T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MULTİPL SKLEROZ PATOGENEZİNDE DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE SIKLIĞI VE SİTOKİN İÇERİĞİ

İLHAN TAHRALI

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında İlhan TAHRALI tarafından hazırlanan Multipl Skleroz Patogenezinde Doğal Öldürücü Hücre Sıklığı ve Sitokin İçeriği başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

21 / 06 / 2013

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)			İmzası
1.Prof. Dr. Günnur DENİZ	Deneysel Tıp Araş. Enst.	İmmünoloji Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Ayşe ALTINTAŞ	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	Nöroloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Güher S. ALUHAN-DİRESKENELİ	İstanbul Tıp Fakültesi	Fizyoloji Anabilim Dalı	
4.Doç. Dr. Esin AKTAŞ ÇETİN	Deneysel Tıp Araş. Enst.	İmmünoloji Anabilim Dalı	
5.Doç. Dr. Güldere Y. DEMİREL	Yeditepe Üni. Tıp Fak.	Tıbbi İmmünoloji Bilim D.	

BEYAN

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

İlhan Tahralı



İTHAF

Sevgili aileme ve yeğenlerime ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca tezimde ve çalışmalarımda her türlü destek ve yardımı sağlayan, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e,

Tez çalışmamda klinik desteği sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Altıntaş ve Uzm. Dr. Uğur Uygunoğlu'na,

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvarda çalışma becerisi kazanmamda büyük katkısı olan Dr. Umut Can Küçüksezer'e,

Cihaz kullanımı ve laboratuvar çalışmalarım sırasında karşılaştığım problemleri çözmem konusunda her türlü yardımı sağlamasından ötürü Abdullah Yılmaz'a,

Tez çalışmamın zor dönemlerindeki yol göstericilikleri ve destekleri için Doç. Dr. Esin Aktaş Çetin, Dr. Suzan Adın Çınar, Dr. Nilgün Okumuş Akdeniz ve Msc. Yusuf Metin Gelmez'e,

Çalışmalarımın her aşamasında destek ve yardımlarıyla yanımda olan değerli çalışma arkadaşım Çağdaş Uğur Adaş'a,

Sıkıntılarımı paylaşarak zor dönemlerin üstesinden gelmemde katkıları olan tüm arkadaşlarıma ve...

Meslek hayatımın en başından beri beni maddi ve manevi olarak destekleyen, heyecanımı benimle birlikte yaşayan çok değerli aileme ve en sıkıntılı dönemlerimde varlıklarıyla benim için moral ve motivasyon kaynağı olan sevgili yeğenlerime sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 18423

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Multipl Skleroz 4
2.1.1. Tanımı 4
2.1.2. Belirtileri 4
2.1.3. Sıklık - Epidemiyolojisi 5
2.1.4. Etiyolojisi 6
2.1.5. Tanı Kriterleri 8
2.1.6. Klinik Seyir 10
2.1.6.1. Ataklı-Remisyonlu (RR) MS 12
2.1.6.2. Birincil-İlerleyici (PP) MS 12
2.1.6.3. İkincil-İlerleyici (SP) MS 12
2.1.6.4. Ataklı-İlerleyici MS 12
2.2. Multipl Skleroz ve Bağışıklık Sistemi İlişkisi 12
2.3. Doğal Öldürücü Hücreler 13
2.3.1. Doğal Öldürücü Hücrelerin Multipl Skleroz İle İlişkisi 16
2.4. Sitokinler 19
2.4.1. İnterlökin-2 (IL-2) 20
2.4.2. IL-4 21
2.4.3. IL-10 21

2.4.4. IL-12 22
2.4.5. IL-22 22
2.4.6. İnterferon-gamma (IFN-γ) 22
3. GEREÇ VE YÖNTEM 23
3.1. Olgular 23
3.1.1. Tedavisiz RR-MS'li Olgular 23
3.1.2. Tedavi Gören RR-MS'li Olgular 23
3.1.3. Tedavisiz KİS'li Olgular 23
3.1.4. Sağlıklı Olgular 23
3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 24
3.2.1. Lizis Çözeltisi 24
3.2.2. PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi) 24
3.2.3. RPMI-1640 24
3.2.4. Fiksasyon ve Permeabilizasyon Kiti 24
3.3. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonlarının Belirlenmesi 25
3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) Eldesi 26
3.5. Hücre Kültürü 26
3.6. NK Sitotoksisite Ölçümü 27
3.7. Hücre Yüzey Molekülleri ve Hücre İçi Sitokin Tayini 28
3.7.1. Hücre Yüzey Boyaması 28
3.7.2. Hücre İçi Boyama 28
3.8. Analiz ve İstatistikler 29
4. BULGULAR 30
4.1. Periferik Kan NK Hücre Alt Grupları 30
4.2. Sitokin Aktive PKMH'lerde NK Hücre Yanıtı 33
4.3. NK Hücre Alt Grupları Hücre İçi Sitokin İçeriği 35
4.4. 72. Saat Kültür Sonrasında NK Hücre Alt Grupları 41
4.5. NK Hücre Sitotoksik Aktivitesi 43
5. TARTIŞMA 44
KAYNAKLAR 50
FORMLAR 59
ETİK KURUL KARARI 61
ÖZGEÇMİŞ 62

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: McDonald Tanı Kriterleri (2010)..... 10
Tablo 3-1: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar 25
Tablo 3-2: Hücre kültüründe kullanılan uyaranlar ve kimyasallar 27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Multipl Skleroz haritası 5
Şekil 2-2: Multipl Skleroz'da klinik seyir 11
Şekil 2-3: NK hücrelerinin olgunlaşma profili (pNK, öncül NK hücreleri; iNK, olgunlaşmamış NK hücreleri; mNK, olgun NK hücreleri) 15
Şekil 2-4: NK hücrelerinin MS patogenezi için önerilen etki mekanizmaları [76] 17
Şekil 4-1: $CD3^-$ hücre grubunda NK hücre alt grup kapılama stratejisi 30
Şekil 4-2: Sağlıklı ve hasta gruplarında periferik kan $CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre oranları 31
Şekil 4-3: Sağlıklı ve hasta gruplarında CD4 ve CD8 hücre yüzey ekspresyonları 32
Şekil 4-4: 24.saat $CD3^-CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD3^-CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre oranları .. 33
Şekil 4-5: Hasta grupları ve sağlıklı kişilerde farklı sitokinlere 24. saat yanıtları 34
Şekil 4-6: Sitokin uyarısı olmayan kültür koşullarında $CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre içi sitokin seviyeleri 35
Şekil 4-7: IL-2 uyarımına yanıt olarak $CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre içi sitokin seviyeleri 36
Şekil 4-8: IL-4 uyarımına yanıtta $CD16^+CD56^{soluk}$ NK hücre IL-10 ve IL-22 üretimi .. 37
Şekil 4-9: IL-12 uyarımına yanıt olarak IFN-γ, IL-10 ve IL-22 düzeyleri 38
Şekil 4-10: CD16-CD56parlak NK hücre gruplarında 24. saat IFN-γ oranları……...41
Şekil 4-11: 72. saat $CD3^-CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD3^-CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre oranları41
Şekil 4-12: 72 saat kültür sonrası sağlıklı ve hasta gruplarında farklı sitokin uyarılarına yanıt olarak $CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre alt grup oranları 42
Şekil 4-13: 72 saat uyarımlı ve uyarımsız kültür sonrasında tedavisiz RR-MS ve KİS hasta $CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre oranları 43
Şekil 4-14: Hasta ve sağlıklı kontrollerde NK hücre sitotoksik aktivitesi 43
Şekil 5-1: CD56 ekspresyonuna göre NK hücre alt grupları. 44
Şekil 5-2: $CD56^{soluk}$ ve $CD56^{parlak}$ NK hücreleri farklı fenotipik özellikler ve immün fonksiyonlara sahiptirler [73] 45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

