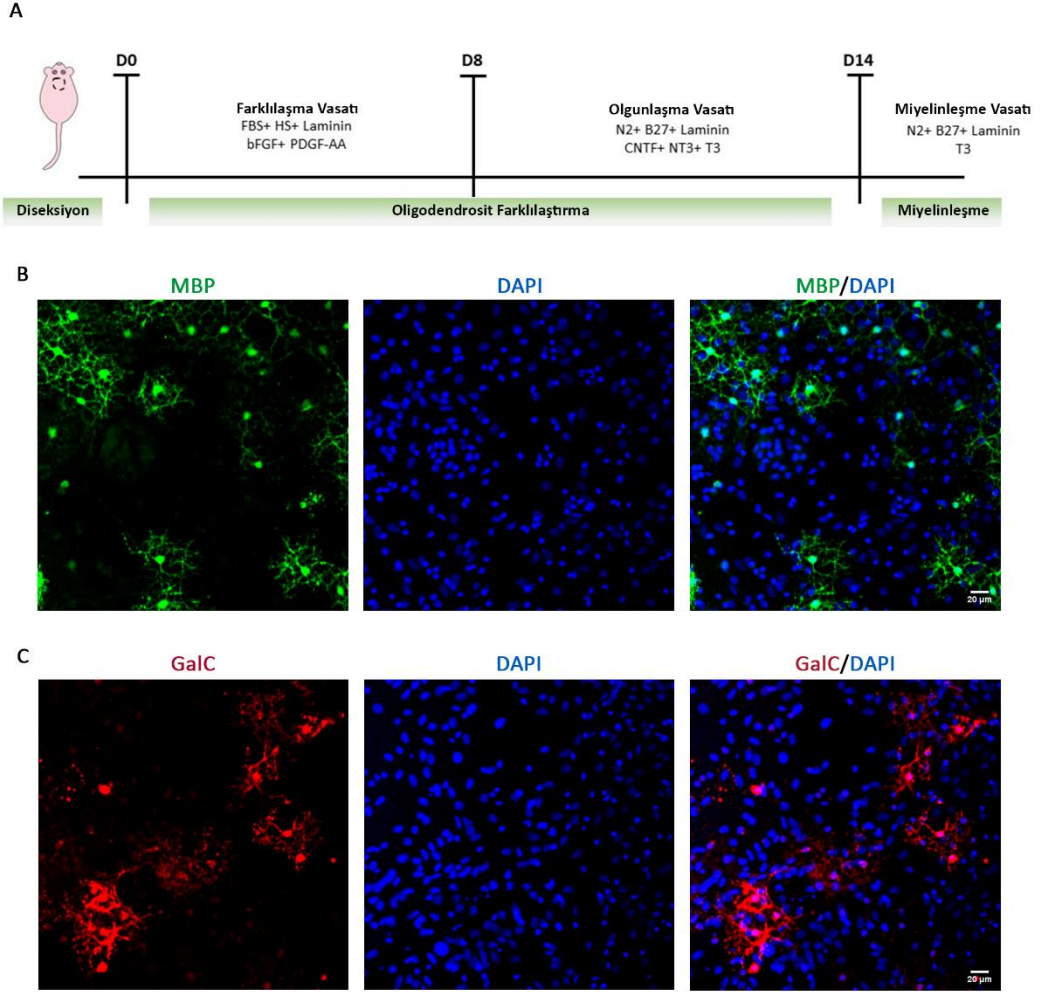
Mevcut protokolleri değiştirerek fare korteksinden oligodendrositlerce zenginleştirilmiş kültür oluşturulmuştur (Resim 6.1.2.a ve Resim 6.1.3). Ortak kültürler, makrofajlar ile etkileşim içinde oligodendrositlere olgunlaşabilen bazı OÖH'lerin yanı sıra olgun oligodendrositleri de içermektedir (Resim 6.1.2.b). MBP kompakt miyelin bileşenlerinden biri olduğundan olgun oligodendrositlerin spesifikasyonu ve sayısı MBP boyama ile izlenmiştir. Olgun oligodendrositler kültür ortamında GalC ifadesini göstermiştir (Resim 6.1.2.c). Bu nedenle, makrofajların oligodendrositlere bağlanmasını indüklemek için GalC proteinine karşı bir antikor kullanılmıştır.





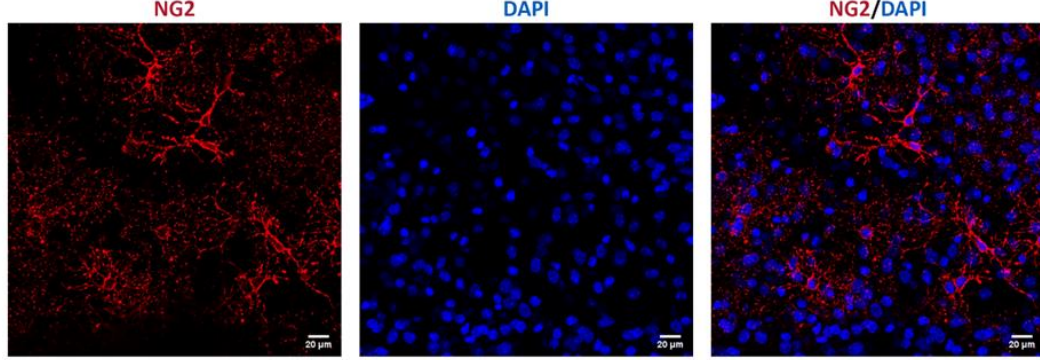
**Resim 6.1.1:** LPS ve IFN-  $\gamma$  ile stimülyasyondan sonra M1 makrofajlarına farklılaşan naif peritoneal makrofajlar. (a) Peritoneal makrofajlar, CD11b (kırmızı) ve F4/80 (yeşil) boyanarak tanımlanıp çekirdekleri DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Peritoneal makrofajlar hem CD11b hem de F4/80 boyaması için pozitifdir. (b) F4/80'in (yeşil) immünohistokimya boyaması, fibroblastik şekilden (uyarılmamış, aktif edilmemiş naif M $\Phi$  makrofajlar) yuvarlak

şekle (uyarılmış, M1 makrofajlar) fenotip değişikliğini göstermiştir. Ayrıca M1 makrofajlarında iNOS (kırmızı) üretimi naif makrofajlar ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde artmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20 µm. (c) Boyama yoğunluğunun ölçülmesi M1 makrofajlarında artan iNOS ifadesini doğrulamıştır. Veriler, ortalama ± SD ve \*\*\*\*p <0.0001 (eşleştirilmemiş t testi) olarak ifade edilmiştir.



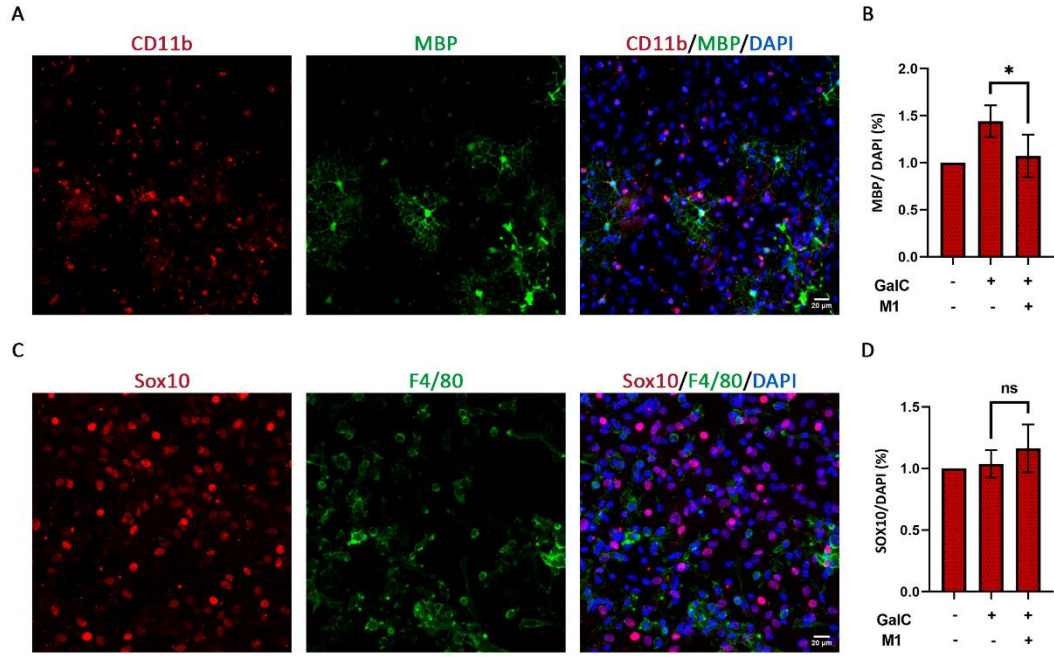
**Resim 6.1.2:** Fare korteksinden olgun oligodendrositler oluşturmak için geliştirilen farklılaşma protokolü. (a) Korteksin diseksiyonundan sonra elde edilen hücre süspansiyonu, farklılaşma vasatı ile bir hafta boyunca kültürlenmiştir. OÖH olgunlaşmasını desteklemek için hücreler, ikinci haftada olgunlaşma vasatına aktarılmıştır. 2 haftanın sonunda oligodendrosit bakımından zengin kültürler elde edilmiştir. bFGF, fibroblast büyüme faktörü baz (FGF2); PDGF-AA, trombosit türevli büyüme faktörü-AA; CNTF, siliyer nörotrofik faktör; NT3, nörotrofin 3; T3, triiyodotironin; FBS, fetal sığır serumu; HS, at serumu (D: Gün). (b) MBP'nin (yeşil) immünohistokimya boyaması kültürde 15. günde olgun oligodendrosit sayıları ve

genişlemiş membran kılıfları ve uzantıları göstermiştir. (c) Olgun oligodendrositler ayrıca GalC'yi de ifade etmiştir. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20 µm.



**Resim 6.1.3:** Oligodendrosit bakımından zengin kültürler aynı zamanda OÖH de içermektedir. NG2'nin (kırmızı) immünohistokimya boyaması kültürde 15. günde OÖH'leri göstermektedir. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20 µm.

M1 makrofajlarının olgun oligodendrositler üzerindeki etkisini araştırmak için M1 makrofajları ve oligodendrositler ile bir *in vitro* ortak kültür sistemi kurulmuştur. Aktif M1 makrofajlar, 2 haftalık farklılaşma protokolünün (D14-D16) sonunda oligodendrosit bakımından zengin kültürler üzerine eklenip 48 saat inkübe edilmiştir (Resim 6.1.4.a ve 6.1.4.c). GalC (GalC<sup>+</sup>) varlığında, M1 makrofajları ortak kültürlerde GalC eklenmemiş (GalC<sup>-</sup>) kıyasla MBP<sup>+</sup> oligodendrosit sayısını önemli ölçüde azaltmıştır (Resim 6.1.4.b ve Tablo 6.1.1). Bu durum miyelin kılıflarına saldırabileceklerini ve oligodendrosit ölümüne neden olabileceklerini düşündürmüştür. Öte yandan, pan OL işaretleyici SOX10 ile işaretlenen toplam oligodendrosit soy hücresi sayısında önemli bir fark gözlemlenmemiştir (Resim 6.1.4.d ve Tablo 6.1.1). Genel olarak, azalan olgun oligodendrosit sayısı ve yaklaşık olarak sabit kalan oligodendrosit soy hücresi sayısı, M1 makrofajlarının *in vitro* ortak kültürde doğrudan olgun oligodendrositleri etkilediğini göstermiştir.



**Resim 6.1.4:** Oligodendrosit bakımından zengin kültür ile M1 makrofajlarının *in vitro* ortak kültür platformu. (a, c) M1 makrofajları, GalC ile inkübe edilmiş oligodendrosit bakımından zengin kültüre eklenmiştir. Fotoğraflar 48 saat sonra çekilmiştir. (a) M1 makrofajlar için CD11b (kırmızı) ve olgun oligodendrositler için MBP (yeşil) ile boyanmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20  $\mu$ m. (b) M1, GalC varlığında MBP<sup>+</sup> oligodendrositlerin sayısını önemli ölçüde azaltmıştır. Tüm veriler GalC<sup>-</sup>M1<sup>-</sup> kültür koşuluna normalize edilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n: 4) ve \*p < 0.05 (eşleştirilmemiş t testi) olarak ifade edilmiştir. (c) OÖH'ler ve oligodendrosit soy hücreleri için SOX10 (kırmızı) ve M1 makrofajlar için F4/80 (yeşil) ile boyanmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20  $\mu$ m. (d) OÖH'ler ve oligodendrosit soy hücreleri üzerinde önemli bir etki tespit edilmemiştir. Tüm veriler GalC<sup>-</sup>M1<sup>-</sup> durumuna normalize edilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n: 3) olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 6.1.1:** MBP<sup>+</sup> ve SOX10<sup>+</sup> hücrelerinin M1 ve oligodendrosit ortak kültürlerindeki hücre sayıları ve yüzdesi. Verilen değerler tüm deneylerin ortalamasıdır.

Toplam bağımsız deney: 3	GalC <sup>-</sup> M1 <sup>-</sup>		
	Toplam DAPI	Toplam SOX10	SOX10/DAPI (%)
	6166	2711.67	42.97
Toplam bağımsız deney: 3	GalC <sup>+</sup> M1 <sup>-</sup>		
	Toplam DAPI	Toplam SOX10	SOX10/DAPI (%)

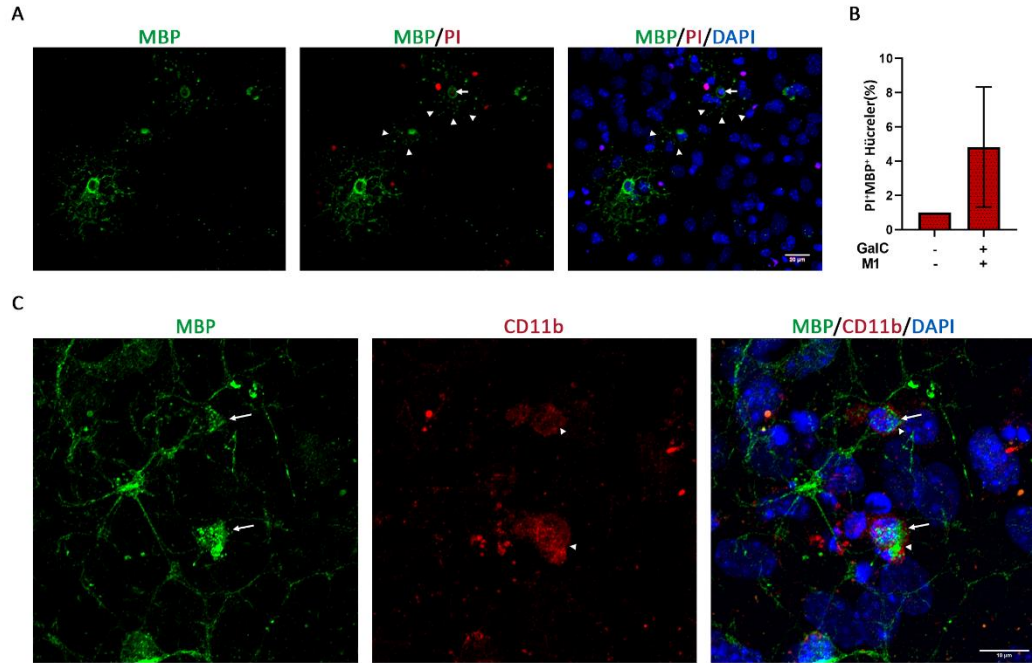
	6686.33	2909.33	43.55
	<b>GalC<sup>+</sup>M1<sup>+</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam SOX10	SOX10/DAPI (%)
	5916.33	2853.33	47.6

Toplam bağımsız deney: 4	<b>GalC<sup>-</sup>M1<sup>-</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	5316	168.75	3.21
	<b>GalC<sup>+</sup>M1<sup>-</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	6493.75	293.25	4.52
	<b>GalC<sup>+</sup>M1<sup>+</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
4742.5	160.25	3.36	

## 6.2. M1 Makrofajları Ortak Kültürde Oligodendrositleri Ölümüne Neden Olup Fagositoz ile Miyelin Kalıntılarını Temizler

M1 makrofajlarının miyelin kılıflarına saldırdığını ve *in vitro* ortak kültürde olgun oligodendrosit ölümüne neden olup olmadığını araştırmak için önce canlılık boyamasıyla ölü hücrelerin sayısını belirlendi. GalC eklenen kültürlerde, deforme olmuş oligodendrosit uzantılar ve propidium iyodür (PI) pozitif çekirdeklere sahip MBP<sup>+</sup> oligodendrositler gözlemlenmiştir (Resim 6.2.1.a). GalC eklenmemiş ortak kültür ile karşılaştırıldığında, MBP<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> hücre sayıları GalC<sup>+</sup> ortak kültürde önemli ölçüde daha yüksektir (Resim 6.2.1.b). Bu veriler, M1 makrofajlarının ilk önce GalC nedeniyle olgun oligodendrositleri tanıdığını ve miyelin hasarına neden olduğunu sonrasında ise olgun oligodendrositleri ölüme sürüklediğini göstermiştir. Demiyelinizasyon, miyelinin ortamdaki temizlenmesi ile ilerlediğinden, *in vitro* platformda M1 makrofajlarının miyelini fagosite edip edemeyeceği test edilmiştir. GalC<sup>+</sup> ortak kültürlerde, M1 makrofajlarının sitoplazmasında (Resim 6.2.1.c) miyelin kalıntılarını gözlemlenmiştir ancak GalC<sup>-</sup> ortak kültürlerinde gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, M1 makrofajına aktifleşmiş peritoneal makrofajların oligodendrosit

hücre ölümünü indükleyebileceğini ve miyelin kalıntılarını fagosite edebildiğini gösterilmiştir. Bu ortak kültürler, demiyelinizasyonu incelemek için uygun bir *in vitro* platformun kurulduğunu kanıtlamaktadır.