APC	Allofikosiyanin
ASH	Antijen sunucu hücre
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
CD	Farklılaşma kümesi (Cluster of differetiation)
CFSE	Karboksi floresein süksinimidil diester
Cr51	Krom-51
CSIF	İnsan sitokin sentez inhibitör faktörü
DH	Dendritik hücre
DMD	Hastalık modifiye edici ilaç
EAE	Deneysel otoimmün ensefalomiyelit
EBV	Epstein Barr Virüsü
EEG	Elektroensefalografi
EMG	Elektromiyografi
FcγIIIA	Düşük afiniteli immünoglobulin gamma Fc reseptörü
FITC	Fluoresein izosiyanat
GM-CSF	Granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör
HLA	İnsan lökosit antijeni
IFN-γ	İnterferon-gama
Ig	İmmünoglobülin
iNK	Olgunlaşmamış NK hücresi
K562	Eritromiyeloid lösemi hücre serisi
KİS	Klinik izole sendrom
LFA-1	Lökosit fonksiyon ilişkili antijen -1

LTi-like	Lenfoid doku uyarıcı benzeri hücre
MBP	Miyelin bazik protein
MHC	Ana doku uyumluluk kompleksi
MICA/B	MHC sınıf 1 zincir-ilişkili molekül A ve B
mNK	Olgun NK hücresi
MOG	Miyelin oligodendrosit glikoproteini
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MS	Multipl Skleroz
MSS	Merkezi sinir sistemi
NK	Natural Killer (Doğal Öldürücü Hücre)
NT-3	Nörotrofin-3
PBS	Fosfat tampon tuz çözeltisi
PE	Fikoeritrin
PKMH	Periferik Kan Mononüklear Hücre
PLP	Proteolipid protein
pNK	Prekürsör NK hücresi
PP-MS	Primer progresif (birincil ilerleyici) MS
RPMI	Roswell Park Memorial Institute kültür ortamı
RR-MS	Relapsing-remitting (ataklı-remisyonlu) MS
SP-MS	Sekonder progresif (ikincil ilerleyici) MS
THR	T hücre reseptörü
Treg	Düzenleyici T hücresi
ULBP	UL16 bağlayıcı protein
VEP	Görsel uyarılmış potansiyel
VLA-4	Geç aktive olan antijen - 4

ÖZET

Tahralı İ. Multipl Skleroz patogenezinde Doğal Öldürücü Hücre sıklığı ve sitokin içeriği. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2013.

Multipl skleroz (MS) merkezi sinir sisteminin; enflamasyon, demiyelinizasyon, aksonal/nöronal kayıp ve gliozis ile karakterize bir hastalığıdır. Doğal öldürücü (NK) hücrelerin, MS'in bir alt tipi olan ataklı-remisyonlu (RR)-MS seyrinde veya hastalığın kronik gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir. MS patogenezinde NK hücrelerinin rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmakta, deneysel hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda ise NK hücrelerinin rolü ile ilgili çelişkili sonuçlar görülmektedir. Çalışmamızda, MS hastalığında CD16+CD56soluk ve CD16-CD56parlak NK hücre alt grupları ve fonksiyonları araştırılmıştır. Bu amaçla immün modülatuvar tedavi almamış RR-MS olguları, en az 6 aydır DMD (hastalık modifiye edici ilaç) tedavisi almakta olan RR-MS hastaları, klinik izole sendromlu hastalar ile yaş ve cinsiyet uyumu gözetilerek seçilen sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örnekleri flow sitometrik yöntemle incelenmiştir. Sağlıklı ve hasta periferik kan örneklerinde hücre yüzey molekül ekspresyonları (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56) saptanmış ve kan örneklerinden saflaştırılan periferik kan mononükleer hücreler ayrı ayrı IL-2, IL-4, IL-12 sitokinleriyle uyarılarak ve uyarılmadan 24 ve 72 saat süreyle 37^0C %5 CO2'li etüvde kültüre edilmiştir. Kültür sonrası NK hücre alt gruplarının frekansları ve hücre içi IFN-g, IL-10 ve IL-22 seviyeleri ile, K-562 eritromyeloid lösemi hücre serisi kullanılarak NK hücre sitotoksik aktivitesi flow sitometri ile tayin edilmiştir. Sonuçta hasta gruplarında CD16+CD56soluk ve CD16-CD56parlak NK hücre alt gruplarında sayısal bir farklılık görülmemesine karşılık, farklı sitokin uyarıları sonucu IFN-g seviyelerinde düşüş, IL-10 ve IL-22 seviyelerinde ise artış saptanmıştır. Sağlıklılarla karşılaştırıldığında, NK hücre sitotoksik aktivitesinin tüm hasta gruplarında anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Bulgularımız, MS patogenezinde NK hücre fonksiyonlarının rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Doğal Öldürücü Hücreler, Multipl Skleroz, Sitokinler, Otoimmünite

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 18423

ABSTRACT

Tahrali I. The frequency and cytokine content of Natural Killer cells in the pathogenesis of Multiple Sclerosis. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. Graduate Thesis. Istanbul. 2013.

Multiple sclerosis is a disease characterized by inflammation, demyelination, axonal/neuronal loss and gliosis of the central nervous system. Natural killer (NK) cells is thought to be in part responsible for the relapsing-remitting (RR) or chronic progressive nature of the disease. Surveys about the role of NK cells are limited and in experimental autoimmune encephalomyelitis models, the findings about the role of NK cells in MS are inconsistent. In our project, we investigated CD16+CD56dim and CD16-CD56bright NK cells and their functions in pheripheral blood samples of immune-modulatory treatment-naive RR-MS patients, RR-MS patients treated with DMDs (disease modified drug) for at least six months and patients with clinically isolated sydrome compared with age and gender matched healthy controls. Therefore, surface expressions of CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56 were detected in peripheral blood samples and peripheral blood mononuclear cells isolated from blood samples were cultured with hrIL2, hrIL-12, hrIL-4 or without cytokine addition for 24 and 72 h. After the cell culture, the frequency and intracellular IFN-g, IL-10 and IL-22 levels of NK cell subsets were determined by flow cytometry. Cytolytic NK cell activity were quantified using erythromyeloblastoid leukemia cell line K562. As a result, there is no significant difference in the frequencies of CD16+CD56dim and CD16-CD56bright NK cell subsets of patient groups, while decreased IFN-g and increased IL-10 and IL-22 production in different conditions were detected. Cytotoxic activity of NK cells were decreased significantly in patient groups. These findings may indicate that NK cell functions may play roles in the pathogenesis of MS.