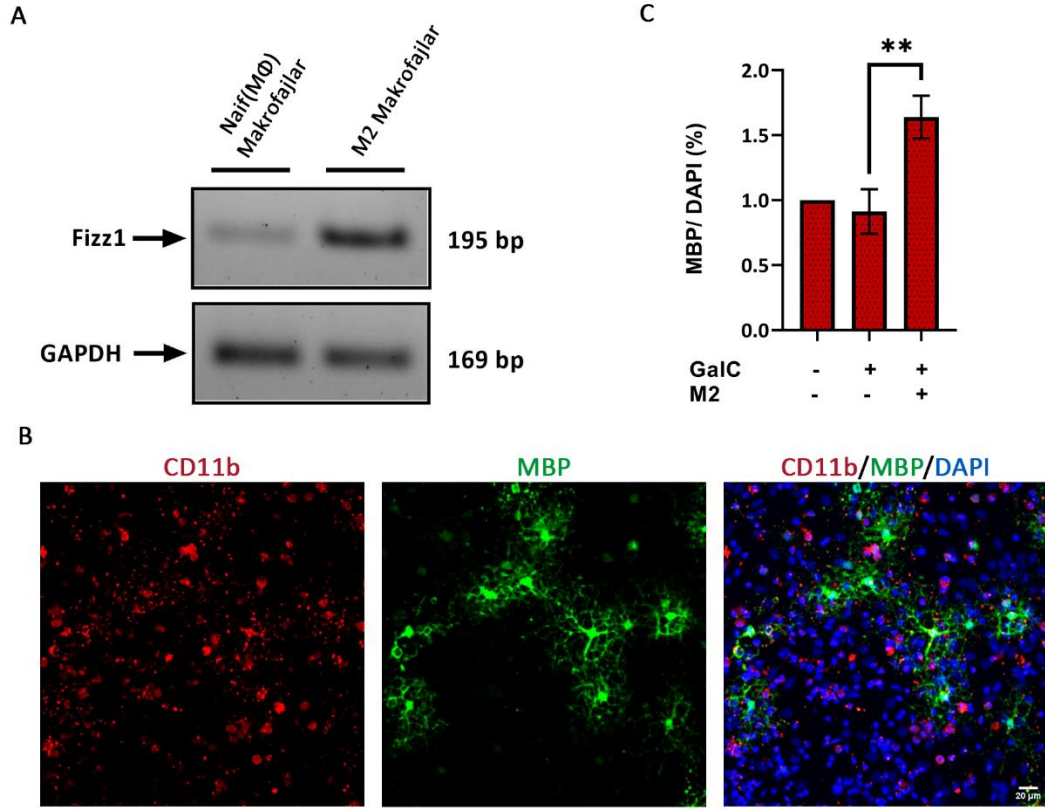


**Resim 6.2.1:** M1 makrofajları miyelin yapısını tahrip ederek ve fagositoz yoluyla miyelin kalıntılarını alarak olgun oligodendrositlerin ölümüne neden olmuştur. (a, c) M1 makrofajları GalC ile inkübe edilmiş oligodendrosit bakımından zengin kültüre ilave edilmiştir. Fotoğraflar 48 saat sonra çekilmiştir. (a) Deforme olmuş miyelin (yeşil, ok başı) hem olgun canlı oligodendrositlerde hem de ölü PI<sup>+</sup> oligodendrositlerde (kırmızı, ok) gösterilmiştir. (b) M1, GalC varlığında MBP<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> oligodendrositlerin sayısını arttırmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edilmiştir. Tüm veriler GalC-M1<sup>-</sup> kültür koşuluna normalize edilmiştir. (c) M1 makrofajlarının (kırmızı, ok başı) sitoplazmasında miyelin kalıntıları (yeşil, ok) bulunmuştur ve bu miyelin kalıntılarının M1 makrofajlar tarafından fagositoz edildiğini göstermiştir.

### 6.3. M2 Makrofajları Ortak Kültürde Olgun Oligodendrositlerin Sayısını Arttır

Makrofajlar remiyelinizasyon sürecinde de yer alır ve olgun oligodendrositler üzerinde olumlu etkileri vardır (Rawji ve diğerleri, 2016). MSS'de demiyelinizasyondan sonra makrofajlar remiyelinizasyonun başlaması için fenotiplerini M2 alt tipi makrofajına çevirirler (Miron ve diğerleri, 2013). Bu nedenle,

oluşturulan ortak kültür platformunda remiyelinizasyon sürecini araştırmıştır. Peritoneal naif makrofajların oligodendrositler üzerindeki etkilerini belirlemek için IL-4 ile uyarılarak M2 makrofajlarına farklılaştırılmıştır (Resim 6.3.1.a). M2 makrofajları, oligodendrositlerce zengin kültürler üzerine ekilmiştir. Ortak kültürler 48 saat inkübe edilmiştir (Resim 6.3.1.b). GalC varlığında M2 makrofajları olgun oligodendrosit sayısını önemli ölçüde arttırmıştır (Resim 6.3.1.c ve Tablo 6.3.1).



**Resim 6.3.1:** M2 makrofajları *in vitro* ortak kültür koşullarında olgun oligodendrositlerinin sayısını arttırmıştır. (a) Total mRNA aktif edilmemiş naif makrofajlardan ve M2 makrofajlarından (48 saat 10 ng/ml IL-4 ile uyarılmış) izole edilmiş ve Fizz1 geni ifadesi için PZR analizi yapılmıştır. GAPDH ifadesi referans olarak kullanılmıştır (n:3) (b) M2 makrofajları, GalC ile inkübe edilmiş oligodendrosit bakımından zengin kültüre eklenmiştir. Fotoğraflar 48 saat sonra çekilmiştir. M2 makrofajlar için CD11b (kırmızı) ve olgun oligodendrositler için MBP (yeşil) ile boyanmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20 µm. (c) M2, GalC varlığında MBP<sup>+</sup> oligodendrosit sayısını önemli ölçüde arttırmıştır. Tüm veriler GalC<sup>-</sup> M2<sup>-</sup> kültür koşuluna normalize

edilmiştir. Veriler, ortalama  $\pm$  SD (n: 3) ve  $**p < 0.01$  (eşleştirilmemiş t testi) olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 6.3.1:** MBP<sup>+</sup> hücrelerinin M2 ve oligodendrosit ortak kültürlerindeki hücre sayıları ve yüzdesi. Verilen değerler tüm deneylerin ortalamasıdır.

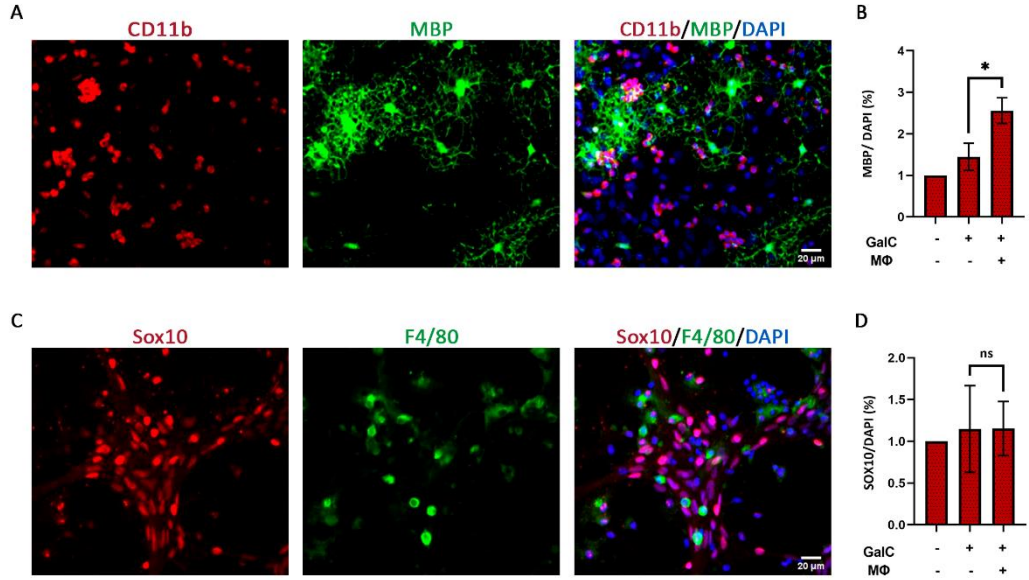
Toplam bağımsız deney: 3	GalC <sup>-</sup> M2 <sup>-</sup>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	4158.67	162.67	3.91
	GalC <sup>+</sup> M2 <sup>-</sup>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	4207.33	149.67	3.56
	GalC <sup>+</sup> M2 <sup>+</sup>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	4332.67	278	6.42

#### 6.4. Naif Makrofajlar Ortak Kültürde Oligodendrosit Olgunlaşmasını İndükler

MS lezyonlarında baskın olarak M1 makrofajları bulunmasına rağmen, bu lezyonlarda da net M1 veya M2 özellikleri olmayan makrofajlar saptanmıştır (Vogel ve ark., 2013). Bu nedenle, aktif edilmemiş naif makrofajlarının oligodendrositler üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığını test etmek için, naif makrofajlar ile oligodendrosit ortak kültürlerini kurulmuştur. Herhangi bir indüksiyon olmaksızın peritoneal naif makrofajlar, oligodendrositler ile zengin kültürler üzerine ekilmiştir. Ortak kültürler 48 saat inkübe edilmiştir (Resim 6.4.1.a ve 6.4.1.c). GalC varlığında, naif makrofajlar MBP<sup>+</sup> oligodendrosit sayısını önemli ölçüde arttırmıştır (Resim 6.4.1.b ve Tablo 6.4.1). Bunun yanında oligodendrosit soy hücrelerinin sayısı, GalC eklenmiş ve eklenmemiş ortak kültürlerde farklılık göstermemiştir (Resim 6.4.1.d ve Tablo 6.4.1). Genel olarak, artan sayıda olgun oligodendrosit ve yaklaşık olarak sabit sayıda oligodendrosit soy hücresi, naif makrofajlarının OÖH'lerin miyelin oluşturabilen oligodendrositlere olgunlaşmasını desteklediğini göstermiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, Naif makrofajlar, gözlemlenen pozitif etkiyi göstermek için



oligodendrositlerle iletişim kurması gerekmektedir. Bu nedenle kurulan ortak kültürler, makrofajların miyelin üzerindeki sadece olumsuz değil, aynı zamanda olumlu etkilerini de incelemek için iyi bir platform sunmaktadır.



**Resim 6.4.1:** Naif makrofajların *in vitro* ortak kültür koşullarında oligodendrositlerin farklılaşmasını indüklemiştir. (a, c) Naif makrofajlar GalC ile inkübe edilmiş oligodendrosit bakımından zengin kültüre eklenmiştir. Fotoğraflar 48 saat sonra çekilmiştir. (a) Naif makrofajlar için CD11b (kırmızı) ve olgun oligodendrositler için MBP (yeşil) ile boyanmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20  $\mu$ m. (b) Naif makrofajlar GalC varlığında MBP<sup>+</sup> oligodendrositlerin sayısını önemli ölçüde arttırmıştır. Tüm veriler GalC<sup>-</sup> MΦ<sup>-</sup> kültür koşuluna normalleştirilmiştir. Veriler, ortalama  $\pm$  SD (n: 3) ve \*p <0.05 (eşleştirilmemiş t testi) olarak ifade edilmiştir. (c) OÖH'ler ve oligodendrosit soy hücreleri için SOX10 (kırmızı) ve naif makrofajlar için F4/80 (yeşil) ile boyanmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20  $\mu$ m. (d) OÖH'ler ve oligodendrosit soy hücreleri üzerinde önemli bir etki tespit edilmemiştir. Tüm veriler GalC<sup>-</sup> MΦ<sup>-</sup> kültür koşuluna normalleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n: 3) olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 6.4.1:** MBP<sup>+</sup> ve SOX10<sup>+</sup> hücrelerinin naif makrofaj ve oligodendrosit ortak kültürlerindeki hücre sayıları ve yüzdesi. Verilen değerler tüm deneylerin ortalamasıdır.

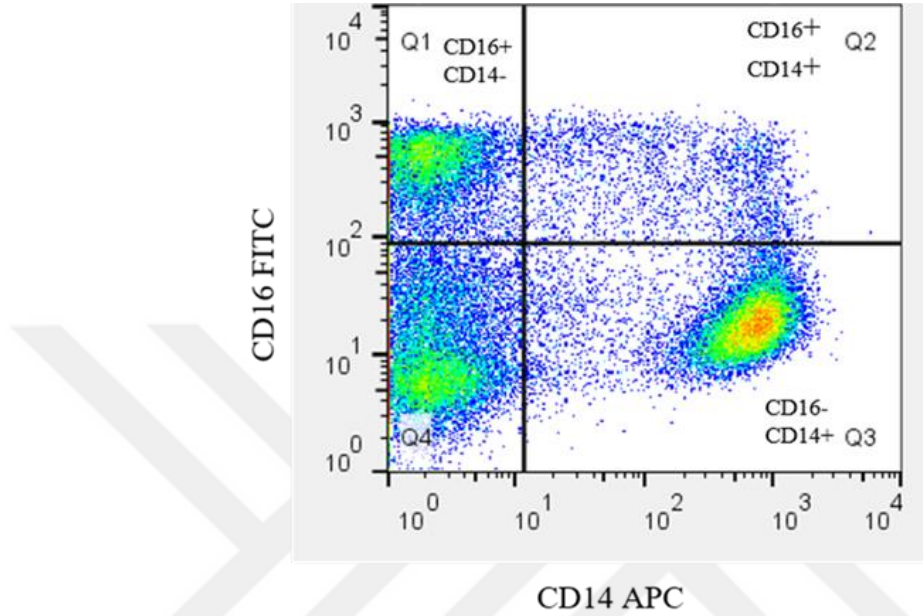
Toplam bağımsız deney: 3	<b>GalC<sup>-</sup>MΦ<sup>-</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	5407.67	145.33	2.68
	<b>GalC<sup>+</sup>MΦ<sup>-</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	5376.33	193.67	3.5
	<b>GalC<sup>+</sup>MΦ<sup>+</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam MBP	MBP/DAPI (%)
	4641.67	319.67	6.5

Toplam bağımsız deney: 3	<b>GalC<sup>-</sup>MΦ<sup>-</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam SOX10	SOX10/DAPI (%)
	5077	1726.67	37.33
	<b>GalC<sup>+</sup>MΦ<sup>-</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam SOX10	SOX10/DAPI (%)
	5027.33	1836	37
	<b>GalC<sup>+</sup>MΦ<sup>+</sup></b>		
	Toplam DAPI	Toplam SOX10	SOX10/DAPI (%)
	4579.33	1790	40.11

### 6.5. MS Hastaları ve Sağlıklı Bireylerin PKMH'lerinde Monosit Gruplarının Belirlenmesi

Sağlıklı bireylerden ve MS hastalarından alınan kanlardan yapılan PKMH izolasyon sonrası akış sitometrisinde monosit hücre grubu ilk olarak SSC ve FSC parametreleri kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 5.9.1). Her bir birey için toplam monosit popülasyonu hem MS hastalarında hem de sağlıklı bireylerde verilmiştir. Kanda bulunan monositler kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır. Hem MS hastalarının hem de sağlıklı bireylerin bu alt grup monosit popülasyonu öğrenilebilmek için monositlere akış sitometrisinde kapılama yapılmıştır. Toplam canlı hücrelerden

CD4<sup>+</sup> hücreler çıkartılıp monosit yüzey belirteçleri kullanılarak monosit grubundaki CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> olan klasik monositler, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> olan ara-form monositler ve CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> klasik olmayan monositler olarak ayrı ayrı kapılama yapılarak gösterilmiştir (Şekil 6.5.1).

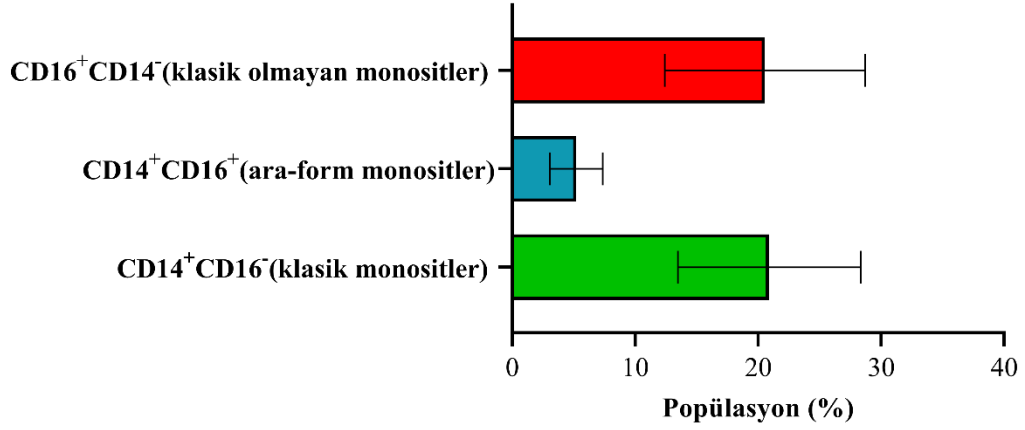


**Şekil 6.5.1:** PKMH'lerindeki monosit hücre gruplarının CD14 ve CD16 yüzey belirteci ifadelerine göre ayrı ayrı kapılanması.

EDSS skoru 0-3 arası olan otuz üç tane RRMS hastasına ait üç alt grup monosit popülasyon yüzdeleri verilmiştir (Tablo 6.5.1). Erken dönem RRMS hasta grubunda klasik monosit popülasyon ortalaması yaklaşık %20 iken ara-form monosit popülasyon ortalaması yaklaşık %5 ve klasik olmayan monosit popülasyon ortalaması yaklaşık %20 olarak belirlenmiştir (Şekil 6.5.2). RRMS (0-3) hastaları için analiz ettiğimiz sağlıklı bireylere ait üç alt grup monosit popülasyon yüzdeleri verilmiştir (Tablo 6.5.2). Sağlıklı bireylere ait klasik monosit popülasyon ortalaması yaklaşık %18 iken ara-form monosit popülasyon ortalaması yaklaşık %4 ve klasik olmayan monosit popülasyon yüzdesi yaklaşık %24 olarak belirlenmiştir (Şekil 6.5.3). MS hastalarında sağlıklı bireylere göre ara-form monosit popülasyonunda anlamlı derecede artış gözlemlenmiştir.