Key Words: Natural Killer Cells, Multiple Sclerosis, Cytokines, Autoimmunity

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 18423

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl skleroz (MS) merkezi sinir sisteminin; enflamasyon, demiyelinizasyon, aksonal/nöronal kayıp ve gliozis ile karakterize immün kökenli bir hastalığıdır [1-2]. Bugünkü veriler ışığında; hastalığın temelinde immün sistemin, miyelin sentezi ve devamlılığından sorumlu olan oligodendrositlere karşı saldırısı ve aksonal kayıp yatmaktadır. MS'in görülme sıklığı coğrafik ve etnik özelliklere bağlı olarak 5-200/100.000'dir. Türkiye'de net olarak bilinmemekle birlikte yaklaşık 35.000 MS hastası olduğu tahmin edilmektedir. Hastalık kadınlarda ve sosyo-kültürel olarak yüksek kesimlerde ve çoğunlukla 20 - 40 yaşları arasında ortaya çıkmakla birlikte, hastalığın oluş nedeni halen netlik kazanmamıştır. Merkezi sinir sisteminin bir hastalığı olduğu için vücut fonksiyonlarının yerine getirilememesine bağlı olarak hastaların fiziksel kısıtlanmaları, sosyal olarak toplumdan soyutlanmalarını ve dolayısıyla psikolojik açıdan çeşitli sorunları da beraberinde getirebilmektedir. Bu nedenle MS'in oluşum nedenleri ve olası tedavi yöntemleri üzerine geniş çaplı araştırmalar yapılmaktadır.

MS'in ataklı-remisyonlu (relapsing-remitting - RR) MS, birincil ilerleyici (primer progresif - PP) MS ve ikincil ilerleyici (sekonder progresif - SP) MS olmak üzere üç temel formu en sık karşılaşılan klinik seyir tipleridir. Başlangıç döneminde MS hastalarının yaklaşık %87'si, değişken aralıklarla meydana gelen kısmi veya tam düzelmenin takip ettiği, akut ataklarla karakterize olan RR-MS hastalık seyri göstermektedir. MS'li genç erişkinlerin %85'inde hastalık optik sinirleri, beyin sapını veya omuriliği ilgilendiren klinik izole sendrom (KİS) şeklinde ortaya çıkmaktadır ve KİS'li hastaların %30-70'inde MS gelişmektedir [3].

Son yıllarda, hastalık patogenezinin daha önceki çalışmalarda öngörüldüğünden çok daha komplike olduğu anlaşılmıştır. Etiyolojisi halen bilinmemesine rağmen, hastalığın patogenezinde immün sistemin önemli rol oynadığına dair pek çok bulgu vardır. Otoreaktif (öze-duyarlı) T hücrelerinin, hastalığın oluşumunda birincil rol oynadığı öne sürülmekle birlikte, doğal öldürücü (natural killer - NK) hücrelerin de RR-MS seyrinde veya hastalığın kronik gelişiminde görev aldığı düşünülmektedir.

Doğal immünitenin elemanı olan NK hücreleri, kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. Patojenler ve tümörlere karşı spontan litik aktivite gösteren NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin %5-15'ini oluşturur ve karaciğer, peritoneal

kavite, plasenta gibi periferik dokularda bulunur [4]. *İn vitro* şartlarda belirli tümör hücrelerini öldürme yeteneğine sahip NK hücrelerinin *in vivo* deplesyonu (yokluğu) bazı fare modellerinde tümör oluşumunda artışa neden olmaktadır.

Kemik iliğinden kökenlenen ve gelişim için timusa gereksinim göstermeyen NK hücreleri, T hücre reseptörü (THR), immünoglobülin (Ig) veya CD3 molekülünü eksprese etmemelerine karşılık, hücre yüzeylerinde "nöral hücre yapışma molekülü-1" (CD56) ekspresyonu ile karakterizedirler. CD56 ekspresyonunun özgül (spesifik) fonksiyonu tanımlanmamış olmakla birlikte, NK hücreleri CD56 ekspresyon yoğunluğuna bağlı olarak "$CD56^{parlak}$" ve "$CD56^{soluk}$" olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Yüksek oranda Fcγ reseptör, CD16 ve perforin eksprese eden $CD56^{soluk}$ NK hücre populasyonu, periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık %95'ni oluşturmakta ve "olgun" NK hücreleri olarak bilinmektedirler. Efektif olarak litik etkili bu hücre grubunun aksine, düşük seviyede perforin ve CD16 eksprese eden $CD56^{parlak}$ NK hücreleri "olgunlaşmamış" NK hücreleri olarak adlandırılmakta olup, yüksek seviyede sitokin sekresyonundan dolayı enflamasyondan sorumlu veya regülatör (düzenleyici) etkili hücreler olduğu ileri sürülmektedir [5-7].

Th1 (yardımcı T hücresi-1) ve Th2 hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre altgruplarının da NK1 ve NK2 olarak iki gruba ayrıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir [5, 8].

MS patogenezinde T hücrelerinin rolünü gösteren çok sayıda çalışmanın bulunmasına karşılık NK hücrelerinin rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. MS'in deneysel hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelitte (EAE) NK hücrelerinin olumlu etkilerinin yanında, olumsuz etkileri olduğunu veya etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [1]. Bu doğrultuda MS hastalarında NK hücre çalışmaları incelendiğinde, insan NK hücre deplesyonu sonucunda, hafıza T hücrelerinin öz-antijenlere karşı yanıtının arttığı ileri sürülmüştür [9]. RR-MS hasta populasyonu ile sağlıklı kontrollerin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise, $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre alt gruplarının oranları karşılaştırılmış ve hasta grubundaki $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre sıklığının sağlıklı kontrollerle benzer

oranda bulunduğu, fakat fonksiyonlarında yetersizlik olduğu, salgıladıkları IFN-γ miktarının sağlıklı kontrollere kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir [10].

Çalışmamızda, immün modülatör tedavi almamış olan RR-MS'li olgular, en az altı aydır DMD tedavisi almakta olan RR-MS hastaları ve KİS'li hastalar ile yaş ve cinsiyet uyumu gözetilerek seçilen sağlıklı kontrollerin periferik kan örneklerinde NK hücre alt gruplarının fonksiyonları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multipl Skleroz

2.1.1. Tanımı

Multipl skleroz (MS), genetik yatkınlığı olan bireylerde öz-antijenlere karşı yanıttan kaynaklanan, ilerleyici demiyelinizasyon ve nörodejenerasyonla seyreden, multifokal (çok odaklı) bir hastalıktır [11]. Merkezi sinir sistemindeki enflamasyon ile aksonların etrafını saran miyelin kılıfın hasarı sonucu, zamanla akson harabiyeti meydana gelmektedir.

Genç erişkinlerde önemli derecede nörolojik yeti kaybına sebep olan, merkezi sinir sisteminin (MSS) en yaygın immün kökenli hastalığı olan MS, travmaya bağlı olmaksızın nörolojik yeti yitimine yol açan hastalıklar arasında ilk sırayı almaktadır [12-13].

Hastalığın MSS antijenlerini tanıyan ve çok sayıda immün sistem hücresiyle işbirliği halinde olan, otoreaktif T hücreleri tarafından başlatıldığı ve demiyelinizasyon ve nöroaksonal hasarla sonuçlanan enflamatuvar bir reaksiyon oluşturduğu düşünülmektedir [7, 14].

2.1.2. Belirtileri

Klinik belirtiler nörolojik lezyonların konumuna göre değişmekte ve sıklıkla, enflamatuvar hücrelerin kan beyin bariyerine saldırısı sonucu gelişen demiyelinizasyon ve ödemle birlikte seyretmektedir [11].

Hastalar arasında farklılık göstermekle birlikte MS'in yaygın belirtileri; tek gözde ani gelişen, bazen ağrılı olabilen görme kaybı, bulanık görme gibi optik sinir disfonksiyonu, baş dönmesi-dengesizlik, vücudun herhangi bir bölgesinde uyuşma; yürürken bir ayakta sürtme, yüzde ağrı, duyu kaybı, karıncalanma hissi gibi duysal bozukluk, hipertoni ve aşırı refleks gibi sinir iletimi bozukluğu, el ve ayaklarda kas kontrolü kaybı sonucu gelişen denge bozukluklarını içerir [11, 15]. Bu belirtilerin yanında sıklıkla yorgunluk, bilişsel kayıp ve depresyon da MS belirtileriyle ilişkili diğer semptomlar arasındadır [16].

Bu belirtilerin haricinde nadir olarak görülen diğer bazı belirtiler; çok ani gelişen tek taraflı kol-bacak felci, epileptik nöbetler, koma gibi uyanıklık bozuklukları, afazi adı

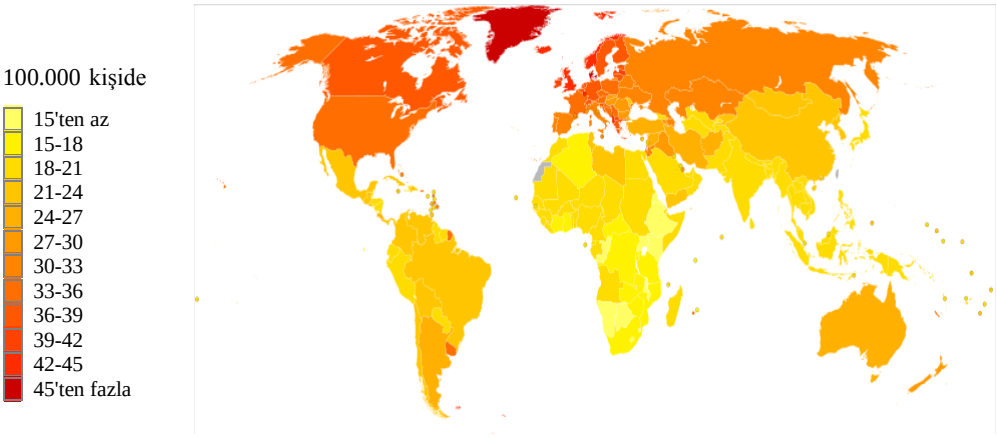
verilen bir tür konuşma bozukluğudur. Ancak böyle bulguların görüldüğü hastalarda öncelikle diğer tanı olasılıklarının araştırılması, yanlış tanı konmasını önlemek için önemlidir [15].

2.1.3. Sıklık - Epidemiyolojisi

Batı ülkelerinde genel popülasyonun %0.1'inde görülen [17], günümüzde 1.000.000'dan fazla insanı etkilediği düşünülen MS'in görülme sıklığı, coğrafik ve etnik özelliklere bağlı olarak 5 - 200/100.000'dir. Türkiye'de net olarak bilinmemekle birlikte yaklaşık 40/100.000 civarında MS hastası olduğu tahmin edilmektedir [13, 18]. Hastalık kadınlarda erkeklere oranla 2 kat daha fazla ve sosyo-kültürel seviyesi yüksek olan kesimlerde daha sık görülmektedir.

MS genellikle 20 - 40 yaş arasındaki yetişkinlerde ortaya çıkmakla birlikte çocuklarda veya 50 yaş üzerinde de görülebilmektedir [19]. CDC (Centers for disease control and prevention) verilerine göre, ABD'de MS'in kadınlarda erkeklere göre üç kat daha fazla görüldüğü öne sürülmektedir [20]. Çocuklarda cinsiyet oranı farkı daha yüksekken, elli yaşın üstündeki insanlarda erkek ve kadınlar hemen hemen eşit derecede hastalıktan etkilenmektedirler [19, 21].

MS, ekvator bölgesinde yaşayan insanlarda daha seyrek görülmekte ve ekvatordan uzaklaşıldıkça hastalığın görülme sıklığı artmaktadır [19, 22]. Enlem farkını açıklayabilmek için muhtemel risk faktörleri olarak iklim, güneş ışığı ve D vitamini alımı araştırılmıştır. Kuzey Avrupa popülasyonlarında daha yaygın görülen MS'in [19] Sami, Türkmen, Kızılderili, Afrika ve Yeni Zelanda yerlilerini içeren bazı etnik gruplarda gelişim riski daha düşüktür [23].



Şekil 2-1: Multipl Skleroz haritası

Irk ve etnik köken farklılıkları hastalığın sıklığını ve klinik bulgularını etkilemektedir. Afrika'da yaşayan siyahlarda hastalık çok ender görülürken, ABD'de yaşayan siyahlarda insidans beyazların yarısıdır. Aynı şekilde doğu Asyalılar'da hastalık ender olup, Japonlar'da ise optik sinirleri ve spinal kordu tutar (optiko-spinal form) [24-26].

2.1.4. Etiyolojisi

Hastalığın etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, MS patogenezinde hem otoimmün, hem de enfeksiyöz mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, genetik ve çevresel faktörlerin de hastalığın ortaya çıkmasında etkili olduğunu ortaya koymaktadır [27].

Hastalığın oluşumunda rol oynadığı düşünülen etmenler şu başlıklar altında toplanabilir:

a. Genetik

MS kalıtsal bir hastalık olarak düşünülmemekle birlikte, birtakım genetik varyasyonların hastalık gelişim riskini arttırdığı gösterilmiştir [28]. İkizler ve kardeşler üzerinde yürütülen çalışmalar MS'e yatkınlıkta genetik faktörlerin etkili olduğunu düşündürmektedir [27]. MS riski, akrabalar arasında özellikle ikizlerde, ebeveynlerde ve hastanın çocuklarında genel popülasyona göre daha yüksektir [29]. Monozigot ikizlerde normal populasyona göre hastalık riski 150-300 kat fazla bulunmuştur [30].

Elde edilen veriler, her biri orta derecede etkili olan birden fazla genin hastalık oluşumunda rol oynadığına işaret etmektedir. Aday genleri tanımlamaya yönelik çalışmalar; insan lökosit antijeni (HLA) lokusu ile IL-2RA (interlökin reseptör A) ve IL-7RA alellerinin, MS için kalıtsal risk faktörü olabileceğini doğrulamaktadır [27, 30-33].

Çalışmalar sonucunda elde edilen en tutarlı bulgu, MS ve DR15 ve DQ6 olarak tanımlanan MHC allelleri arasındaki ilişkidir. HLA-C554 ve HLA-DRB1 gibi diğer lokuslar da hastalığa karşı koruyucu etki göstermektedir [19].

Hastalığın genetik geçişinde belli bir kalıtım paterni gösterilemediğinden, MS'i "hastalığa yatkın kişilerde çevresel tetikleyici faktörlerle karşılaşıldığında ortaya çıkan, genetik açıdan kompleks bir hastalık" olarak tanımlamak uygundur [27].

b. Çevresel Etmenler

MS; Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Güney Avustralya gibi bölgelerde daha sık olmasına karşın, Asya ve tropik bölgelerde daha nadirdir [34]; insidans ve prevalans ise ekvatordan uzaklaştıkça artmaktadır [35-36].

Çocukluk çağındaki çevresel etmenler, ileri yaşlarda MS gelişiminde önemli rol oynayabilmektedir. Göçmenler üzerinde yapılan çalışmalar, 15 yaşından önce farklı bir bölgeye göç etmiş bir bireyin, MS'e karşı yeni yerleşilen bölgedeki yatkınlığı kazandığı, göç 15 yaşından sonra olursa, göçmenin kendi ülkesindeki duyarlılığı koruduğunu göstermektedir [37].