**Tablo 6.5.1:** RRMS (EDSS 0-3) hastalarına ait üç alt grup monosit popülasyon yüzdeleri.

<b>Hasta Kodu</b>	<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (klasik monositler) (%)</b>	<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (ara-form monositler) (%)</b>	<b>CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> (klasik olmayan monositler) (%)</b>
MS1.1	36.2	5.18	23
MS1.2	17.9	7.46	16.1
MS1.3	28.9	4.72	20.8
MS1.4	23.3	4.79	5.85
MS1.5	33.6	6.49	9.81
MS1.6	23.9	3.53	27.1
MS1.7	20.2	5.98	14.6
MS1.8	25.2	8.23	14.9
MS1.9	16	6.79	24.1
MS1.10	15.1	4.46	26
MS1.11	25.5	5.55	17.3
MS1.12	12.7	2.13	12.4
MS1.13	5.9	5.47	14.7
MS1.14	32	8.98	19.9
MS1.15	10.8	6.73	13.1
MS1.16	20	5.88	33.3
MS1.17	6.58	5.29	43.2
MS1.18	15.4	3.58	14.2
MS1.19	19.6	8.3	33
MS1.20	18.7	7.5	29.2
MS1.21	18.1	4.1	16
MS1.22	21.9	2.92	20.7
MS1.23	15.1	7.74	18.1
MS1.24	14.8	4.1	20.2
MS1.25	19.3	3.53	28.5
MS1.26	27.6	9.35	20.3
MS1.27	19.3	6.66	17.9
MS1.28	14.1	1.33	27.2
MS1.29	19.8	2.44	6.61
MS1.30	32.6	3.24	18.7
MS1.31	29.4	1.2	14.8
MS1.32	24.7	4.15	27.8
MS1.33	25.8	4.73	29.1

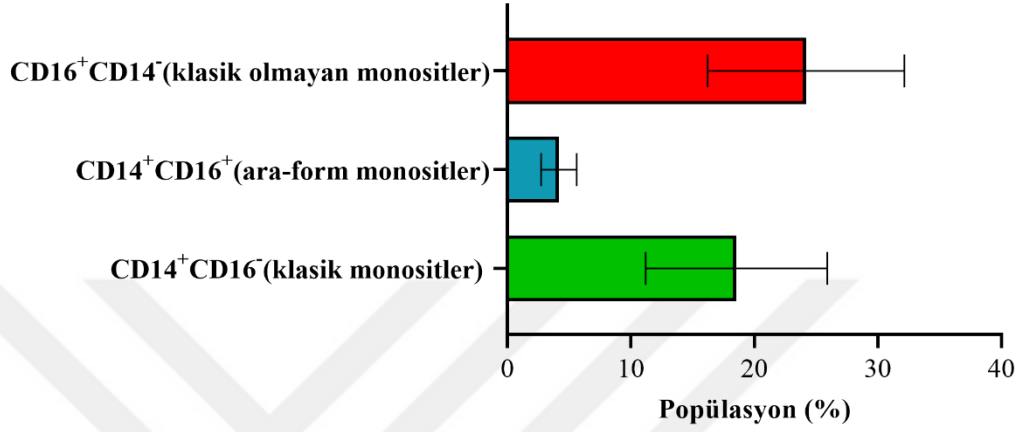


Şekil 6.5.2: RRMS (EDSS 0-3) hastalarına ait üç alt grup monosit popülasyon ortalamaları. n: 33.

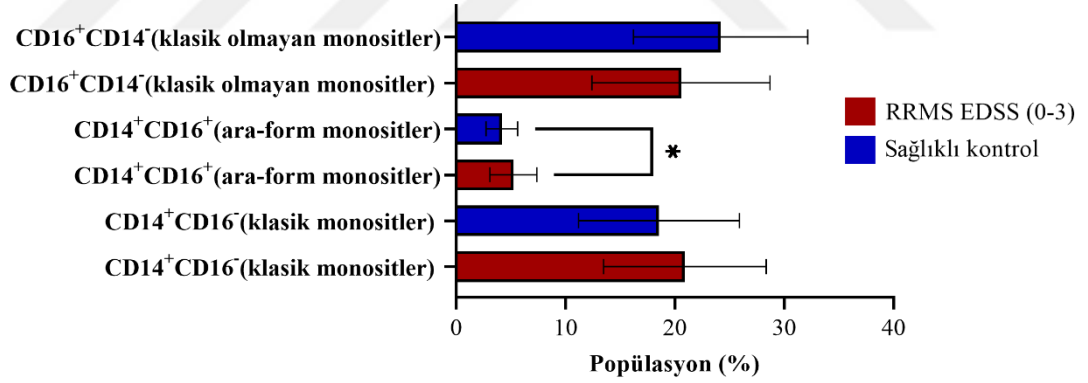
Tablo 6.5.2: Sağlıklı bireylere ait üç alt grup monosit popülasyon yüzdeleri.

Kontrol Kodu	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> (klasik monositler) (%)	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> (ara-form monositler) (%)	CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> (klasik olmayan monositler) (%)
C1.1	21.9	3.46	18
C1.2	10.7	2.56	25.2
C1.3	31.5	3.62	20.6
C1.4	10.1	5.73	13.4
C1.5	14.1	2.64	26.7
C1.6	11.4	2.75	14.8
C1.7	22	3.83	25.9
C1.8	37.7	6.8	14.1
C1.9	16	3.88	22.6
C1.10	10.5	2.09	22.4
C1.11	17	4.31	34.3
C1.12	17.8	3.58	16
C1.14	11.7	4.82	40.9
C1.16	14.5	6.31	14.7
C1.17	27	4.26	34.9
C1.19	21.5	6.34	40.2
C1.20	20.6	4.57	22.2
C1.21	15.6	4.04	29.7
C1.22	26.5	3.68	25.2
C1.23	6.46	3.07	31.2

C1.25	17.7	2.15	17.7
C1.30	21.8	5.47	19.2
C1.31	16.8	3.17	28.5
C1.32	24.2	6.87	22



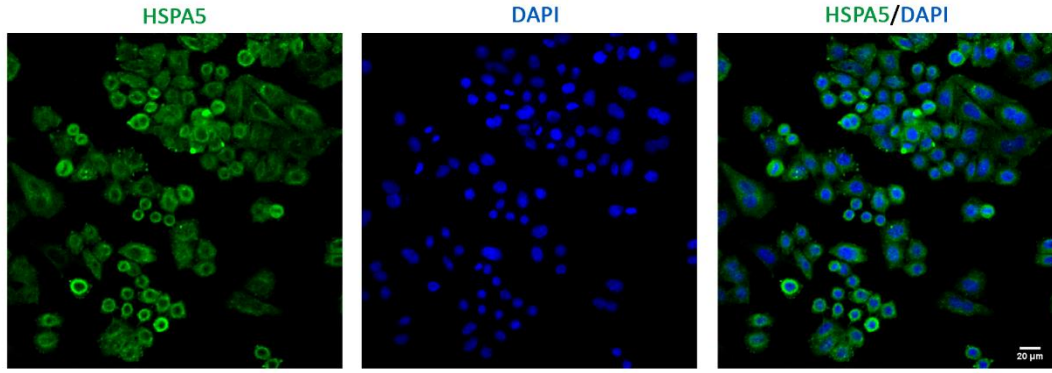
Şekil 6.5.3: Sağlıklı bireylere ait üç alt grup monosit popülasyon ortalamaları. n: 24.



Şekil 6.5.4: RRMS (EDSS 0-3) ile sağlıklı bireylerin monosit alt grup popülasyon karşılaştırılması. RRMS (EDSS 0-3) n: 33 ve sağlıklı bireyler n: 24.

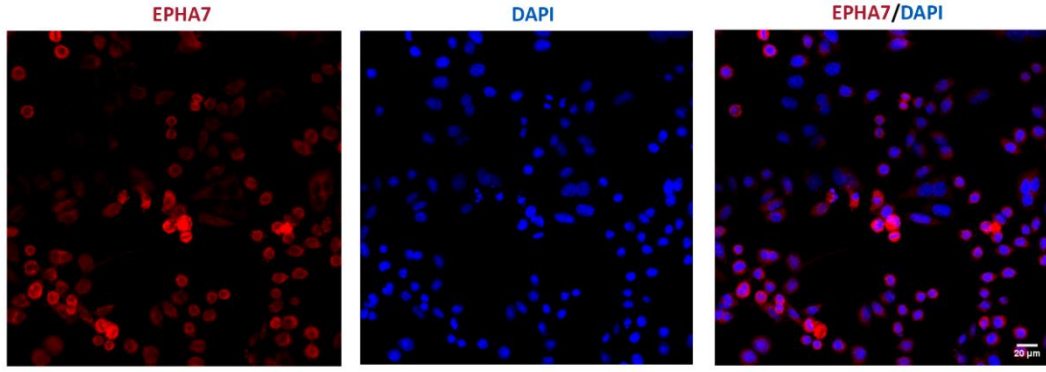
## 6.6. HSPA5 ve EPHA7 Proteinlerinin Lokalizasyonunu Belirleme

MS hastalarında ve sağlıklı bireylerde HSPA5 ve EPHA7 proteinlerine ait ifade seviyelerini ölçmeden önce bu proteinlerin hücre içi lokasyonu ve kullanılan antikörlerin çalışma durumunu tespit edebilmek adına her bir proteinin ifade edildiği hücre hatlarında ifade seviyelerine bakılmıştır. İlk olarak HSPA5 için kullanılan antikörün HELA hücrelerinde ifade seviyesine bakılmıştır (Resim 6.6.1). HSPA5 ifadesi hem hücre içinde ER yakınlarında hem de membran üzerinde tespit edilmiştir.



**Resim 6.6.1:** HSPA5 proteininin HELA hücrelerindeki ifadesi. HELA hücrelerinin hepsinde HSPA5 (yeşil) tespiti yapılmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20 µm.

EPHA7 proteininin ifadesinin tespiti için HELA hücreleri kullanılmıştır. EPHA7'nin yüzey proteini olduğu HELA hücrelerine yapılan immunositokimyasal boyama ile gösterilmiştir (Resim 6.6.2). Bu şekilde elimizdeki HSPA5 ve EPHA7 antikörlerinin MS hastalarında ve sağlıklı bireylerde bu proteinlerine ait ifade seviyelerini tespit etmede uygun olduğunu belirlenmiştir.

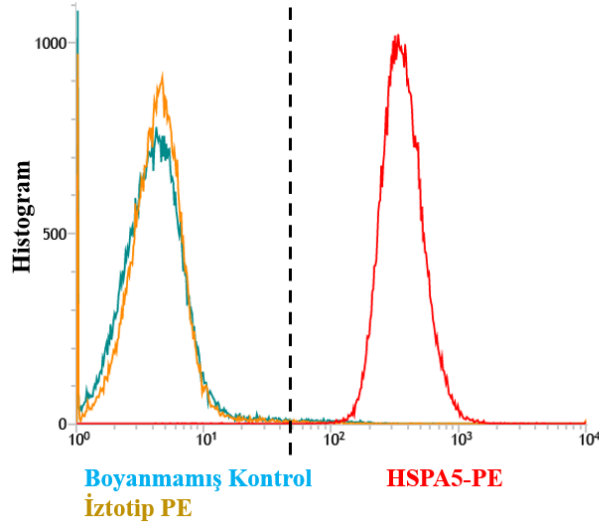


**Resim 6.6.2:** EPHA7 proteinin HELA hücrelerindeki ifadesi. HELA hücrelerinin hepsinde EPHA7 (kırmızı) tespiti yapılmıştır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20 µm.

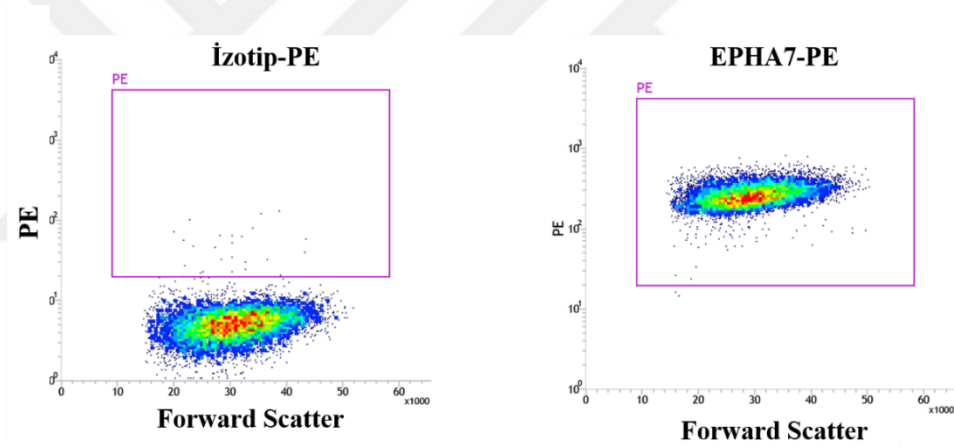
### **6.7. HSPA5 ve EPHA7 Protein İfadelerinin Hücre Hattında Akış Sitometrisi ile Gösterimi**

MS hastası ve sağlıklı bireylere ait kanlarda HSPA5 ve EPHA7 ifadesinin akış sitometrisinde tespiti ve çalışmanın rutine bağlanması için ilk olarak hücre hattında kullanacağımız protokol optimize edilmiştir. Akış sitometrisindeki analizlerimiz konjüge antikolar ile yapıldığından pozitif olan hücre ayrımını tespit etmek adına her bir konjüge antikorun izotipi (IgG-PE) kullanılarak bir eşik değeri belirlenmiştir. Akış sitometrisi histogram analizinde HSPA5 ifadesi HELA hücre hattında gösterilmiştir. HELA hücrelerinde HSPA5 ifadesi seviyesi %100'ye yakın olduğu izotip boyamasının sağladığı eşik değeri ile tespit edilmiştir (Şekil 6.7.1). Benzer şekilde akış sitometrisinde EPHA7 ifadesine HELA hücre hattında bakılmıştır. Akış sitometrisi popülasyon ayrımı gösterimi ile beraber, EPHA7 ifadesi seviyesinin HELA hücrelerinde %100'ye yakın olduğu izotip antikorunu (IgG-PE) boyaması ayrımıyla tespit edilmiştir (Şekil 6.7.2).





Şekil 6.7.1: HSPA5'i ifade eden HELA hücre popülasyon oranının gösterimi.

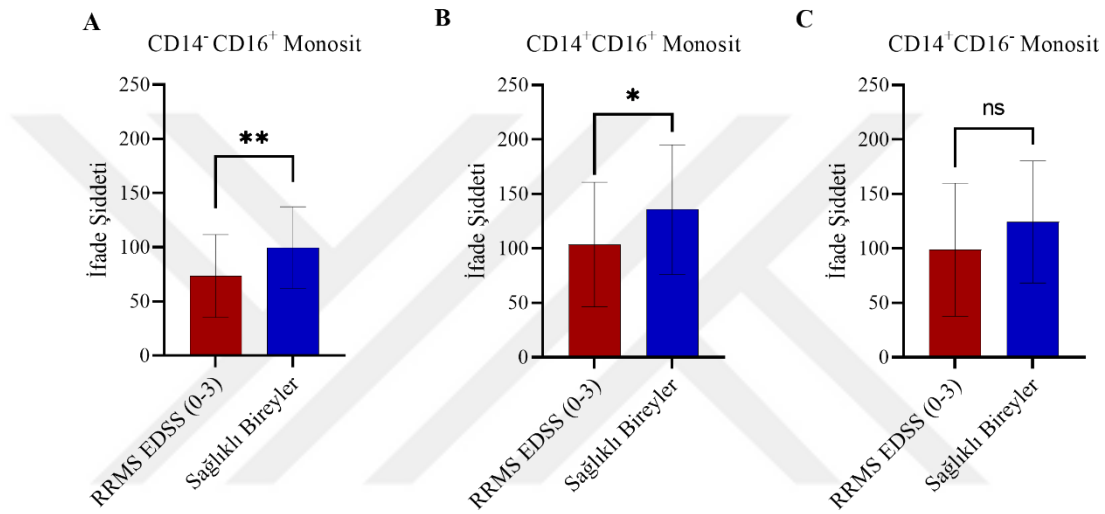


Şekil 6.7.2: EPHA7'i ifade eden HELA hücre popülasyon oranının gösterimi.

## 6.8. MS Hastalarına Ait Monosit Hücre Gruplarında HSPA5 İfadesi Sağlıklı Bireylere Göre Daha Az Tespit Edilmiştir

MS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında ilgili hücre popülasyonunun yüzde kaçının HSPA5 proteinini ifade ettiği ve ifade şiddetleri arasında fark olup olmadığı histogramları alınarak analiz edilmiştir. 6.7. bölümde belirtildiği gibi HSPA5 için kullanılan izotip antikorun oluşturduğu eşik değeri belirlenmiştir. Belirlenen bu eşik değerden daha yüksek sinyal veren hücreler pozitif olarak kabul edilmiştir. Sonrasında ifade şiddetlerinin analizi protein şiddetini izotip şiddetine normalize edilerek

hesaplanmıştır. Normalizasyon için izotip antikorun ifade şiddetinin medyan değeri ve eşik değerini aşan proteine özgü antikorun ifade şiddetinin medyan değerleri hesaplanmıştır. Antikorun medyan değeri izotipin medyan değerine bölünerek normalize edilmiş medyan değeri elde edilmiştir. Bu değerler MS hastaları ve sağlıklı bireylerin monositler alt grup hücreleri için ayrı ayrı hesaplanarak ortalamaları alınmıştır. Elde edilen sonuçlarda, RRMS EDSS (0-3) grubunun klasik olmayan ve ara form monosit alt grup hücrelerinde sağlıklı bireylere göre HSPA5 ifadesinde anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 6.8.1).

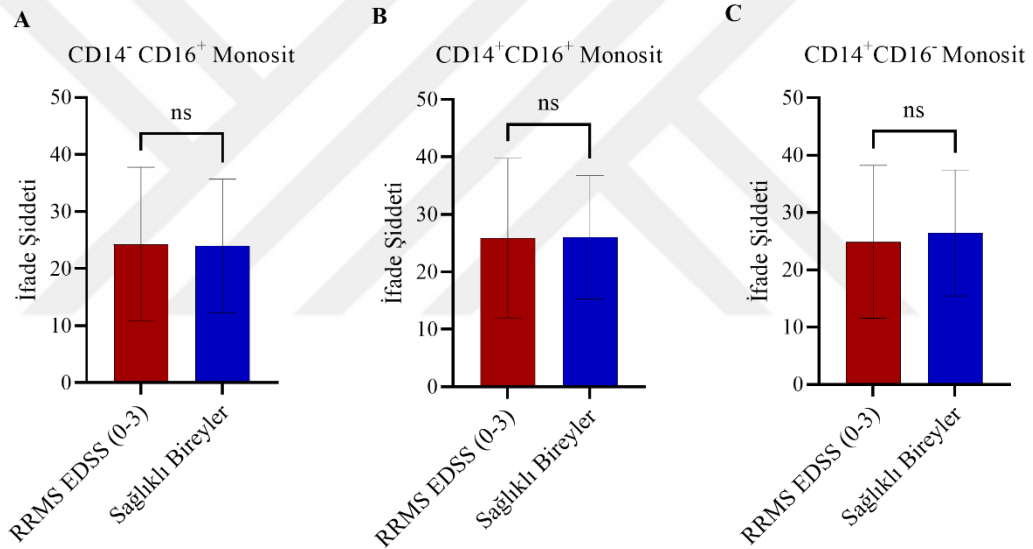


**Şekil 6.8.1:** RRMS EDSS (0-3) hastaları ve sağlıklı bireylerin monosit alt grup hücrelerinde HSPA5'in normalize edilmiş medyan değerlerinin ortalaması. (a) Klasik olmayan monosit hücre grubunda, (b) ara form monosit hücre grubunda HSPA5 ifadesi MS hastalarında sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede az tespit edilmiştir. (c) klasik monosit hücre grubunda HSPA5 ifadesi MS hastalarında sağlıklı bireylere göre anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (RRMS EDSS (0-3) için n: 31, sağlıklı bireyler için n: 22) ve \* $p$ <0.1 ve \*\* $p$ <0.05 olarak ifade edilmiştir.