Güneş ışığı ile MS prevalansı arasındaki bağlantı farklı ekolojik çalışmalarda gösterilmiştir [27, 38-39]. Doğum mevsimi ve MS arasında yapılan bir çalışmada güneş ışığı ve vitamin D arasında ilişki saptanmıştır. Örneğin, MS hastaları arasında Mayıs ayında doğanların sayısı, Kasım ayında doğanlara göre daha fazladır [40].

Sigaranın MS hastalığı için risk artışına neden olduğuna ve MS'in ilerlemesini olumsuz etkilediğine dair kanıtlar vardır. Yüksek oranda sigara içenlerde bu risk artışı %70 civarında rapor edilmektedir [34].

Kanıtları zayıf olmakla beraber ağır stresin de bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir [37]. Fizyolojik stresin MS'i de içeren pek çok otoimmün hastalığın başlangıcında ve alevlenmesinde rol oynadığına dair bulgular mevcuttur [41-42]. Yakın geçmişte, stresli yaşam olaylarının MS'te nükse ve yeni lezyonların gelişimine neden olduğu gösterilmiştir [43]. Vakaların %70-80'inde fizyolojik stresin, MS semptomlarının başlangıç ve tekrarında tetikleyici olduğu ileri sürülmektedir [44].

c. Enfeksiyonlar

MS'in muhtemel enfeksiyöz başlatıcısı olarak pekçok mikroorganizma öne sürülmekle birlikte, MS patogenezinde rol oynadığı kanıtlanan mikroorganizma bulunmamaktadır [29]. Epstein-Barr virüs (EBV) enfeksiyonunun hastalık gelişiminde rolü olduğu ileri sürülmekle birlikte, hangi mekanizmalarla MS riskini arttırdığı tam olarak bilinmemektedir [45].

Yakın dönemde bildirilen bir çalışmada çoğu MS hastasının beyninde disregüle EBV enfeksiyonu olduğuna dair güçlü kanıtlar bildirilmiştir [27, 46]. EBV ile hiç

enfekte olmamış bireylerin hastalık riski daha düşüktür ve erişkin yaşta enfekte olanların riski, daha erken yaşta enfekte olanlara göre daha yüksektir [19, 47].

Erken yaşta farklı bir bölgeye göç etmenin MS riskini değiştirdiği, nadir görülen bir patojenden ziyade yaygın bir mikroorganizmanın yol açtığı bazı enfeksiyonların, hastalığın kökeni olabileceği öne sürülmektedir. MS patogenezi için hijyen hipotezi ve prevelans hipotezini de içeren pekçok mekanizma öne sürülmüştür. Hijyen hipotezi, erken yaşlarda çeşitli enfeksiyöz ajanlara maruz kalmanın, MS'e karşı koruyucu olduğunu ve hastalığın bu ajanlarla geç karşılaşma sonucu oluşan bir yanıt olduğunu öne sürmektedir. Prevelans hipotezi ise hastalığın yüksek MS prevalansı olan bölgelerde daha yaygın olan ve o bölgedeki bireylerde asemptomatik enfeksiyona yol açan bir patojenden dolayı meydana geldiğini öne sürmektedir. Hijyen hipotezi prevelans hipotezinden daha çok destek görmektedir [47-48].

Kızamık, kızamıkçık ve kabakulak ise MS'le ilişkilendirilen diğer hastalıklardır [19].

d. Bağışıklık Sistemi

MS'in bireyin genetik yatkınlığı ve henüz belirlenemeyen çevresel etmenlerin kompleks etkileşimi sonucu gelişen immün aracılı bir hastalık olduğu düşünülmektedir [29]. Hasarın kişinin sinir sistemine saldıran kendi immün sistemi tarafından oluşturulduğuna inanılmaktadır. İmmün yanıtın muhtemel hedefleri miyelin bazik protein (MBP) ve proteolipid protein (PLP)'dir. MS tedavisinde yaygın olarak kullanılan Copaxone, MBP'yi taklit ederek otoreaktif immün hücreler için yanıltıcı bir hedef olmasına yönelik olarak dizayn edilmiştir. Buna rağmen, MBP immün hücrelerin tanımasına imkan vermeyecek şekilde miyelin kılıf içine gömülü olduğundan, MS'te MBP'nin rolü tartışmalıdır [49].

Daha önceki çalışmalardan elde edilen bulgular, otoantijen bir protein ya da lipid olsun veya olmasın, yabancı bir antijeni tanıyan immün hücrelerin öz antijenlerle çapraz reaksiyona girerek otoimmüniteyi tetiklediğini göstermektedir [50]. Bu süreç "*moleküler taklit*" olarak bilinmektedir [29, 51].

2.1.5. Tanı Kriterleri

MS'in belirti ve semptomları farklı hastalıklarla benzerlik gösterdiğinden, tanısında güçlükler doğabilmektedir. Medikal konseyler özellikle başlangıç

aşamalarında hastalığın tanısını kolaylaştırmak ve standardize etmek için tanı kriterleri oluşturmuşlardır. Geçmişte MS tanısında kullanılan Schumacher ve Poser Kriterleri'nin yerini, günümüzde McDonald tanı kriterleri almıştır (Tablo 2-1) [52]. McDonald tanı kriterleri, MS lezyonlarının zamanla yaygınlaşmasına karşılık ilerleyici olmayan MS tanısında, semptomların kaybolması ve tekrar ortaya çıkmasının klinik, laboratuvar ve radyolojik verilerle kanıtlanması esasına dayanmaktadır [53-54].

Tek bir ataktan sonra medikal incelemenin yapılması, hastalığın tanısını hızlandırmakta ve kolaylaştırmaktadır. Hastalığın tanısında manyetik rezonans görüntüleme (MRG), beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve bazı nörofizyolojik testler [uyarılmış potansiyeller, beyin sapı refleksleri (EEG, EMG)] yaygın olarak kullanılmaktadır. Beyin ve omuriliğin MRG'si demiyelinizasyon bölgelerini (lezyon : plaklar) göstermekte, aktif plakları göstermek için kontrast madde olarak intravenöz Gadolinyum uygulanabilmektedir [53, 55].

Lomber ponksiyondan elde edilen BOS'un test edilmesi MSS'deki kronik enflamasyona kanıt sağlayabilmektedir. BOS elektroforezde, MS hastalarının %75-85'inde görülen ve enflamasyon belirteci olan, IgG oligoklonal bantları için test edilmektedir [52-53]. MS hastası olan bir kişinin sinir sistemi optik sinir ve duysal sinirlerinin uyarımına, bu yolakların demiyelinizasyonundan dolayı daha düşük aktiviteyle yanıt vermekte, bu beyin yanıtları görsel ve duysal uyarılmış potansiyeller kullanılarak ölçülebilmektedir [56].

MS'in klinik tanısında iki ya da daha fazla farklı yerleşimli lezyon bulunması önemlidir. Elektrofizyolojik teknikler klinik muayenede bulgu vermeyen lezyonları saptamada yardımcı olmakta iken, standart MRG, işlev bozukluğunu göstermemektedir (fonksiyonel MRG hariç). Çünkü demyelinizan plak patolojik sürecin görüntülenebilir, makroskopik bir sonucudur. Demyelinizan plaklar oluşmadan önce de elektrofizyolojik değişiklikler ortaya çıkabileceğinden, elektrofizyolojik çalışmalar beyin sapı disfonksiyonunu MRG'den daha iyi gösterebilmektedir [26].

Tablo 2-1: McDonald Tanı Kriterleri (2010)

Klinik görünüm	MS tanısı için gerekli ek veriler
2 veya daha fazla atak; 2 veya daha fazla lezyonun objektif klinik kanıtı	Klinik kanıt yeterli
2 veya daha fazla atak; 1 lezyonun objektif klinik kanıtı	MRG'de görülen yayılım **veya** MRG'yle saptanan 2'ye kadar tipik MS lezyonu + (+) BOS bulgusu* **veya** yayılımı düşündüren bir sonraki atağı beklemek (örneğin vücudunu başka bir kısmını etkileyen)
1 atak; 2 veya daha fazla lezyonun objektif klinik kanıtı	MRG'yle ispatlanan zamanda yayılım **veya** ikinci klinik atak (nüks)
1 atak; 1 lezyonun objektif klinik kanıtı (klinik izole sendrom olarak bilinen)	MRG'yle gösterilen MSS'nin farklı yerlerinde yayılım **veya** 2'ye kadar MRG'yle tespit edilen tipik MS lezyonu + (+) BOS bulgusu* ve MRG'yle gösterilen zamanda dağılım **veya** MRG'yle ispatlanan zamanda dağılım (örneğin orjinal taramadan en az 3 ay sonra görülen yeni lezyon) **veya** İkinci klinik atak (nüks)
Başlangıcı fark edilemeyen ve MS'i düşündüren gizli nörolojik ilerleme (PP-MS için tipik)	Pozitif BOS* ve MSS'nin farklı yerlerinde MRG'yle gösterilen yayılım **veya** Anormal VEP bulgusu ile birlikte MRG bulgusu ve MRG'yle gösterilen zamanda dağılım **veya** 1 yıl sürekli ilerleme (geçmişe yönelik olarak belirlenen veya sürmekte olan gözleme göre)

2.1.6. Klinik Seyir

Multipl sklerozlu genç erişkinlerin %85'inde hastalık başlangıcı, optik sinirleri, beyin sapını veya omuriliği ilgilendiren "KİS" şeklinde ortaya çıkmaktadır ve KİS'li hastaların %30-70'inde MS gelişmektedir [3]. KİS'in, MS'in ilk atağı olabileceği yönündeki görüşlere karşılık, KİS'te birey, demiyelinizasyonu akla getiren bir atak geçirir ancak MS kriterlerinin tamamını karşılamaz [19, 57].

MS'in farklı alt tipleri veya ilerleme şekilleri tanımlanmıştır. Bu alt tiplerin belirlenmesi, hastalığın gelecekteki seyrini ve tedavide uygulanacak kararları belirlemek için kullanılmaktadır.

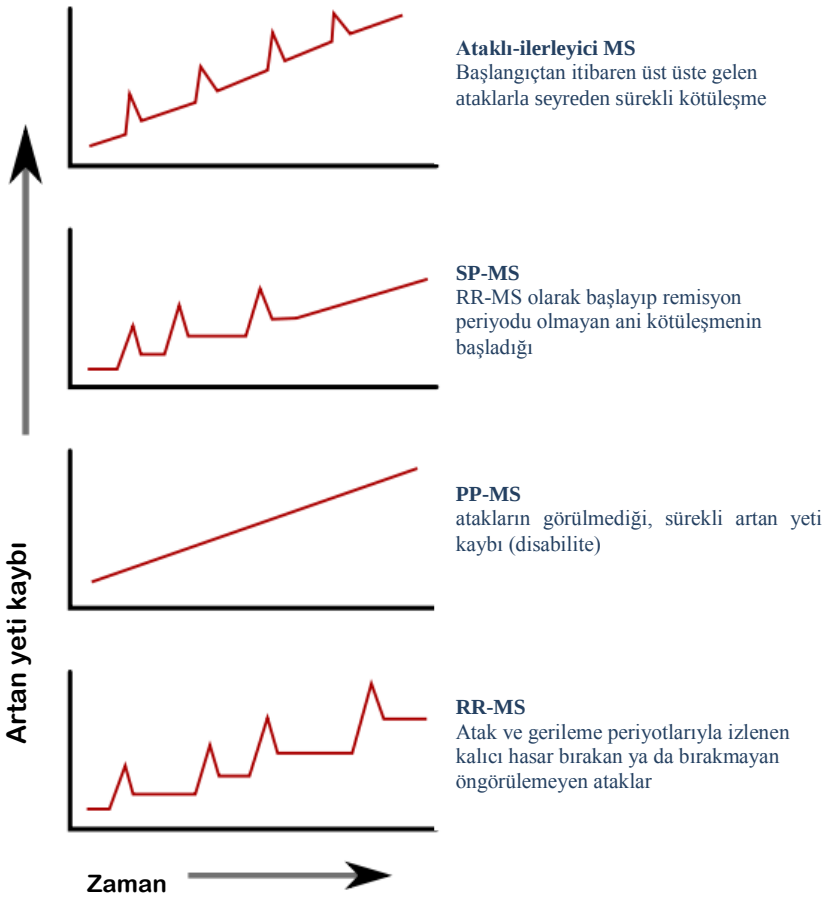
Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Multipl Skleroz Derneği tarafından 1996 yılında dört klinik seyir tipi belirlenmiştir [58]:

1. Ataklı - remisyonlu (Relapsing-Remitting - RR) MS

2. Birincil - ilerleyici (Primer Progresif - PP) MS

3. İkincil - ilerleyici (Sekonder Progresif - SP) MS

4. Ataklı - ilerleyici MS



Şekil 2-2: Multipl Skleroz'da klinik seyir

2.1.6.1. Ataklı-Remisyonlu (RR) MS

MS'in en yaygın tipi olan bu formu, nörolojik fonksiyonlarda gerilemeyle sonuçlanan akut enflamatuvar dönemlerle ilişkilidir. Aylar veya yıllar süren ve hastalığa ait yeni işaretlerin görülmediği, görece sessiz periyodlarla (remisyon) izlenen ve önceden tahmin edilemeyen ataklarla karakterizedir.

Uzun dönemde dereceli olarak yeti kaybı görülse de, ataklar sırasındaki hasarların tamamen iyileştiği durumlarda "benign MS" olarak tanımlanabilmektedir [59].

Hastaların bir kısmı nüksler arasında tam ya da kısmi düzelmeler gösterebilmektedir; ancak RR-MS'li hastaların büyük kısmında hastalık, nörolojik fonksiyonların kademeli olarak kaybıyla ve artan paralizi ile ilişkili olan, enflamasyondan bağımsız olduğu düşünülen ve SP-MS olarak tanımlanan daha ilerleyici bir forma dönüşmektedir [1].

2.1.6.2. Birincil-İlerleyici (PP) MS

Başlangıçtaki MS belirtilerinden sonra hiçbir gerileme göstermeyen hastalar bu gruba dahil olup, MS hastalarının yaklaşık olarak %10-15'ini oluştururlar [60]. Başlangıçtan itibaren az ya da hiç gerileme göstermeyen nörolojik yeti kaybının ilerlemesiyle karakterizedir [58]. Birincil ilerleyici tipin başlangıç yaşı, ataklı-yineleyici tipten daha geçtir ve 40 yaş civarıdır [19].