### 6.9. MS Hastalarına Ait Monosit Hücre Gruplarında EPHA7 İfadesi Sağlıklı Bireylere Göre Daha Değişiklik Tespit Edilmemiştir

MS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında ilgili hücre popülasyonunun yüzde kaçının EPHA7 proteinini ifade ettiği ve ifade şiddetleri arasında fark olup olmadığı histogramları alınarak analiz edilmiştir. 6.7. bölümde belirtildiği gibi EPHA7 için

kullanılan izotip antikorun oluşturduğu eşik değeri belirlenmiştir. Belirlenen bu eşik değerden daha yüksek sinyal veren hücreler pozitif olarak kabul edilmiştir. Sonrasında ifade şiddetlerinin analizi protein şiddetini izotip şiddetine normalize edilerek hesaplanmıştır. Normalizasyon için izotip antikorun ifade şiddetinin medyan değeri ve eşik değerini aşan proteine özgü antikorun ifade şiddetinin medyan değerleri hesaplanmıştır. Antikorun medyan değeri izotipin medyan değerine bölünerek normalize edilmiş medyan değeri elde edilmiştir. Bu değerler MS hastaları ve sağlıklı bireylerin monositler alt grup hücreleri için ayrı ayrı hesaplanarak ortalamaları alınmıştır. Elde edilen sonuçlarda, RRMS EDSS (0-3) grubunun monosit alt grup hücrelerinde sağlıklı bireylere göre EPHA7 ifadesinde anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir (Şekil 6.9.1).

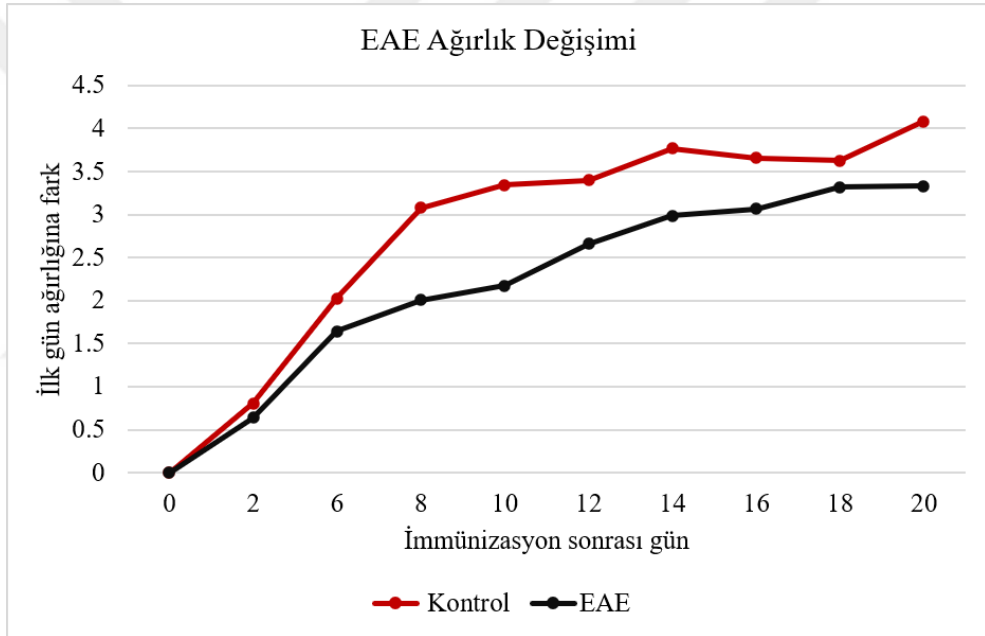


**Şekil 6.9.1:** RRMS EDSS (0-3) hastaları ve sağlıklı bireylerin monosit alt grup hücrelerinde EPHA7'in normalleştirilmiş medyan değerlerinin ortalaması. (a) Klasik olmayan monosit hücre grubunda, (b) ara form monosit hücre grubunda ve (c) klasik monosit hücre grubunda EPHA7 ifadesi MS hastaları ve sağlıklı bireyler kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (RRMS EDSS (0-3) için n: 31, sağlıklı bireyler için n: 24).

## 6.10. EAE Modelinin Oluşturulması ve Skorlanması

MS hastalığı mekanizmasında HSPA5 ifadesinin ve bu proteine ait sinyal yollarının araştırılması amacıyla demiyelinizasyon bölgelerinin tespiti için EAE

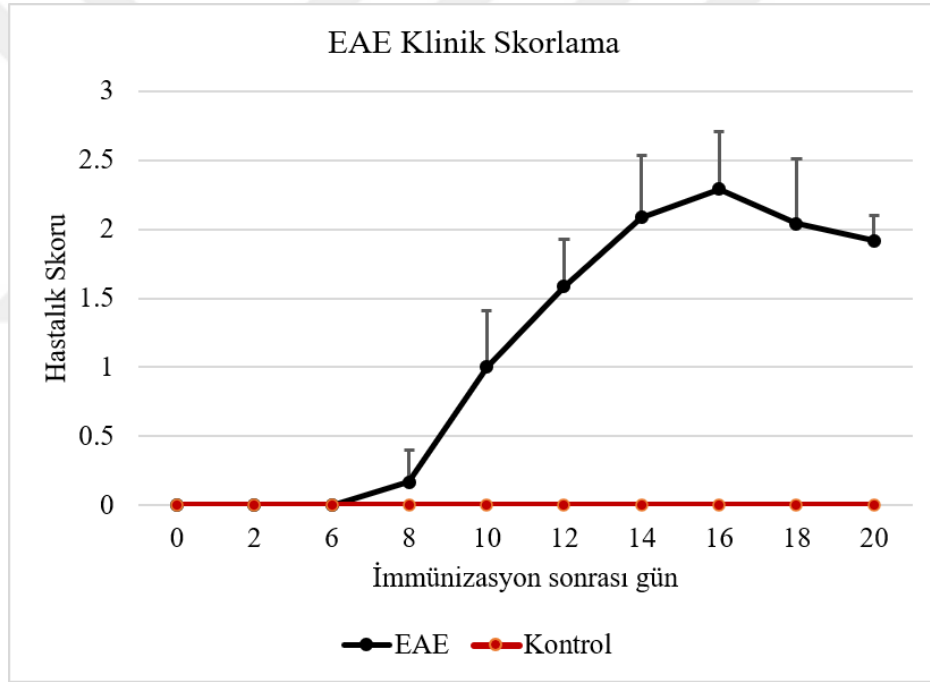
modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan EAE model çalışmasında altı fare ile EAE model oluşturulmuştur. Kontrol için ise üç fare kullanılmıştır. Model oluşturmak için altı haftalık fareler kullanılmıştır. Tüm fareler, enjeksiyondan 2 ila 4 gün sonra enjeksiyon bölgelerinde bariz emülsiyon şişlikleri geliştirmiştir. Bütün fareler bu şişlikleri deney süresi boyunca korumuştur. Bu şişliklerin EAE model oluşturmada bir yan etki oluşturduğu gözlemlenmemiştir. Model oluşturulması için yapılan immünizasyondan sonra hem EAE hem de kontrol farelerin 20. güne kadar kilo değişimleri takip edilmiştir. Farelerin başlangıç kilosuna göre değişimi Şekil 6.10.1’de verilmiştir. Her iki grupta da kilo artışı gözlemlenmiştir fakat EAE farelerinde kontrol farelerine göre az kilo artışı tespit edilmiştir.



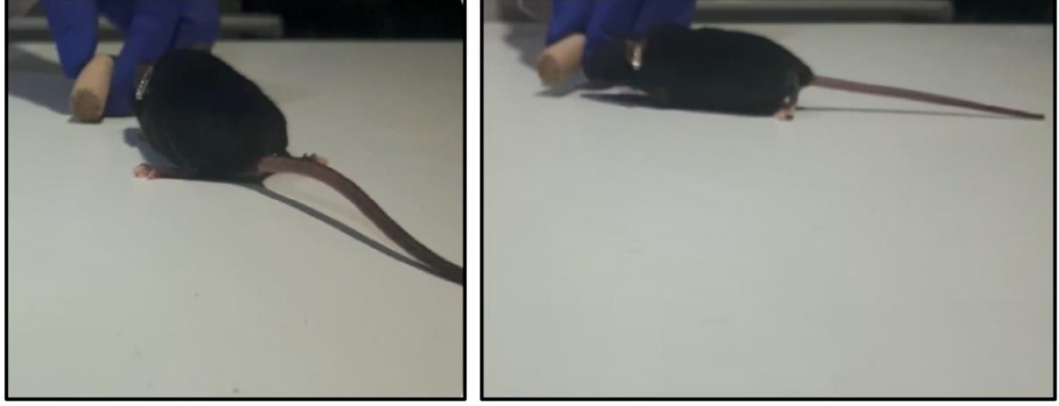
**Şekil 6.10.1:** EAE ve kontrol farelerinin kilo değişimi. İmmünizasyondan sonraki 20 gün boyunca kilo takibi iki günde bir yapılmıştır. Başlangıç kilo değişimine farkı gösterilmiştir. Değişim grupların ortalamasını alarak gösterilmiştir. EAE fare: 6, kontrol fare: 3.

Ağırlık takibinin yanı sıra, immünizasyon başlangıcından itibaren fareler klinik skorlamaya tabii tutulmuştur. İki günde bir farelerin yürüyüşleri, kafesteki hareketleri ve kafes kenarlarına kuyruklarıyla ve uzuvlarıyla tutuşları takip edilmiştir. Skorlama belirtildiği üzere Tablo 5.13.1’e göre yapılmıştır. Kronik EAE fare modeli başarıyla

oluşturulmuştur. İmmünizasyon sonrası hastalığa ait klinik bulguların artması, hastalığın pik yaptığı gün ve sonrasında hafif bir azalmaya sabit bir şekilde devam etmesi gösterilmiştir (Şekil 6.10.2). EAE indüklenen farelerde yapılan skorlamada 3 puanın üzerine çıkan fare olmamıştır. İmmünizasyon sırasında herhangi bir sebepten kaynaklanan bir fare ölümü gerçekleşmemiştir. Skorlamada ortalama puanı 3 olan EAE fare hastalığının pik yaptığı dönemde çekilen fotoğraflarla gösterilmiştir (Resim 6.10.1). Bu farede ilk bulgu olarak kuyruk hissizliği gözlemlenmiştir. Kuyruğun düşmesini takiben arka uzuvlarda hissizlik ve yürüyüşte koordinasyon bozukluğu tespit edilmiştir. Vücudu yere çok yakın bir şekilde hareket etmeye devam etmiştir. EAE model oluşturulmuş farelerde bunlara benzer bulgular tespit edilmiştir ve ona göre skorlamaları yapılmıştır (Şekil 6.10.2).



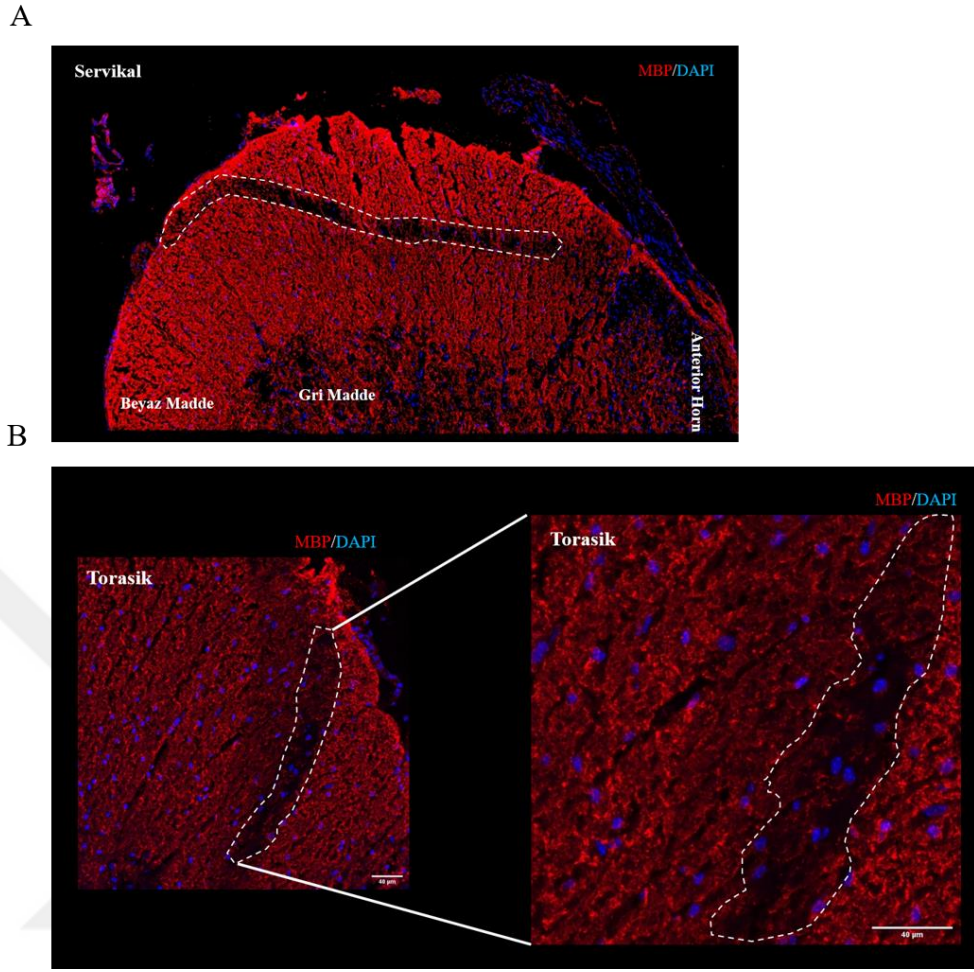
**Şekil 6.10.2:** EAE ve kontrol farelerinin klinik skorlaması. İmmünizasyondan sonraki 20 gün boyunca klinik bulguların takibi iki günde bir yapılmıştır. Hastalığın artış gösterdiği günler 9 ila 14 gün arasında, pik yaptığı zaman ise 16 gün ve sonrasıdır. 20. günden itibaren sabit bir profil göstermiştir. Daha sonrasında kronik bir EAE model olduğu için skorlama düşüş gözlemlenmiştir. Değişim grupların ortalamasını alarak gösterilmiştir. EAE fare: 6, kontrol fare: 3.



**Resim 6.10.1:** EAE fare modeli. Fotoğraf klinik skoru ortalama 3 olan farenin hastalığı pik yaptığı anda çekilmiştir.

### **6.11. EAE Model Farelerin Omuriliklerinde Demiyelinizasyonun Gösterilmesi**

Oluşturduğumuz EAE modelinde omurilikteki demiyelinizasyon bölgelerinin tespiti için farelerin 5.16. bölümde bahsedildiği gibi omuriliklere ait kesitler alınıp immunohistokimyasal boyamaları yapılmıştır. Omurilikte bulunan beyaz maddedeki demiyelinizasyon bölgelerinin tespiti MBP antikoru ile yapılmıştır. Servikal bölgede (Resim 6.11.1.a) ve torasik bölgede (Resim 6.11.1.b) demiyelinizasyon bölgeleri tespit edilmiştir. Belirlenen bölgelerde hücre çekirdeklerinin varlığı bölgede sadece MBP ifadesinde bir azalma olduğunu göstermiştir. Lumbar ve sakral bölgelerinde demiyelinizasyon tespit edilmemiştir.

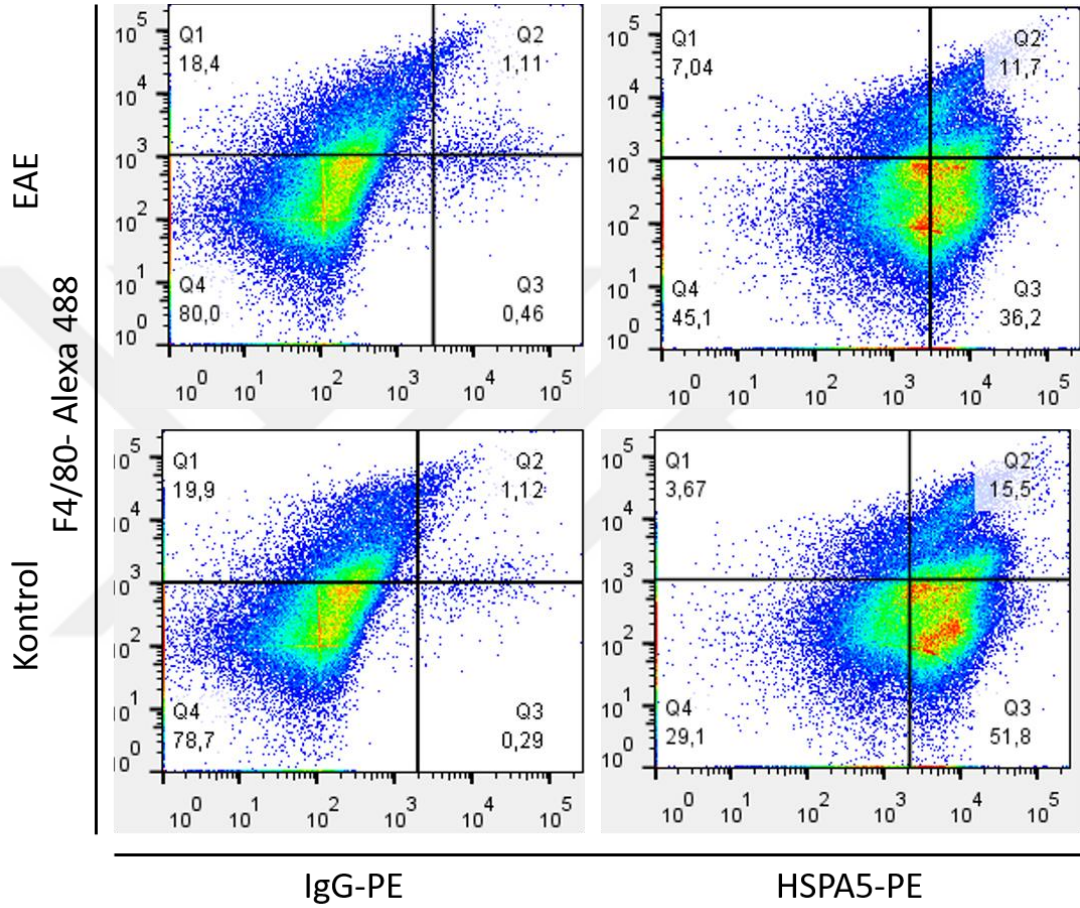


**Resim 6.11.1:** EAE fare omuriliğinde demiyelinizasyon bölgelerinin gösterilmesi. (a) Servikal bölgedeki, (b) Torasik bölgedeki kesikli çizgi içinde MBP sinyalinin olmaması demiyelinizasyon bölgelerini gösterir. Kesitler, immünizasyonun 20. günde sakrifiye edilen EAE ortalama skoru 3 olan fareden alınmıştır. Miyelin MBP (kırmızı) ve çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 40 µm.