2.1.6.3. İkincil-İlerleyici (SP) MS

Başlangıçta ataklı-yineleyici MS hastası olanların yaklaşık %65'i daha sonradan akut ataklar arasında hiçbir kesin gerileme dönemi olmayan ilerleyici nörolojik yeti kaybının görüldüğü SP-MS formuna dönüşür [19, 58]. Hastalık başlangıcı ile RR-MS'ten sekonder MS'e dönüşüm süresi ortalama 19 yıldır [61].

2.1.6.4. Ataklı-İlerleyici MS

Başlangıçtan itibaren sürekli bir nörolojik gerilemenin görüldüğü ve aynı zamanda üzerine eklenen ataklarla kendini gösteren gruptur. Tüm MS tipleri içinde en az görülenidir [58].

2.2. Multipl Skleroz ve Bağışıklık Sistemi İlişkisi

Hastalığın patogenezinde immün sistemin temel rol oynadığına dair pek çok bulgu vardır. Merkezi sinir sistemine infiltre olan (sızan) ve miyelin antijenlerini

tanıyan otoreaktif T hücrelerinin, hastalığın oluşumunda birincil rol oynadığı öne sürülmektedir [62].

MS'in deneysel hayvan modeli olan "deneysel otoimmün ensefalomiyelit" (experimental autoimmune encephalomyelitis - EAE) li hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, öz-antijenler için spesifik T hücrelerinin MS oluşumunda rol oynadığını destekleyen kanıtlar sağlanmıştır [63]. Sağlıklı bireylerde naif T hücrelerinin merkezi sinir sistemine girişi, kan-beyin bariyerini oluşturan endotelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantılarla (tight junction) sınırlandırılmıştır. Buna karşın aktive T hücrelerinin eksprese ettiği hücre yüzey proteinleri, hem vasküler duvarlara yapışmayı (adezyonu), hem de bariyeri aşmayı kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle MS patogenezinde meydana geldiği düşünülen ilk olay, sağlıklı kişilerde periferde dolaşmakta olan naif miyelin-spesifik T hücrelerinin toleranstaki bir kırılma sonucu aktive olmasıdır.

Epidemiyolojik ve genetik çalışmalar, MS'in genetik duyarlılığın yanısıra çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan muhtemel tolerans kaybı ve miyelin-spesifik T hücrelerinin aktivasyonu sonucu meydana geldiğini göstermektedir [2].

Otoreaktif T hücreleri, kan-beyin bariyerinin içinden göç ederek özellikle miyelin kılıfların ve aynı zamanda merkezi nöronlar ve aksonların hasarına aracılık ederler. MS'in ana morfolojik özelliği, öncelikle, demiyelinizasyon alanında sinyal iletiminin engellenmesine veya yavaşlamasına neden olan, sinir aksonlarının demiyelinizasyonudur. Sinir liflerinin önemli bir kısmında aynı anda sinyal iletim blokajı meydana gelmesi durumunda, nörolojik semptomlar gelişmektedir [64].

Hastalığın gelişiminde T hücrelerinin rolü olduğu bilinmekle birlikte, RR-MS veya hastalığın kronik gelişiminde NK) hücrelerinin de rol aldığı düşünülmektedir [62].

2.3. Doğal Öldürücü Hücreler

Doğal immün sistemin elemanı olan NK hücreleri kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. Patojenler ve tümörlere karşı spontan litik aktivite gösteren NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin %5-15'ini oluşturur ve karaciğer, peritoneal kavite, plasenta gibi periferik dokularda bulunurlar [4].

NK hücreleri patojenlere karşı erken konak savunmasını sağlayan tümör ve virüsle enfekte hücreleri tanıyarak öldürme ve immünoregülatör sitokinlerin üretimi olmak üzere 2 ana fonksiyona aracılık ederler [6, 65-66].

NK hücreleri fonksiyonlarını, yüzeylerinde eksprese ettikleri çeşitli aktivatör ve inhibitör reseptörler arasındaki etkileşimler aracılığıyla gerçekleştirir ve IFN-γ, IL-2, IL-12 gibi sitokinler tarafından aktive olurlar [6, 67]. İnhibitör reseptörler bir inhibisyon sinyali oluştururken, aktivatör reseptörler NK hücre aktivasyonunu ve hedef hücre lizisini başlatırlar. Bu reseptörler arasında NKG2A inhibitör, NKG2D ve NKp44 ise aktivatör reseptördür [67].

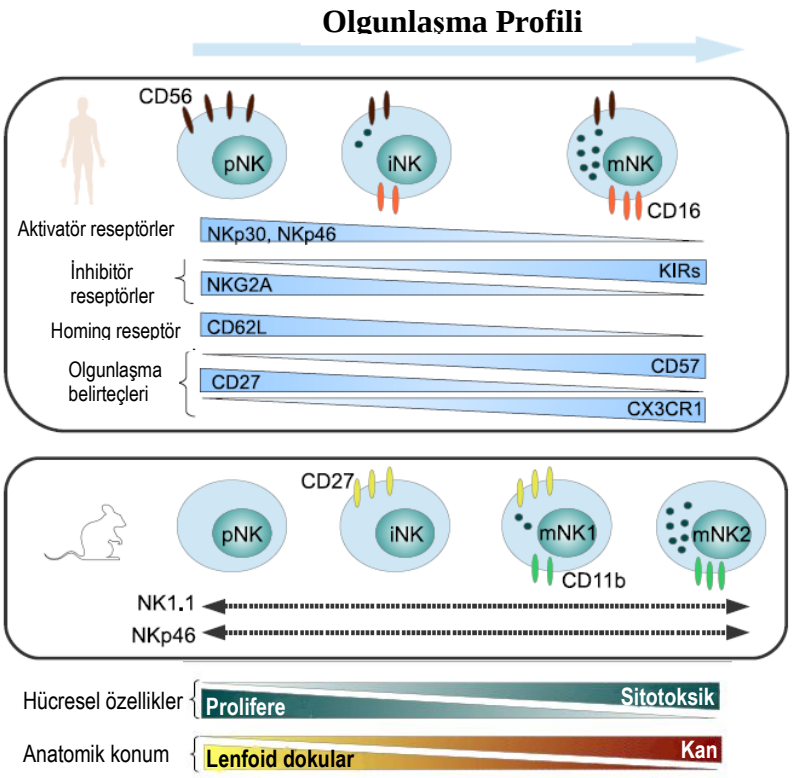
NK hücreleri aktivasyonu takiben uygun hedef hücrelere karşı sitotoksik fonksiyonlar sergilemenin yanında doğal ve edinsel immün yanıtları düzenleyen çeşitli sitokinler ve kemokinler (IFN-γ, GM-CSF ve TNF-α) salgılarlar [68].

Th1 ve Th2 hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre alt gruplarının da NK1 ve NK2 olarak iki gruba ayrıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir. *İn vitro* koşullarda IL-12 varlığında kültüre edilen NK hücreleri IFN-γ ve IL-10 üretirken (NK1), IL-4 varlığında kültüre edilen NK hücreleri ise IL-5 ve IL-13 üretmektedirler (NK2). NK1 ve NK2 hücre grupları sitotoksik aktivite bakımından benzer olmakla beraber, NK1 hücreleri hücre yüzey CD95 (Fas) antijenini NK2 hücrelerinden daha yüksek oranda eksprese ederler ve antijen veya kimyasal indüklü apoptozise karşı daha duyarlıdırlar [5, 8].