## 6.12. EAE Farelerinden Elde Edilen Dalak Hücrelerinde HSPA5 İfadesinin Akış Sitometrisi ile Gösterimi

EAE ve kontrol farelerinden izole edilen dalakların diseksiyonundan sonra ortaya çıkan hücrelerde akış sitometrisi analizi ile monosit/makrofaj popülasyonundaki HSPA5 ifadesi tespit edilmiştir. Dalak hem monosit/makrofajlar hem de lenfositler için bir kaynak oluşturduğundan ayrımı görebilmek adına F4/80 yüzey belirteci ile hücreleri işaretleyip F4/80<sup>+</sup> hücrelerde HSPA5 kıyaslaması

yapılmıştır. F4/80<sup>+</sup> popülasyon yüzdesi EAE ve kontrol fareleri arasında değişiklik gösteren HSPA5 ifadesinin tespiti için kullanılan konjüge PE-HSPA5'in normalizasyonu IgG-PE göre yapılmıştır ve kontrol fare dalak hücrelerinde EAE faresine göre daha fazla HSPA5 ifade eden F4/80<sup>+</sup> hücresi tespit edilmiştir (Şekil 6.12.1).

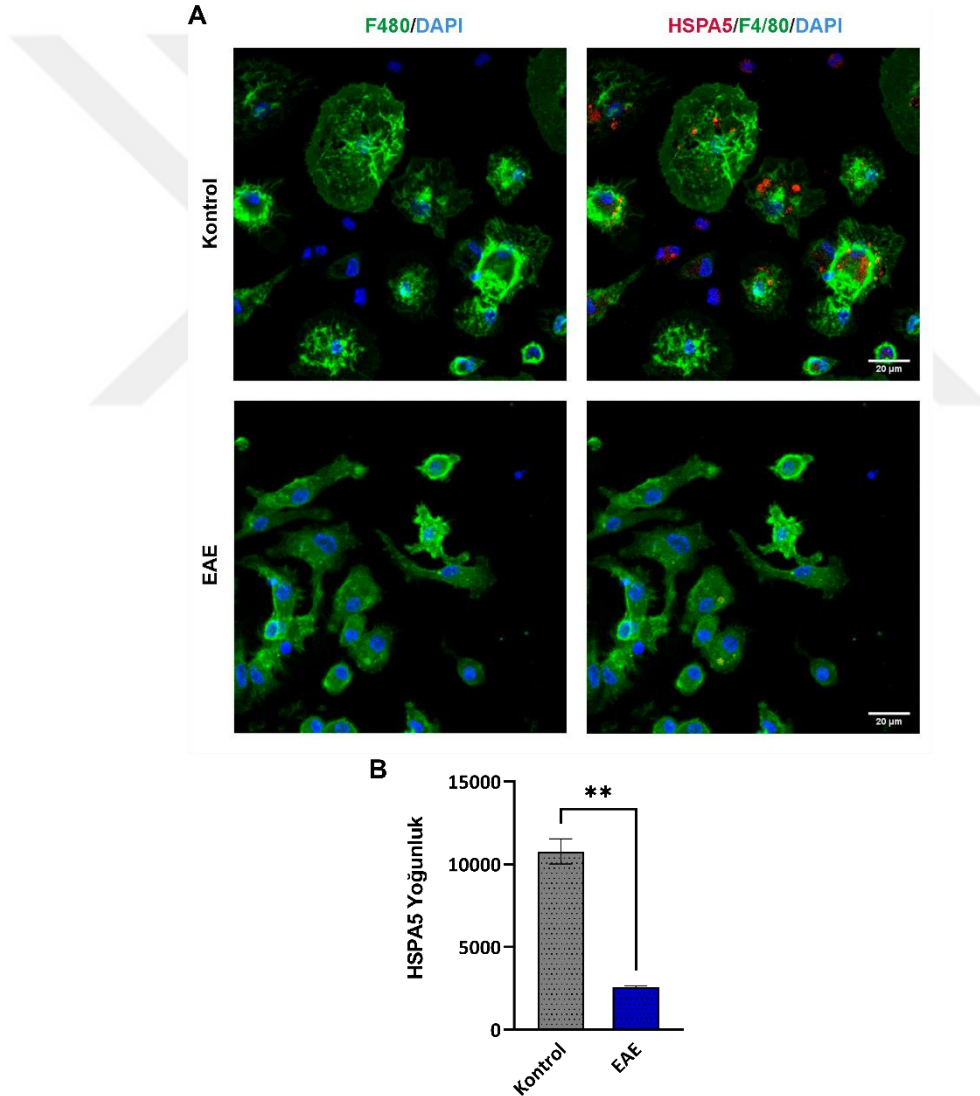


**Şekil 6.12.1:** HSPA5 ifadesinin EAE ve kontrol faresi dalak hücrelerinde akış sitometrisi ile gösterimi. Protein ifadesi için HSPA5-PE kullanılmıştır. İzotip antikor için tavşan IgG-PE kullanılmıştır.



### 6.13. EAE Farelerinden Elde Edilen Dalak Hücresi Kültürlerinde HSPA5 İfadesi Tespiti

EAE ve kontrol farelerinden izole edilen dalakların diseksiyonundan sonra ortaya çıkan hücreler kültür koşullarında inkübasyon edilmiştir. 3. günün sonrasında monosit/makrofajların adherent hücre olmasından dolayı petriye yapışmasının takibinde yüzen hücreler olan lenfositler uzaklaştırılmıştır. 7. güne kadar MCSF ile muamele edilen dalak hücreleri makrofaja doğru farklılaşmışlardır. HSPA5 ifadesi EAE fare dalak makrofajlarında kontrole göre anlamlı derecede az ifade edilmiştir (Resim 6.13.1.a, 6.13.1.b).



**Resim 6.13.1:** EAE ve kontrol fare dalak makrofajlarında HSPA5 ifadesi tespiti. (a) Makrofajlar F4/80 (yeşil) ile boyanmıştır. HSPA5 (kırmızı) hücre içinde tespit edilmiştir.

Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Ölçek çubukları, 20 µm. (b) HSPA5 boyama yoğunluğunun ölçülmesi protein ifadesinin kontrol farelerinde EAE farelerine göre daha yüksek olduğunu doğrulamıştır. Veriler, ortalama ± SD ve \*\*p <0.01 (eşleştirilmemiş t testi) olarak ifade edilmiştir.



## 7. TARTIŞMA

Tez çalışmasındaki ilk amaç bir *in vitro* ortak kültür modeli oluşturmaktır. Makrofajlar ve oligodendrositler arasında kurulan bu ortak kültür MS'in mekanizması anlamak ve ona karşı etkili bir tedavi oluşturmak için önem teşkil etmektedir. MS, bağışıklık sisteminin aracılık ettiği mekanizmasının da tam olarak bilinmediği bir MSS hastalığıdır, bu nedenle MS'i deneyler için modellemek özellikle zordur (173). MS'in çeşitli patolojik yönlerini modellemek için *in vitro* platformlar kullanılmaktadır (174–176). Bu nedenle, bu tez çalışmasında yeni bir *in vitro* immün-miyelin platformu geliştirilmiştir: MS'de fagositik hücreler ve miyelin arasındaki doğrudan etkileşimleri incelemek için izole edilmiş fare korteks oligodendrositleri ve peritoneal makrofajlarının ortak kültürü.

İmmünopatolojik kanıtlar, MSS'deki MS lezyonlarının miyelin hasarı ve olgun oligodendrosit hücre ölümü içerdiğini göstermiştir (174,177). Periferik proinflamatuvar bağışıklık hücreleri, kan-beyin bariyerini (KBB) geçerek MSS'de miyelin tabakalarına, aksonlara ve olgun oligodendrositlere zarar vermektedir (178). Sızan makrofajlar, aktif MS lezyonlarında esas olarak M1 durumuna görülmektedir (179). Gözlemlenen bu etkileşimleri analiz etmek için peritoneal makrofajlarını yani periferik bağışıklık hücrelerini olgun oligodendrositler ile birlikte kültüre konulmuştur. Peritoneal makrofaj seçimindeki en önemli sebeplerden biri tamamen olgunlaşmış makrofajlar olduklarıdır (101,102). Bu yüzden de immünolojik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, miyelin üretebilen oligodendrositlerle zengin kültür üretebilmek için yenidoğan fare kullanılmıştır. Majör histokompatibilite kompleksi (MHK) uyumsuzluğunu önlemek için, aynı fare türünden peritoneal makrofajlar ve yenidoğan korteks hücreleri izole edilmiştir. Peritoneal makrofajlar aktif olmayan naif durumundadır (MΦ) ve dış uyaranlarla proinflamatuvar bir M1 durumuna indüklenebilmektedir (180–182). Oluşturulan *in vitro* platformunda, oligodendrositler M1 makrofajları tarafından öldürüldüğü için olgun oligodendrositlerin sayısı önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 7.1). Buna ek olarak, M1 makrofajları miyelin döküntülerini fagosite etmektedir. Bu nedenle oluşturulan ortak kültür platformunda peritoneal M1 makrofajları, *in vivo* olarak sızan makrofajlara benzer şekilde reaksiyona girmektedir. *in vivo* demiyelinizasyona benzer şekilde, miyelin döküntülerini fagosite ettikten sonra M1 makrofajlarının ortak kültürlerdeki inflamasyonu ağırlaştırmış olması mümkün

görülmektedir. Bu nedenle, oluşturulan ortak kültürlerde T hücrelerinin de eklenmesi demiyelinizan plakları daha fazla taklit etmeye yardımcı olabilir. Ayrıca, toplam oligodendrosit soy hücre sayısında önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, M1 makrofajları muhtemelen sadece olgun oligodendrositlere zarar vermemektedir.

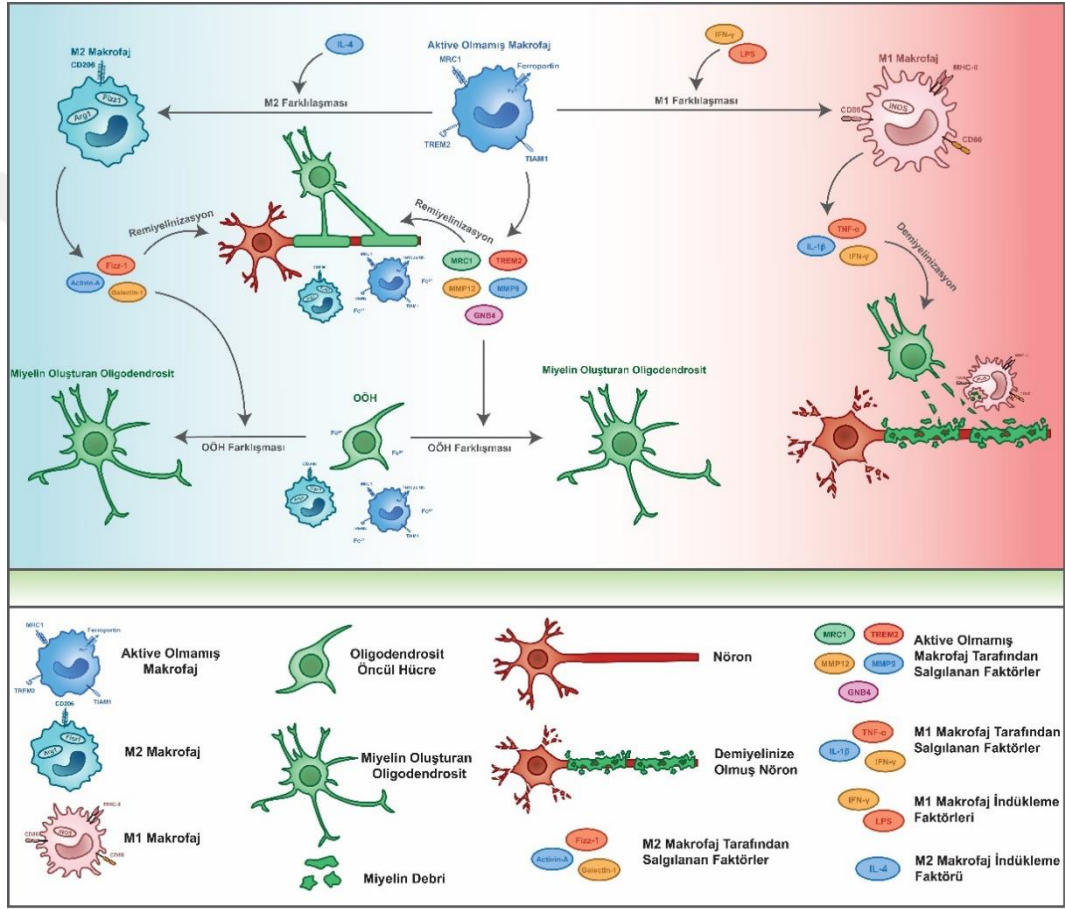
Remiyelinizasyon, OÖH'lerin hasarlı bölgeye göçüne ve bunların olgun miyelin üretebilen oligodendrositlere farklılaşmasına dayanmaktadır (183). M2 makrofajları, immün düzenleyici veya antiinflamatuvar makrofajlar olarak bilinmektedir (184). Çoğu durumda makrofajlar M1 ve M2 durumları arasında plastisite sunmaktadır (87,115). MSS remiyelinizasyonu için MS lezyonlarında makrofajlar M1'den M2 baskın yanıt geçiş gözlemlenmektedir (22). M2 makrofajlarından aktivin-A'nın salgılanması, remiyelinizasyon sırasında OÖH'lerin farklılaşmasını arttırmak için gereklidir. Ayrıca, M2 makrofajlarındaki galektin-3, oligodendrositlerin farklılaşması yoluyla miyelin yapısını koruyucu bir etki sunmaktadır (Şekil 7.1) (185,186). Oluşturulan *in vitro* ortak kültür platformunda M2 makrofajlarının olgun oligodendrositlerin sayısını arttırdığını gösterilmiştir. Bu nedenle, farklı polarizasyon durumlarındaki makrofajların oligodendrosit üzerindeki etkilerini incelemek için oluşturulan *in vitro* ortak kültür platformunun kullanılabilirliğini ortaya konulmuştur.

Makrofajların polarizasyonu ortamdaki sitokinlerin uzaklaştırılmasıyla kolayca tersine çevrilebilmekte ve temel naif makrofaj durumuna dönebilmektedir (177). Buna ek olarak, MS lezyonları M1 veya M2'ye karşı net bir polarizasyon göstermeyen makrofajları barındırmaktadır (82). İnflamasyon olmadan makrofaj-oligodendrosit etkileşimlerini incelemek için naif peritoneal makrofajlarını oligodendrositler ile birlikte kültürlenmiştir. İlginç bir şekilde, MBP<sup>+</sup> oligodendrosit sayısı önemli ölçüde arttırmıştır ancak bu ortak kültürlerde toplam oligodendrosit soy hücrelerinin sayısında bir değişim gözlenmemiştir. Böylece inflamasyon yokluğunda naif makrofajlarının OÖH'lerin olgun miyelinleştirici oligodendrositlere farklılaşmasını desteklediğini gösterilmiştir (Şekil 7.1). Oluşturulan *in vitro* ortak kültür platformunda naif makrofajların remiyelinizasyon sürecine katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir. Bu nedenle, inflamasyonu inhibe ederken infiltre olan periferik makrofajların sayısını arttırmanın hastalarda mevcut OÖH'ler yoluyla remiyelinizasyonu artırabileceğini tahmin edilebilmektedir. Naif makrofajların etkisi hakkında moleküler bir anlayışa

sahip olmak için, daha önce yayınlanmış bir çalışmada ifade seviyeleri naif makrofajlar ve M1 makrofajları arasında önemli ölçüde değişen genler araştırılmıştır (84). Daha sonra, makrofajların plazma zarındaki veya hücre dışı ortama salgılanan proteinleri manuel olarak tanımlanmıştır. Oligodendrositler üzerindeki bilinen etkilerini bulmak için bu proteinlerin her biri için kapsamlı bir literatür araştırması yapılmıştır. M1 makrofajlarında ifadesi artan genler için oligodendrosit ölümü ve fagositozla ilgili genleri seçilmiştir. Demiyelinizasyonu artıran yeni bir protein bulunmamıştır fakat TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$ 'nın BOS'ta, MS hastalarının plazmasında ve ayrıca EAE hayvan modelinde aktif olarak demiyelinizan plaklarda bol miktarda görüldüğü doğrulanmıştır (187,188). Naif makrofajlarda ifadesi artan genler için OÖH'lerin olgunlaşmasında ve/veya olgun oligodendrositlere farklılaşmasında rol oynayan genleri seçilmiştir (Şekil 7.1). Naif makrofajlarda ifadesi artan genler arasında, plazma membran proteinleri: MRC1, TREM2, TIAM1 ve Ferroportin, salgılanan proteinler: GNB4, MMP12 ve MMP9, oligodendrositlerin ve / veya oligodendrosit olgunlaşması için OÖH farklılaşmasını teşvik etmek için tanımlanmıştır (Şekil 7.1) (189–194). Bu aday proteinlerden biri veya daha fazlası naif makrofajlarının demiyelinizasyon üzerindeki olumlu etkisini açıklayabilmekte ve olası bir ilaç hedefi sunabilmektedir.

Oligodendrositçe zengin kültür GalC antikoruna ile inkübe edildiğinde artan sayıda MBP<sup>+</sup> oligodendrosit gözlemlenmiştir. Bu, belirli bir kültür koşulunda olgun oligodendrositlere karşı bir antikorun varlığının olgunlaşmayı tetiklediği anlamına gelebilir. Başka herhangi bir yüzey antikorunu test edilmediği için gözlenen bu etkinin GalC antikoruna özgü olup olmadığından emin olunmamaktadır. Ayrıca, SOX10<sup>+</sup> hücre sayısında bir artış gözlemlenmemiştir bu da GalC antikorunun etkisinin artan olgunlaşma ile sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, hücre-hücre etkileşimlerini değerlendirmek için hem demiyelinizasyon hem de remiyelinizasyon süreçlerini inceleme imkânı sunan bir *in vitro* ortak kültür platformu oluşturulmuştur. Elde edilen bulgular makrofaj polarizasyonunun dengesini incelemek için peritoneal makrofajların periferik bir bağışıklık hücresi olarak kullanılmasının, MSS infiltrasyonunu ve bunun oligodendrositler üzerindeki etkilerini detaylandırmak için gelecekteki çalışmalar için bir alan sağladığını göstermiştir.



**Şekil 7.1:** Makrofajların oligodendrositler üzerindeki ikili rolü.

Tezin ikinci kısmında proteom çalışmasının ışığında ortaya konulan aday proteinlerinin MS hastalarında değişimin tespiti amaçlanmıştır. İnteraktom çalışmasında ortaya çıkan aday 10 proteinden betweenness değeri en yüksek olan EPFA7 ve onu takiben HSPA5 proteinleri seçilip MS hasta kanlarında ifade seviyeleri ölçülmüştür. MS hastaları ve sağlıklı bireyler üzerinde yapılan akış sitometrisine örnek

hazırlamaları Burcu Kurt Vatandaşlar ile beraber, data analizi ise Burcu Kurt Vatandaşlar tarafından yapılmıştır. Hasta kanlarından alınan bilgiler ışığında MS hastalarının dokularına ulaşılmasının zorluğundan dolayı sinyal yolaklarının analizi bir MS modeli olan EAE oluşturularak bakılması hedeflenmiştir.

RRMS, MS hastalarında ataklar ve takibinde görülen remisyon dönemleri ile karakterize olan en yaygın alt tipidir (122). MS hastalarının yaklaşık %87'si RRMS olarak sınıflandırılmıştır. Bu yüzden, bu tez çalışmasında RRMS hastalarından kan alınarak biyobelirteç tespiti amaçlanmıştır. Genişletilmiş Engellilik Durum Ölçeği (EDSS), MS'te engelliliği ölçmek ve zaman içinde engellilik seviyesindeki değişiklikleri izlemek için bir yöntemdir (195). Klinik çalışmalarda ve MS'li kişilerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hastalara erişim bakımından EDSS skoru 0-3 arasındaki hastalardan kan örneği alınmıştır. 32 RRMS EDSS (0-3) hastaya ulaşılmıştır. Hastalarının cinsiyetine ve yaşına göre denk gelebilecek 24 sağlıklı bireylerin kan örnekleri kullanılmıştır.

PKMH'ler, enfeksiyonla savaşmak için kullanılan bağışıklık sisteminin kritik bir parçası olan kan hücreleridir (196). PKMH'ler prognoz belirleme, tedavi izleme ve tedavi direnci belirteçlerinin tespiti için umut verici bir biyobelirteç olarak kullanılabilir (197). Ayrıca, PKMH'lere kolayca erişim sağlanabildiğinden hızlı ve verimli sonuç sağlamaktadır. Bu hücrelerdeki protein ifade değişimleri MS hastalığı için erken teşhis sunan biyobelirteç şeklinde kullanılabilir. PKMH'ler içinde lenfositlerin yanı sıra monositler, NK hücreleri ve dendritik hücreler de bulunmaktadır (198). Tipik olarak, lenfositler %70-90, monositler %10-20 aralığındadır, dendritik hücreler ise nadirdir ve sadece %1-2'dir. Bunun yanı sıra MSS'ye yoğun bir şekilde sızarak demiyelinizasyon ve doku yıkıma aracılık edebilen monositlerin tespiti için de PKMH analizleri önem teşkil etmektedir (199). İnsan periferik kanından elde edilen monositler, CD14'ün yüzey ekspresyonuna, yani lipopolisakarit (LPS) için yardımcı reseptöre ve CD16'ya, yani tip III Fcγ reseptörüne (FcγRIII) dayalı olarak üç alt popülasyonda sınıflandırılmaktadır (200). Bunlar CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> olan klasik monositler, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> olan ara-form monositler ve CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> klasik olmayan monositler olarak sınıflandırılmaktadır (198). Sağlıklı bir insanda popülasyon çokluğu sırasıyla klasik monositler, klasik olmayan monositler ve ara-form monositler olarak görülmektedir. Yaptığımız sağlıklı birey ve MS hastaları PKMH analizlerinde, klasik

olmayan monosit popülasyon yüzdesi klasik monositlerden daha fazla görülmektedir. Her iki grupta da en az popülasyon yüzdesi ara-form monositte tespit edilmiştir. Klasik monosit ve klasik olmayan monosit hücre gruplarında görülen bu farklılığın akış sitometrisi analizinde yaptığımız kapılamadan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Total popülasyondan lenfositlerin uzaklaştırılması için CD4<sup>+</sup> hücreleri çıkartılarak kapılama yapılmıştır. Bellek CD4<sup>+</sup> hücrelerin bazılarının CD14 ifade ettiği gözlemlenmiştir (201). Yapılmış olan kapılama ile bu hücreler elenmiş olmaktadır.

RRMS (EDSS 0-3) hastaları ile sağlıklı bireyler arasındaki monosit alt grupları popülasyonu kıyaslaması yapıldığında, ara-form monosit grubu hücre popülasyonunun MS hastalarında sağlıklı bireylere kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda RRMS (ortalama EDSS: 2.5) hastalar ile sağlıklı bireyler arasında ara-form monositin popülasyon yüzdesinin hastalarda anlamlı olmayan bir şekilde daha fazla olduğu gösterilmiştir (199). Ara-form monosit popülasyonu, bu monositlerin gerçekten yüksek uyarıcı ve inflamatuvar potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde MS lezyonlarında belirli bir polarizasyon göstermeyen makrofajların varlığı (202), bu popülasyonun periferik monositlerinden MSS'ye infiltre etmiş olabileceğini daha sonrasında çevredeki stimulantlara göre farklılaşabileceği desteklemektedir. MS hastalarında IL-10'un ana üreticilerinin CD14<sup>+</sup> monositleri olduğu ve CD16<sup>+</sup> monositlerin daha fazla IL-12 ürettiği bulunmuştur (203). Birlikte bu bulgular, MS sırasında inflamatuvar yanıtları yönlendirmede CD16<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> monosit alt grubunun önemli bir katkısı olduğunu göstermiştir.

Proteom analizinden elde edilen aday proteinlerinden HSPA5 ve EPHA7 proteinlerin MS hastalarında olası biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı adı altında MS hastalarının PKMH'lerinde akış sitometrisi analizi yapılmıştır. Biyobelirteç ya da belirteçlerin tespiti için ilk olarak protein ifadesi analiz paneli oluşturma amaçlanmıştır. Akış sitometrisinde çok fazla hasta ve sağlıklı birey analizi yapılacağı için, analizlerin rutine bağlanması adı altında elimizdeki konjüge antikorların optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Her iki proteininde hücre içindeki lokalizasyonu immunositokimyasal boyamalarla tespit edilmiştir ve bu lokalizasyonlara uygun şekilde akış sitometrisi boyamaları gerçekleştirilmiştir.



HSPA5 ifadesi hücrenin hem membranında hem de ER’da görülebilmektedir (27). Hücre hattı immünohistokimyasal boyamalarla elimizdeki konjüge HSPA5 antikoru (aynı antikor ile akış sitometrisi analizi yapılmıştır) ile protein ifadesinin lokalizasyonu belirlenmiştir. Antikoru hücre hattı kullanılarak akış sitometrisi analizleri kendi izotipine göre optimize edilmiştir. Literatürde HSPA5 ifadesindeki değişikliklerin kanser çalışmalarıyla ilişkilendirilmesi mevcut iken nörodejeneratif hastalıklardaki çalışma alanı kısıtlı, MS hastalığında ise nadirdir. HSPA5, Parkinson hastalığında katlanmamış protein yanıtının başlatılması için gerekli olmasına rağmen çeşitli Parkinson modellerinde ekspresyonu hakkında tutarsızlık gözlemlenmektedir (204). Bunun yanında Huntington hastalık modelinde, HSPA5’in yüksek konsantrasyonlarda agregatlara bağlandığı ve agregatları sınırladığı gösterilmiştir (205). Elde edilen sonuçlarda, RRMS EDSS (0-3) grubunun klasik monosit hariç diğer alt grup hücrelerinde sağlıklı bireylere göre HSPA5 ifadesinde anlamlı bir azalma görülmüştür. MS hastalarında HSPA5 ifadesinin sağlıklı bireylere kıyasla azalmasını literatürde HSPA5 ifadesinin inflamatuvar bozukluk olarak bilinen Behçet hastalarının PKMH’lerinde sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında benzer bir azalmanın gösterildiği yayın ile tutarlı olduğu görülmüştür (206). CD14, monosit/makrofaj için işaretleyici molekül olarak bilinmekle beraber sitokin üretimi için gerekli sinyal yolları için de önemli bir yere sahiptir (207). Monositlerle beraber çoğu doku makrofajların CD14 ifade ettiği belirlenmiştir (208). HSPA5’in CD14 proteini ile fiziksel olarak etkileşime girerek makrofajlarda antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini pozitif yönde etkilediği gözlemlenmiştir (209). Klasik monositler inflamasyon yanıtını oluşturan ilk hücrelerdendir ve klasik olmayan monositler antiinflamatuvar olarak bilinmektedir (210). MS hastalarında artan ara-form monosit sayısı antiinflamatuvar yanıtla beraber gelişen remiyelinizasyon sürecini, MS hastalarında görülen antiinflamatuvar yanıtın geride kalmasının sebebi de bu hücrelerde gözlemlenen HSPA5 ifadesinin azlığı gösterilebilir.

EPHA7 ifadesi proteinin kendisinin bir tirozin kinaz reseptörü olduğu için hücre membranında görülebilmektedir (211). Hücre hattı immünohistokimyasal boyamalarla elimizdeki konjüge EPHA7 antikoru (aynı antikor ile akış sitometrisi analizi yapılmıştır) ile protein ifadesinin lokalizasyonu belirlenmiştir. Antikoru hücre hattı kullanılarak akış sitometrisi analizleri kendi izotipine göre optimize edilmiştir. Efrin

resptörleri ve ligandları temasa bağlı hücreden hücreye iletişim yoluyla birçok hücrenel süreci çift yönlü olarak düzenleyebilmektedir (212,213). Örneğin, EPHA2 ve EPHA4, monositler ve endotelyal hücreler üzerinde ifade edilip monosit yapışmasına aracılık etmektedir (214). Bununla beraber, EPHA7 reseptörünün ifadesi MS hasplarının aktif plaklarında makrofajlarda gözlenmiştir (215). Ayrıca, insan periferik dendritik hücrelerinin EPHA7 ifade ettiği bilinmektedir (216). Benzer şekilde hem MS hastalarında hem de sağlıklı bireylerin PKMH'lerindeki monositlerde EPHA7 ifadesinin artışını gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, RRMS EDSS (0-3) grubunun üç monosit alt grup hücrelerinde sağlıklı bireylere göre EPHA7 ifadesinde anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. PKMH'lerin aracılığıyla EPHA7 ifadesi değişimi MS hastalarında biyobelirteç olarak kullanılamamıştır.

MS hastaları ve sağlıklı bireylerin PKMH'lerinden elde ettiğimiz ve biyobelirteç olabileceğini düşündüğümüz sonuçları MS çalışmalarını daha kolay yürütebileceğimiz bir *in vivo* ortamda gözlemek adına EAE modeli oluşturulmuştur. Halihazırda MS hastalarına ait kan veya BOS örnekleri dışındaki dokulara ulaşımın zorluğu fare modeli üzerinden yapılan analizleri çok daha önemli kılmaktadır. MS için oluşturulan deneysel modellerin başında EAE gelmektedir. MSS'ye özgü antijenler ile bağışıklık tepkinin artırılması üzerine kurulan bir hayvan modeli olarak bilinmektedir (28). Bu tez çalışmasında EAE indüklemek üzere kullanılan antijenlerden MOG<sub>35-55</sub> peptidi kullanılmıştır. MOG<sub>35-55</sub> peptidi ile hayvanlarda kronik MS modeli oluşturulmaktadır (217). Bunun sayesinde hastalığın pik yaptığı zamanlar kolayca tespit edilebildiğın MS mekanizmalarını anlama üzerine yapılacak analizlere yol açabilmektedir.

EAE modelinde ana araçlar olarak CD4<sup>+</sup> T lenfositleri bulunmaktadır fakat immünizasyon ile beraber verilen boğmaca toksini KBB geçişini kolaylaştırdığından hasarlı bölgeye hücre göçüne monosit/makrofajların da eşlik etmesine sebep olmaktadır (165, 167). Erken evrede mikrogliya/makrofajlar, aktif edilmiş M1 makrofajlarına farklılaşp proinflamatuvar sitokinleri serbest bırakmak ve MSS dokusuna zarar vermek hemen aktif edilmektedir (167). İlerleyen fazlarda alternatif olarak aktif edilmiş M2 makrofaj plarizasyonu gerçekleşir ve ve doku onarımı ile birlikte inflamasyon önleyici sitokinler serbest bırakılmaktadır. Bu yüzden MSS'deki M1 hücrelerinin ve M2 hücrelerinin aktivasyonu ve polarizasyonu arasındaki denge hastalığın ilerlemesi için önem teşkil etmektedir.

Oluşturduğumuz EAE modelinde farelerdeki demiyelinizasyon bölgelerinin tespiti omurilik ile sınırlı tutulmuştur. Gözlemediğimiz kesitler sayesinde demiyelinizasyon bölgelerinin daha çok servikal ve torasik bölgelerde olduğu tespit edilmiştir. Lumbar ve sakral bölgelerinde lezyon tespit edilememiştir. Literatüre göre MS hastalarından alınan omurilik MRI'larına göre birden fazla bölgede demiyelinizasyon bölgeleri tespit edilmiştir ve servikal bölge (%53-59) en sık yerleşim yeridir ve bunu torasik bölge (%20-47) takip etmektedir (218). Ayrıca, kuyruğun düşmesini takiben arka uzuvlarda hissizlik ve yürüşte koordinasyon bozukluğu tespit edilmesi motor fonksiyonlarda kayıp olduğunu ve model başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir.

Dalak, yaşlanan eritrositlerin uzaklaştırılmasında, antikorların üretilmesinde ve bağışıklığın ortaya çıkarılmasında görev yapan vücuttaki en büyük lenfatik organdır (219). Dalak, yaralanma üzerine büyük miktarda monositi harekete geçiren acil bir monosit rezervuarı olarak kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra beyaz pulpta, yüksek derecede fagositik makrofajlar bağışıklık tepkisinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (220). Dalakta bulunan monosit/ makrofajların tespiti ve bu hücrelerdeki HSPA5 ifade seviyelerinin belirmesi için akış sitometrisi analizi yapılmıştır. Makrofaj belirteci olmasının yanı sıra F4/80 memeli monositlerin de yüzey belirteci olarak kullanılabilir (221). Elde edilen bulgularda F4/80<sup>+</sup> hücrelerinde EAE farelerde kontrol farelerine kıyasla daha az HSPA5 ifadesi tespit edilmiştir. Bu şekilde, EAE farelerinde dalaktan dolaşıma katılan monosit/makrofajların HSPA5 ifadesini daha az ifade eden hücreler olduğu sonucuna varılabilmektedir. Ayrıca, dalak monositlerinden farklılaştırılarak elde edilen makrofaj kültüründe HSPA5 ifadesinde benzer sonuçlar alınmıştır. HSPA5 ifadesinin EAE dalak makrofajlarında azlığı benzer şekilde antiinflamatuvar etkinin azalmasına neden olmuş olabilir.

## 8. SONUÇ

MS bağışıklık sistemini ve sinir sistemini içeren çok kompleks bir otoimmün hastalıktır. MSS'de bağışıklık hücreleri aktivasyonu ve monositler/makrofajların MSS'ye istilasını gerçekleştiren miyelin yıkımı demiyelinizasyon sürecinin bir parçasıdır. Bu tez çalışmasında ilk olarak makrofajların oligodendrositler üzerindeki etkisini incelemek için bir *in vitro* ortak kültür platformu oluşturulmuştur. Kültür koşullarında makrofajların direkt oligodendrositleri tanıması için oligodendrosit yüzey antijenine karşı bir antikor kullanılmıştır. Antikor varlığında, M1 makrofajlarının olgun oligodendrositlerin sayısını azalttığını ve miyelini fagosite ettiğini ortaya konulmuştur. Ayrıca, M2 makrofajları *in vitro* ortak kültür koşullarında olgun oligodendrosit sayısını arttırmıştır. İlginç olarak, aktif edilmemiş makrofajlar da M2 makrofajı benzeri etki göstermiştir. Böylelikle oluşturduğumuz *in vitro* ortak kültür platformunda doğrudan hücre-hücre etkileşimlerinin araştırılması için uygun olduğu gösterilmiştir. Bu platform diğer bağışıklık sistemi hücreleri için de uygun bir ortamdır.

Çalışma grubumuzun paralelde yönettiği bir çalışma sonucunda makrofajlar ile oligodendrositler arasında bir interaktom analizi geliştirilmiştir. Analiz sonucunda bağışıklık sistemi hücreleri ve oligodendrositler arasında protein-protein etkileşiminde öne HSPA5 ve EPHA7 proteinleri çıkmıştır. Bu proteinlerinin MS hastalığı sırasında biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını test edebilmek adına MS hastası ve sağlıklı bireyler kanları akış sitometrisi analizlerine tabii tutulmuştur. HSPA5 proteininin MS hasta kanlarında sağlıklı bireylerinkine göre daha az ifade edildiği gösterilmiştir. EPHA7 ifadesinde MS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. Elde edilen bulguların *in vivo* bir modelde araştırılabilmesi için EAE model oluşturulmuştur. EAE farelerin dalaklarındaki monosit/makrofajlarda HSPA5 ifadelerinin sağlıklı farelere göre daha az olduğu tespit edilmiştir. MS hastalarında görülen periferik monosit/makrofajlarında HSPA5 ifadesinin azlığının bir sebebi olarak dalakta üretilen ve periferale salınan bu monosit/makrofajlarda HSPA5 ifade azlığı gösterilebilir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Jan;8(1):a020479.
2. Fernandez-Castaneda A, Gaultier A. Adult oligodendrocyte progenitor cells – Multifaceted regulators of the CNS in health and disease. Vol. 57, *Brain, Behavior, and Immunity.* Academic Press Inc.; 2016. p. 1–7.
3. Kerman BE, Kim HJ, Padmanabhan K, Mei A, Georges S, Joens MS, et al. In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development (Cambridge).* 2015 Jun 15;142(12):2213–25.
4. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev.* 2019 Jul 1;99(3):1381–431.
5. Love S. Demyelinating diseases. *J Clin Pathol.* 2006 May 5;59(11):1151–9.
6. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008 Mar;255(S1):3–11.
7. Pearce JMS. Historical Descriptions of Multiple Sclerosis. *Eur Neurol.* 2005;54(1):49–53.
8. Graner M, Pointon T, Manton S, Green M, Dennison K, Davis M, et al. Oligoclonal IgG antibodies in multiple sclerosis target patient-specific peptides. *PLoS One.* 2020 Feb 21;15(2):e0228883.
9. Neumann B, Segel M, Chalut KJ, Franklin RJ. Remyelination and ageing: Reversing the ravages of time. *Multiple Sclerosis Journal.* 2019 Dec 5;25(14):1835–41.
10. Hayakawa K, Pham LDD, Seo JH, Miyamoto N, Maki T, Terasaki Y, et al. CD200 restrains macrophage attack on oligodendrocyte precursors via toll-like receptor 4 downregulation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2016 Apr 30;36(4):781–93.
11. Kirby L, Jin J, Cardona JG, Smith MD, Martin KA, Wang J, et al. Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. *Nat Commun.* 2019 Dec 1;10(1).

12. Traka M, Podojil JR, Mccarthy DP, Miller SD, Popko B. Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination. *Nat Neurosci.* 2015 Dec 29;19(1):65–74.
13. Kopper TJ, Gensel JC. Myelin as an inflammatory mediator: Myelin interactions with complement, macrophages, and microglia in spinal cord injury. *J Neurosci Res.* 2018 Jun;96(6):969–77.
14. van Rossum D, Hilbert S, Straßenburg S, Hanisch UK, Brück W. Myelin-phagocytosing macrophages in isolated sciatic and optic nerves reveal a unique reactive phenotype. *Glia.* 2008 Feb;56(3):271–83.
15. Jia X, Li X, Shen Y, Miao J, Liu H, Li G, et al. MiR-16 regulates mouse peritoneal macrophage polarization and affects T-cell activation. *J Cell Mol Med.* 2016 Oct 1;20(10):1898–907.
16. dos Anjos Cassado A. F4/80 as a major macrophage marker: The case of the peritoneum and spleen. In: *Results and Problems in Cell Differentiation.* Springer Verlag; 2017. p. 161–79.
17. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology.* 2008.
18. Pineda-Torra I, Gage M, de Juan A, Pello OM. Isolation, culture, and polarization of murine bone marrow-derived and peritoneal macrophages. In: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc.; 2015. p. 101–9.
19. Dulamea AO. Role of oligodendrocyte dysfunction in demyelination, remyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 2017. p. 91–127.
20. Miron VE, Kuhlmann T, Antel Jack P. JP. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. Vol. 1812, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.* 2011. p. 184–93.
21. Ogata T. Therapeutic Strategies for Oligodendrocyte-Mediated Remyelination. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer; 2019. p. 265–79.

22. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci.* 2013 Sep;16(9):1211–8.
23. Miron VE, Franklin RJM. Macrophages and CNS remyelination. Vol. 130, *Journal of Neurochemistry.* Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 165–71.
24. Layoun A, Samba M, Santos MM. Isolation of Murine Peritoneal Macrophages to Carry Out Gene Expression Analysis Upon Toll-like Receptors Stimulation. *Journal of Visualized Experiments.* 2015 Apr 29;(98).
25. Turchyn LR, Baginski TJ, Renkiewicz RR, Lesch CA, Mobley JL. Comparative Medicine Phenotypic and Functional Analysis of Murine Resident and Induced Peritoneal Macrophages. 2007.
26. Bogie JF, Stinissen P, Hellings N, Hendriks JJ. Myelin-phagocytosing macrophages modulate autoreactive T cell proliferation. *J Neuroinflammation.* 2011 Dec 25;8(1):85.
27. Fu J, Wei C, He J, Zhang L, Zhou J, Balaji KS, et al. Evaluation and characterization of HSPA5 (GRP78) expression profiles in normal individuals and cancer patients with COVID-19. *Int J Biol Sci.* 2021;17(3):897–910.
28. van der Star BJ, Vogel DYS, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. In Vitro and In Vivo Models of Multiple Sclerosis. Vol. 11, *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets.* 2012.
29. Giralt M, Molinero A, Hidalgo J. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) with MOG35–55 in the Mouse. In 2018. p. 227–32.
30. Lublin FD, Maurer PH, Berry RG, Tippet D. Delayed, relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Immunol.* 1981 Mar;126(3):819–22.
31. Hartline DK. What is myelin? *Neuron Glia Biol.* 2008 May 8;4(2):153–63.
32. Stassart RM, Möbius W, Nave KA, Edgar JM. The Axon-Myelin Unit in Development and Degenerative Disease. *Front Neurosci.* 2018 Jul 11;12.
33. Miron VE, Kuhlmann T, Antel Jack P. JP. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. Vol. 1812, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.* 2011. p. 184–93.

34. Bhat M. Molecular organization of axo-glia junctions. *Curr Opin Neurobiol.* 2003 Oct;13(5):552–9.
35. Smith MA, Plyler ES, Dengler-Crish CM, Meier J, Crish SD. Nodes of Ranvier in Glaucoma. *Neuroscience.* 2018 Oct;390:104–18.
36. Volman V, Ng LJ. Primary paranode demyelination modulates slowly developing axonal depolarization in a model of axonal injury. *J Comput Neurosci.* 2014 Dec 3;37(3):439–57.
37. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev.* 2019 Jul 1;99(3):1381–431.
38. Schmitt S, Cantuti Castelvetti L, Simons M. Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2015 Aug;1851(8):999–1005.
39. Cercignani M, Giulietti G, Dowell NG, Gabel M, Broad R, Leigh PN, et al. Characterizing axonal myelination within the healthy population: a tract-by-tract mapping of effects of age and gender on the fiber g-ratio. *Neurobiol Aging.* 2017 Jan;49:109–18.
40. Barateiro A, Brites D, Fernandes A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Curr Pharm Des.* 2016 Jan 27;22(6):656–79.
41. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan 22;119(1):37–53.
42. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol Rev.* 2001 Apr 1;81(2):871–927.
43. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *Journal of Clinical Investigation.* 2017 Sep 1;127(9):3271–80.
44. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells.* 2019 Nov 12;8(11):1424.
45. Rogister B, Ben-Hur T, Dubois-Dalcq M. From Neural Stem Cells to Myelinating Oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 1999 Oct;14(4–5):287–300.



46. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci.* 2006 Feb 25;9(2):173–9.
47. Mercadante AA, Tadi P. *Neuroanatomy, Gray Matter.* 2022.
48. Hughes EG, Appel B. The cell biology of CNS myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 2016 Aug;39:93–100.
49. Xia W, Fancy SPJ. Mechanisms of oligodendrocyte progenitor developmental migration. *Dev Neurobiol.* 2021 Nov 24;81(8):985–96.
50. Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, et al. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science (1979).* 2016 Jan 22;351(6271):379–84.
51. Skaper SD. Oligodendrocyte precursor cells as a therapeutic target for demyelinating diseases. In 2019. p. 119–44.
52. Birey F, Aguirre A. Age-Dependent Netrin-1 Signaling Regulates NG2+ Glial Cell Spatial Homeostasis in Normal Adult Gray Matter. *Journal of Neuroscience.* 2015 Apr 29;35(17):6946–51.
53. Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia.* 2009 Dec;57(16):1691–705.
54. Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LHP, Mathisen C, Verkleij D, et al. Myelin Membrane Wrapping of CNS Axons by PI(3,4,5)P3-Dependent Polarized Growth at the Inner Tongue. *Cell.* 2014 Jan;156(1–2):277–90.
55. Gillespie MJ, Stein RB. The relationship between axon diameter, myelin thickness and conduction velocity during atrophy of mammalian peripheral nerves. *Brain Res.* 1983 Jan;259(1):41–56.
56. Lee S, Leach MK, Redmond SA, Chong SYC, Mellon SH, Tuck SJ, et al. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat Methods.* 2012 Sep 15;9(9):917–22.
57. Smyth JMB, Sheahan BJ, Atkins GJ. Multiplication of virulent and demyelinating Semliki Forest virus in the mouse central nervous system: consequences in BALB/c and SJL mice. *Journal of General Virology.* 1990 Nov 1;71(11):2575–83.

58. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Jan;8(1):a020479.
59. Seil FJ. Demyelination. In 1982. p. 235–74.
60. Love S. Demyelinating diseases. *J Clin Pathol.* 2006 May 5;59(11):1151–9.
61. Höftberger R, Lassmann H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. In 2018. p. 263–83.
62. White FA, Ishaq M, Stoner GL, Frisque RJ. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol.* 1992 Oct;66(10):5726–34.
63. Monaco MC, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J Virol.* 1996 Oct;70(10):7004–12.
64. Crawford AH, Chambers C, Franklin RJM. Remyelination: The True Regeneration of the Central Nervous System. *J Comp Pathol.* 2013 Aug;149(2–3):242–54.
65. Franklin RJM, French-Constant C. Regenerating CNS myelin — from mechanisms to experimental medicines. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Dec 16;18(12):753–69.
66. Neumann B, Segel M, Chalut KJ, Franklin RJ. Remyelination and ageing: Reversing the ravages of time. *Multiple Sclerosis Journal.* 2019 Dec 5;25(14):1835–41.
67. Tanaka T, Yoshida S. Mechanisms of remyelination: recent insight from experimental models. *Biomol Concepts.* 2014 Aug 1;5(4):289–98.
68. Wolswijk G. Chronic Stage Multiple Sclerosis Lesions Contain a Relatively Quiescent Population of Oligodendrocyte Precursor Cells. *The Journal of Neuroscience.* 1998 Jan 15;18(2):601–9.
69. Verschoor CP, Puchta A, Bowdler DME. The Macrophage. In 2012. p. 139–56.
70. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015 Mar 21;33(1):643–75.

71. McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1669–75.
72. Pei Y, Yeo Y. Drug delivery to macrophages: Challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*. 2016 Oct;240:202–11.
73. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013 Apr 24;496(7446):445–55.
74. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*. 2014 Jul;41(1):21–35.
75. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013 Oct 18;14(10):986–95.
76. Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*. 2017 Dec 29;15(1):53.
77. Watanabe S, Alexander M, Misharin A v., Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2019 May 20;129(7):2619–28.
78. Erwig LP, Henson PM. Immunological Consequences of Apoptotic Cell Phagocytosis. *Am J Pathol*. 2007 Jul;171(1):2–8.
79. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2015 Dec 25;15(12):731–44.
80. Chang DT, Jones JA, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, et al. Lymphocyte/macrophage interactions: Biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Dec 1;87A(3):676–87.
81. Watanabe S, Alexander M, Misharin A v., Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2019 May 20;129(7):2619–28.
82. Vogel DY, Jf Vereyken E, Glim JE, Dam Heijnen P, Moeton M, van der Valk P, et al. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status [Internet]. 2013. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/35>

83. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014 Jul;41(1):14–20.
84. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado JDD, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One*. 2015 Dec 1;10(12).
85. Schultze JL, Schmidt S v. Molecular features of macrophage activation. *Semin Immunol*. 2015 Dec;27(6):416–23.
86. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front Immunol*. 2015 May 26;6.
87. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
88. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019 May 24;10.
89. Arnold CE, Whyte CS, Gordon P, Barker RN, Rees AJ, Wilson HM. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function *in vitro* and *in vivo*. *Immunology*. 2014 Jan;141(1):96–110.
90. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmacili S, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6425–40.
91. da Silva MD, Bobinski F, Sato KL, Kolker SJ, Sluka KA, Santos ARS. IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. *Mol Neurobiol*. 2015 Feb 25;51(1):19–31.
92. Martinez FO. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008;13(13):453.
93. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecreur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically

- activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* 2013 Jan;281(1):51–61.
94. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *PLoS One.* 2013 Nov 15;8(11):e80908.
  95. Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, et al. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol.* 2005 Mar;77(3):321–7.
  96. Zhao P, Gao D, Wang Q, Song B, Shao Q, Sun J, et al. Response gene to complement 32 (RGC-32) expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is M-CSF-dependent and enhanced by tumor-derived IL-4. *Cell Mol Immunol.* 2015 Nov 24;12(6):692–9.
  97. Dörger M, Münzing S, Allmeling AM, Messmer K, Krombach SF. PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL DIFFERENCES BETWEEN RAT ALVEOLAR, PLEURAL, AND PERITONEAL MACROPHAGES. *Exp Lung Res.* 2001 Jan 1;27(1):65–76.
  98. Nason R, Jung JY, Chole RA. Lipopolysaccharide-Induced Osteoclastogenesis from Mononuclear Precursors: A Mechanism for Osteolysis in Chronic Otitis. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology.* 2009 Jun 15;10(2):151–60.
  99. Cassado A dos A, Dâ€™ImpÃ©rio Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front Immunol.* 2015 May 19;6.
  100. Ruiz-Alcaraz AJ, MartÃ­nez-Banaclocha H, MarÃ­n-SÃ¡nchez P, Carmona-MartÃ­nez V, Iniesta-Albadalejo MA, TristÃ¡n-Manzano M, et al. Isolation of functional mature peritoneal macrophages from healthy humans. *Immunol Cell Biol.* 2020 Feb 6;98(2):114–26.
  101. Layoun A, Samba M, Santos MM. Isolation of Murine Peritoneal Macrophages to Carry Out Gene Expression Analysis Upon Toll-like Receptors Stimulation. *Journal of Visualized Experiments.* 2015 Apr 29;(98).

102. Turchyn LR, Baginski TJ, Renkiewicz RR, Lesch CA, Mobley JL. Comparative Medicine Phenotypic and Functional Analysis of Murine Resident and Induced Peritoneal Macrophages. 2007.
103. Pello OM, Silvestre C, de Pizzol M, Andrés V. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology*. 2011 Nov;216(11):1172–6.
104. Rawji KS, Mishra MK, Yong VW. Regenerative Capacity of Macrophages for Remyelination. *Front Cell Dev Biol*. 2016 May 20;4.
105. Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, et al. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2018 May;318:1–7.
106. Koike H, Katsuno M. Macrophages and Autoantibodies in Demyelinating Diseases. *Cells*. 2021 Apr 8;10(4):844.
107. Yamaguchi T, Movila A, Kataoka S, Wisitrasameewong W, Ruiz Torruella M, Murakoshi M, et al. Proinflammatory M1 Macrophages Inhibit RANKL-Induced Osteoclastogenesis. *Infect Immun*. 2016 Oct;84(10):2802–12.
108. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In 2013. p. 163–84.
109. Jiang Z, Jiang JX, Zhang GX. Macrophages: A double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett*. 2014 Jul;160(1):17–22.
110. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Coteleur AC, Tsou CL, et al. Selective Chemokine Receptor Usage by Central Nervous System Myeloid Cells in CCR2-Red Fluorescent Protein Knock-In Mice. *PLoS One*. 2010 Oct 27;5(10):e13693.
111. Hendriks JJA, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):185–95.
112. Larsen PH, Wells JE, Stallcup WB, Opendakker G, Yong VW. Matrix Metalloproteinase-9 Facilitates Remyelination in Part by Processing the Inhibitory NG2 Proteoglycan. *The Journal of Neuroscience*. 2003 Dec 3;23(35):11127–35.

113. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- $\gamma$  production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol*. 2012 Jul;42(7):1804–14.
114. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013 Oct 22;19(10):1264–72.
115. Liu C, Li Y, Yu J, Feng L, Hou S, Liu Y, et al. Targeting the Shift from M1 to M2 Macrophages in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice Treated with Fasudil. *PLoS One*. 2013 Feb 13;8(2):e54841.
116. Torre-Fuentes L, Moreno-Jiménez L, Pytel V, Matías-Guiu JA, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurología (English Edition)*. 2020 Jan;35(1):32–9.
117. Jarjour AA, Zhang H, Bauer N, French-Constant C, Williams A. In vitro modeling of central nervous system myelination and remyelination. *Glia*. 2012 Jan;60(1):1–12.
118. Merrill JE. In Vitro and In Vivo Pharmacological Models to Assess Demyelination and Remyelination. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Jan 17;34(1):55–73.
119. Wilson HC, Onischke C, Raine CS. Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: Phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia*. 2003 Nov;44(2):153–65.
120. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J*. 19(1):1–10.
121. Loma I, Heyman R. Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2011 Sep 1;9(3):409–16.
122. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008 Mar;255(S1):3–11.
123. Gadoth N. Multiple sclerosis in children. *Brain Dev*. 2003 Jun;25(4):229–32.
124. Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, Devonshire V, Sadovnick D, the UBC MS Clinic Neurologists. Early onset multiple sclerosis: A longitudinal study. *Neurology*. 2002 Oct 8;59(7):1006–10.

125. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol*. 2019 Jan 18;26(1):27–40.
126. Ramagopalan S v, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):727–39.
127. Bjernevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (1979)*. 2022 Jan 21;375(6578):296–301.
128. Pearce JMS. Historical Descriptions of Multiple Sclerosis. *Eur Neurol*. 2005;54(1):49–53.
129. Graner M, Pointon T, Manton S, Green M, Dennison K, Davis M, et al. Oligoclonal IgG antibodies in multiple sclerosis target patient-specific peptides. *PLoS One*. 2020 Feb 21;15(2):e0228883.
130. Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013 Oct;333(1–2):1–4.
131. Slomianny MC, Dupont A, Bouanou F, Beseme O, Guihot AL, Amouyel P, et al. Profiling of membrane proteins from human macrophages: Comparison of two approaches. *Proteomics*. 2006 Apr;6(8):2365–75.
132. Ishii A, Dutta R, Wark GM, Hwang SI, Han DK, Trapp BD, et al. Human myelin proteome and comparative analysis with mouse myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Aug 25;106(34):14605–10.
133. de Monasterio-Schrader P, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, Patzig J, Werner HB. Systematic approaches to central nervous system myelin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012 Sep 23;69(17):2879–94.
134. Han MH, Lundgren DH, Jaiswal S, Chao M, Graham KL, Garris CS, et al. Janus-like opposing roles of CD47 in autoimmune brain inflammation in humans and mice. *Journal of Experimental Medicine*. 2012 Jul 2;209(7):1325–34.
135. Iwata K, Café-Mendes CC, Schmitt A, Steiner J, Manabe T, Matsuzaki H, et al. The human oligodendrocyte proteome. *Proteomics*. 2013 Dec;13(23–24):3548–53.



136. Wang J, Lee J, Liem D, Ping P. HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. *Gene*. 2017 Jun;618:14–23.
137. Shi W, Xu G, Wang C, Sperber SM, Chen Y, Zhou Q, et al. Heat Shock 70-kDa Protein 5 (Hspa5) Is Essential for Pronephros Formation by Mediating Retinoic Acid Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Jan;290(1):577–89.
138. Lu G, Luo H, Zhu X. Targeting the GRP78 Pathway for Cancer Therapy. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Jul 30;7.
139. Cerezo M, Rocchi S. New anti-cancer molecules targeting HSPA5/BIP to induce endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis. *Autophagy*. 2017 Jan 2;13(1):216–7.
140. Zhang Z, Wu HX, Lin WH, Wang ZX, Yang LP, Zeng ZL, et al. EPHA7 mutation as a predictive biomarker for immune checkpoint inhibitors in multiple cancers. *BMC Med*. 2021 Dec 2;19(1):26.
141. Figueroa JD, Benton RL, Velazquez I, Torrado AI, Ortiz CM, Hernandez CM, et al. Inhibition of EphA7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery. *J Neurosci Res*. 2006 Nov 15;84(7):1438–51.
142. Beuter S, Ardi Z, Horovitz O, Wuchter J, Keller S, Saha R, et al. Receptor tyrosine kinase EphA7 is required for interneuron connectivity at specific subcellular compartments of granule cells. *Sci Rep*. 2016 Sep 13;6(1):29710.
143. Liang LY, Patel O, Janes PW, Murphy JM, Lucet IS. Eph receptor signalling: from catalytic to non-catalytic functions. *Oncogene*. 2019 Sep 26;38(39):6567–84.
144. Chen X, Yu D, Zhou H, Zhang X, Hu Y, Zhang R, et al. The role of EphA7 in different tumors. *Clinical and Translational Oncology*. 2022 Feb 2;
145. Oricchio E, Nanjangud G, Wolfe AL, Schatz JH, Mavrakis KJ, Jiang M, et al. The Eph-Receptor A7 Is a Soluble Tumor Suppressor for Follicular Lymphoma. *Cell*. 2011 Oct;147(3):554–64.
146. Li S, Wu Z, Ma P, Xu Y, Chen Y, Wang H, et al. Ligand-dependent EphA7 signaling inhibits prostate tumor growth and progression. *Cell Death Dis*. 2017 Oct 12;8(10):e3122–e3122.

147. Darling TK, Lamb TJ. Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity. *Front Immunol.* 2019 Jul 4;10.
148. Sobel RA. Ephrin A Receptors and Ligands in Lesions and Normal-Appearing White Matter in Multiple Sclerosis. *Brain Pathology.* 2006 Apr 5;15(1):35–45.
149. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: *The Impact of Food Bioactives on Health.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 161–7.
150. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood. *Curr Protoc Immunol.* 2009 Apr;85(1).
151. Mosallaei M, Ehtesham N, Rahimirad S, Saghi M, Vatandoost N, Khosravi S. PBMCs: a new source of diagnostic and prognostic biomarkers. *Arch Physiol Biochem.* 2020 Apr 15;1–7.
152. Pachner AR. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2011 Jun;24(3):291–9.
153. Torkildsen Ø, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand.* 2008 May;117(s188):72–6.
154. Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, et al. Gene Expression in Brain during Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 1998 Nov;12(4–5):220–7.
155. Venturini G. ENZYMIC ACTIVITIES AND SODIUM, POTASSIUM AND COPPER CONCENTRATIONS IN MOUSE BRAIN AND LIVER AFTER CUPRIZONE TREATMENT IN VIVO. *J Neurochem.* 1973 Nov;21(5):1147–51.
156. Miller RH, Fyffe-Maricich S, Caprariello AC. Animal Models for the Study of Multiple Sclerosis. In: *Animal Models for the Study of Human Disease.* Elsevier; 2017. p. 967–88.
157. Omura S, Kawai E, Sato F, Martinez NE, Minagar A, Al-Kofahi M, et al. Theiler's Virus-Mediated Immunopathology in the CNS and Heart: Roles of Organ-Specific Cytokine and Lymphatic Responses. *Front Immunol.* 2018 Dec 10;9.

158. Clatch RJ, Melvold RW, Dal Canto MC, Miller SD, Lipton HL. The Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) model for multiple sclerosis shows a strong influence of the murine equivalents of HLA-A, B, and C. *J Neuroimmunol.* 1987 Jun;15(2):121–35.
159. Lipton H, Miller S, Melvold R, Fujinami RS. Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV) Infection in Mice as a Model for Multiple Sclerosis. In: *Concepts in Viral Pathogenesis II.* New York, NY: Springer New York; 1986. p. 248–54.
160. Tsunoda I, Kuang LQ, Fujinami RS. Induction of Autoreactive CD8<sup>+</sup> Cytotoxic T Cells during Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection: Implications for Autoimmunity. *J Virol.* 2002 Dec 15;76(24):12834–44.
161. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* 2007 Nov;7(11):904–12.
162. Racke MK. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Curr Protoc Neurosci.* 2001 Feb;14(1).
163. Delarasse C, Smith P, Baker D, Amor S. Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Immunology.* 2013 Dec;140(4):456–64.
164. STOSIC-GRUJICIC S, RAMIC Z, BUMBASIREVIC V, HARHAJI L, MOSTARICA-STOJKOVIC M. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin Exp Immunol.* 2004 Mar 5;136(1):49–55.
165. Barthelmes J, Taffermer N, Kurz J, de Bruin N, Parnham MJ, Geisslinger G, et al. Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice and Evaluation of the Disease-dependent Distribution of Immune Cells in Various Tissues. *Journal of Visualized Experiments.* 2016 May 8;(111).
166. Patel J, Balabanov R. Molecular Mechanisms of Oligodendrocyte Injury in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int J Mol Sci.* 2012 Aug 23;13(8):10647–59.
167. Jiang Z, Jiang JX, Zhang GX. Macrophages: A double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett.* 2014 Jul;160(1):17–22.

168. Wang J, Wang J, Wang J, Yang B, Weng Q, He Q. Targeting Microglia and Macrophages: A Potential Treatment Strategy for Multiple Sclerosis. *Front Pharmacol.* 2019 Mar 22;10.
169. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG<sub><math>\geq</math></sub>35-55</sub>) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. *Journal of Visualized Experiments.* 2014 Apr 15;(86).
170. Ichikawa M, Johns TG, Liu J, Bernard CC. Analysis of the fine B cell specificity during the chronic/relapsing course of a multiple sclerosis-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. *J Immunol.* 1996 Jul 15;157(2):919–26.
171. Pöllinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bösl MR, Dunn R, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *Journal of Experimental Medicine.* 2009 Jun 8;206(6):1303–16.
172. Papenfuss TL, Rogers CJ, Gienapp I, Yurrita M, McClain M, Damico N, et al. Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol.* 2004 May;150(1–2):59–69.
173. Torre-Fuentes L, Moreno-Jiménez L, Pytel V, Matías-Guiu JA, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurología (English Edition).* 2020 Jan;35(1):32–9.
174. Burrows DJ, McGown A, Jain SA, de Felice M, Ramesh TM, Sharrack B, et al. Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish. Vol. 25, *Multiple Sclerosis Journal.* SAGE Publications Ltd; 2019. p. 306–24.
175. Deshmukh VA, Tardif V, Lyssiotis CA, Green CC, Kerman B, Kim HJ, et al. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature.* 2013 Oct 17;502(7471):327–32.
176. Merrill JE. In Vitro and In Vivo Pharmacological Models to Assess Demyelination and Remyelination. *Neuropsychopharmacology.* 2009 Jan 17;34(1):55–73.

177. Liu SX, Gustafson HH, Jackson DL, Pun SH, Trapnell C. Trajectory analysis quantifies transcriptional plasticity during macrophage polarization. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
178. Podbielska M, Banik NL, Kurowska E, Hogan EL. Myelin recovery in multiple sclerosis: The challenge of remyelination. Vol. 3, *Brain Sciences*. MDPI AG; 2013. p. 1282–324.
179. Dhaiban S, Al-Ani M, Elemam NM, Al-Aawad MH, Al-Rawi Z, Maghazachi AA. Role of Peripheral Immune Cells in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Sci*. 2021 Feb 1;3(1):12.
180. Bogie JF, Stinissen P, Hellings N, Hendriks JJ. Myelin-phagocytosing macrophages modulate autoreactive T cell proliferation. *J Neuroinflammation*. 2011 Dec 25;8(1):85.
181. Dulamea AO. Role of oligodendrocyte dysfunction in demyelination, remyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2017. p. 91–127.
182. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2008.
183. van der Star BJ, Vogel DYS, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. In Vitro and In Vivo Models of Multiple Sclerosis. Vol. 11, *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 2012.
184. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*. 2013 Sep;16(9):1211–8.
185. Pasquini LA, Millet V, Hoyos HC, Giannoni JP, Croci DO, Marder M, et al. Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function. *Cell Death Differ*. 2011 Nov 13;18(11):1746–56.
186. Quenum Zangbede FO, Chauhan A, Sharma J, Mishra BB. Galectin-3 in M2 Macrophages Plays a Protective Role in Resolution of Neuropathology in Brain Parasitic Infection by Regulating Neutrophil Turnover. *The Journal of Neuroscience*. 2018 Jul 25;38(30):6737–50.

187. Obradović D, Kataranovski M, Dincić E, Obradović S, Colić M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-4 in cerebrospinal fluid and plasma in different clinical forms of multiple sclerosis. *Vojnosanit Pregl.* 2012 Feb;69(2):151–6.
188. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest.* 2001 Mar;81(3):263–81.
189. Cignarella F, Filipello F, Bollman B, Cantoni C, Locca A, Mikesell R, et al. TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2020 Oct 1;140(4):513–34.
190. Kronenberg J, Pars K, Brieskorn M, Prajeeth CK, Heckers S, Schwenkenbecher P, et al. Fumaric acids directly influence gene expression of neuroprotective factors in rodent microglia. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 2;20(2).
191. Larsen PH, Yong VW. The expression of matrix metalloproteinase-12 by oligodendrocytes regulates their maturation and morphological differentiation. *Journal of Neuroscience.* 2004 Sep 1;24(35):7597–603.
192. Pol SU, Polanco JJ, Seidman RA, O’Bara MA, Shayya HJ, Dietz KC, et al. Network-Based Genomic Analysis of Human Oligodendrocyte Progenitor Differentiation. *Stem Cell Reports.* 2017 Aug 8;9(2):710–23.
193. Schulz K, Kroner A, David S. Iron efflux from astrocytes plays a role in remyelination. *Journal of Neuroscience.* 2012 Apr 4;32(14):4841–7.
194. Xiao L, Hu C, Yang W, Guo D, Li C, Shen W, et al. NMDA receptor couples Rac1-GEF Tiam1 to direct oligodendrocyte precursor cell migration. *Glia.* 2013 Dec;61(12):2078–99.
195. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2014 Dec 25;14(1):58.
196. Khan S, Kaihara KA. Single-Cell RNA-Sequencing of Peripheral Blood Mononuclear Cells with ddSEQ. In 2019. p. 155–76.
197. Afman L, Milenkovic D, Roche HM. Nutritional aspects of metabolic inflammation in relation to health-insights from transcriptomic biomarkers in

- PBMC of fatty acids and polyphenols. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Aug;58(8):1708–20.
198. Ehmen HG, Lüder CGK. Long-Term Impact of *Toxoplasma gondii* Infection on Human Monocytes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Jun 28;9.
  199. Carstensen M, Christensen T, Stilund M, Møller HJ, Petersen EL, Petersen T. Activated monocytes and markers of inflammation in newly diagnosed multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2020 Aug 5;98(7):549–62.
  200. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74–80.
  201. Burel JG, Pomaznoy M, Lindestam Arlehamn CS, Weiskopf D, da Silva Antunes R, Jung Y, et al. Circulating T cell-monocyte complexes are markers of immune perturbations. *Elife*. 2019 Jun 25;8.
  202. Vogel DY, Jf Vereyken E, Glim JE, Dam Heijnen P, Moeton M, van der Valk P, et al. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status [Internet]. 2013. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/35>
  203. Chuluundorj D, Harding SA, Abernethy D, la Flamme AC. Expansion and preferential activation of the CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2014 Jul 18;92(6):509–17.
  204. Enogieru AB, Omoruyi SI, Hiss DC, Ekpo OE. GRP78/BIP/HSPA5 as a Therapeutic Target in Models of Parkinson's Disease: A Mini Review. *Adv Pharmacol Sci*. 2019 Mar 5;2019:1–11.
  205. Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU. Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Jul 5;97(14):7841–6.
  206. Kirectepe Aydin A, Özgüler Y, Uçar D, Kasap M, Akpınar G, Seyahi E, et al. Peripheral blood mononuclear cell proteome profile in Behçet's syndrome. *Rheumatol Int*. 2020 Jan 14;40(1):65–74.
  207. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993 Jan;14(3):121–5.

208. Naeim F, Nagesh Rao P, Song SX, Phan RT. Principles of Immunophenotyping. In: Atlas of Hematopathology. Elsevier; 2018. p. 29–56.
209. Qin K, Ma S, Li H, Wu M, Sun Y, Fu M, et al. GRP78 Impairs Production of Lipopolysaccharide-Induced Cytokines by Interaction with CD14. *Front Immunol.* 2017 May 23;8.
210. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2019 Apr 26;37(1):439–56.
211. Arnold CE, Whyte CS, Gordon P, Barker RN, Rees AJ, Wilson HM. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function *in vitro* and *in vivo*. *Immunology.* 2014 Jan;141(1):96–110.
212. Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, et al. Ligands for EPH-Related Receptor Tyrosine Kinases that Require Membrane Attachment or Clustering for Activity. *Science* (1979). 1994 Nov 4;266(5186):816–9.
213. Himanen JP, Nikolov DB. Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Feb;35(2):130–4.
214. Saeki N, Nishino S, Shimizu T, Ogawa K. EphA2 promotes cell adhesion and spreading of monocyte and monocyte/macrophage cell lines on integrin ligand-coated surfaces. *Cell Adh Migr.* 2015 Nov 2;9(6):469–82.
215. Sobel RA. Ephrin A Receptors and Ligands in Lesions and Normal-Appearing White Matter in Multiple Sclerosis. *Brain Pathology.* 2006 Apr 5;15(1):35–45.
216. Darling TK, Lamb TJ. Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity. *Front Immunol.* 2019 Jul 4;10.
217. Miyamura S, Matsuo N, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 (MOG 35-55)-induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Model of Chronic Multiple Sclerosis. *Bio Protoc.* 2019;9(24).
218. Marrodan M, Gaitán MI, Correale J. Spinal Cord Involvement in MS and Other Demyelinating Diseases. *Biomedicines.* 2020 May 22;8(5):130.



219. Kim E, Yang J, Beltran CD, Cho S. Role of Spleen-Derived Monocytes/Macrophages in Acute Ischemic Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014 Aug 28;34(8):1411–9.
220. A-Gonzalez N, Castrillo A. Origin and specialization of splenic macrophages. *Cell Immunol*. 2018 Aug;330:151–8.
221. Waddell LA, Lefevre L, Bush SJ, Raper A, Young R, Lisowski ZM, et al. ADGRE1 (EMR1, F4/80) Is a Rapidly-Evolving Gene Expressed in Mammalian Monocyte-Macrophages. *Front Immunol*. 2018 Oct 1;9.



## 10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.7758  
Konu : Etik Kurulu Kararı

10/06/2016

Sayın Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersen Kerman

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğumuz “Makrofajların merkezi sinir sisteminin nöral hücreleri üzerindeki etkisinin analizi” isimli başvurumuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 10.06.2016 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <http://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden DCC3507EX4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi  
Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)  
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İği	Proje Yürütücüsü
08/06/2016	47		Yrd. Doç. Dr. Bilul Ersen Karman

"Makrofağların merkezi sinir sisteminin nöral hücreleri üzerindeki etkisinin analizi" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIC	✓
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	✓
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZANSOY	✓
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELİŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.6806  
Konu : Etik Kurulu Kararı

26/02/2018

**Sayın Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Miyelin İnteraktomu: İkili Graf Tabanlı Protein-Protein Etkileşimli Ağlarla Multipl Sklerozda Hücre-Hücre Etkileşimlerinin Tanımlanması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

**Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK**  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 26.02.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 54BF50DBX1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44

İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23/02/2018	07		Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN

"Miyelin İnteraktomu: İkili Graf Tabanlı Protein-Protein Etkileşimli Ağlarla Multipl Sklerozda Hücre-Hücre Etkileşimlerinin Tanımlanması" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay**

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Dr. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHIÇE	



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı**

Sayı : 10840098-604.01.01-E.54157  
Konu : Etik Kurulu Kararı

15/08/2018

**Sayın Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN**

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Miyelin İnteraksiyon Analizi ile Multipl Skleroz için Biyobelirteç ve Tedaviye Yönelik Yolların Tanımlanması" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurula kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Ek:  
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hacı ÖZDİPK tarafından 15.08.2018 tarihinde e-İmzalanmıştır.  
Buna ilişkin <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden T.C. CC 794X6 kodu ile doğrulanabilir.