NK hücreleri; T hücre reseptörü (THR), immünoglobülin (Ig) veya CD3 molekülünü eksprese etmemelerine karşılık, hücre yüzeylerinde "nöral hücre yapışma molekülü-1" (CD56) ekspresyonu ile karakterizedir. CD56 ekspresyonunun özgül fonksiyonu tanımlanmamış olmakla birlikte, NK hücreleri CD56 ekspresyonunun yoğunluğuna bağlı olarak "$CD56^{parlak}$" ve "$CD56^{soluk}$" olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

Yüksek oranda FcγIIIA reseptörü CD16 ve perforin eksprese eden $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücreleri *"olgunlaşmış"* NK hücreleri olup, total periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadırlar [5-6]. Bu hücreler uyarıma bağlı olarak değişen miktarlarda IFN-γ sekrete edebilen ve hedef hücreleri etkili şekilde öldüren hücrelerdir [7]. Enflamasyonlu periferik bölgeler için "homing marker"ları (yerleşme belirteci) taşırlar ve sitotoksisitede etkili perforin içerirler.

Kandaki total NK hücrelerinin küçük bir bölümünü (%5-10) ise $CD16^{-}CD56^{parlak}$ *"olgunlaşmamış"* NK hücreleri oluşturmaktadır. Düşük seviyede perforin ve CD16 eksprese eden $CD56^{parlak}$ NK hücreleri uyarımı takiben yüksek miktarlarda IFN-γ ve TNF-α salgılarlar. Bu fonksiyonlarda $CD56^{soluk}$ NK hücrelerine göre üstün olmakla birlikte, yalnızca uzun süreli uyarımdan sonra sitolitik aktivite geliştirebilmektedirler [6, 69]. Yüksek seviyede sitokin sekresyonundan dolayı $CD56^{parlak}$ NK hücrelerinin enflamasyondan sorumlu veya regülatör etkili hücreler oldukları ileri sürülmektedir. Bu olgunlaşmamış NK hücreleri sekonder lenfoid dokularda [70] ve enflamasyon alanlarında yüksek oranda bulunurlar [71]. Bu özellikleriyle NK hücreleri, sekonder lenfoid organlarda ve enflamasyonlu MSS'de sitokin salınımı ve sitotoksisite yoluyla otoimmün T hücre yanıtlarını düzenler ve doku hasarına aracılık ederler [72].



Şekil 2-3: NK hücrelerinin olgunlaşma profili (pNK, öncül NK hücreleri; iNK, olgunlaşmamış NK hücreleri; mNK, olgun NK hücreleri)

eksprese ederler ve IL-2'nin düşük dozlarına (pikomolar) yanıt olarak *in vivo* ve *in vitro* olarak çoğalma gösterirler. Bununla beraber $CD56^{soluk}$ NK hücreleri yalnızca orta

afiniteli IL-2 reseptörü eksprese ederler ve yüksek dozlardaki IL-2'ye yanıt olarak zayıf bir çoğalma gösterirler [73].

2.3.1. Doğal Öldürücü Hücrelerin Multipl Skleroz İle İlişkisi

Otoimmün hastalıkların patofizyolojisine NK hücrelerinin katılımı uzun yıllar incelenmiş olmasına karşın [74-75], MSS otoimmünitesinde NK hücrelerinin asıl rolü halen netlik kazanmamıştır [76]. MS'te T hücrelerinin rolünü gösteren çok sayıda çalışma bulunmasına karşılık, NK hücrelerinin rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar arasında NK hücrelerinin koruyucu etkilerinin yanında, etkisinin olmadığını veya hastalığı tetikleyici etkileri olduğunu gösteren bulgular mevcuttur [1].

EAE, MS için en yaygın kullanılan deneysel model olup, EAE ile yapılan çalışmalar NK hücrelerinin rolü ile ilgili çelişkili sonuçlar ortaya koymaktadır. EAE, çeşitli memeli türlerinde adjuvan beraberinde miyelin-kökenli antijenlerle immünizasyon sonucu oluşturulmakta ve immünize edilen hayvanlarda meydana gelen paralitik hastalık, insanlardaki MS'in pekçok özelliğini göstermektedir [76-77]. EAE'nin miyelin oligodendrosit glikoproteinine (MOG) spesifik CD4+ T hücreleri tarafından C57BL/6 farelerde oluşturulduğu bilinmekle birlikte, MS patogenezinde tanımlanmış bir antijen bulunmamaktadır [77].

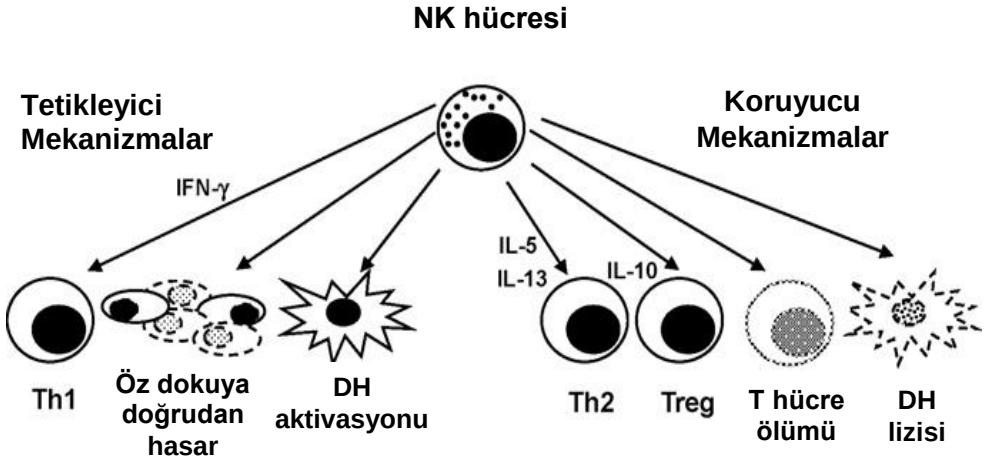
VLA4 adezyon molekülünü bloke edici antikorlarla MS tedavisi ilk kez EAE modelinde gerçekleştirilmiş ve etkili bir MS ilacı olan natalizumab bulunmuştur [7].

EAE'li fare ya da sıçanlarda NK hücrelerinin faydalı rol oynadığını gösteren çalışmaların tersine [74-75, 78-80], NK'dan yoksun farelerde EAE'nin daha ılımlı bir formunun gözlemlendiği [81] ve NK hücrelerinin varlığına bağımlı olan IL-21'in EAE üzerinde olumsuz etkisi olduğunu ortaya koyan [82] çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çelişkilerin, NK hücrelerinin farklı fonksiyonlar gösteren ve böylece immün yanıtta farklı etkilere sahip olan farklı alt tiplerinin meydana getirdiği heterojenlikten kaynaklanabileceği düşünülmektedir. EAE kompleks bir yolla meydana gelmekte ve verilen etken, etki gösterdiği bölgedeki mikroçevreye bağlı olarak farklı etkiler göstermektedir [76]. Bu da NK hücrelerinin neden EAE şiddetini hem arttırdığı hem de azalttığına yönelik bulgular olduğunu açıklayabilir [7].

EAE'li farelerde, NK hücrelerinin beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) ve nörotrofin-3 (NT-3) gibi nörotrofik faktörleri üretme kabiliyetleri ile, MSS'ni koruma ve onarımında önemli rol oynayabilecekleri ileri sürülmüştür [83].

İn vivo NK hücre eksikliğinin C57BL/6 farelerde klinik semptomların şiddetlenmesiyle sonuçlandığı, MOG-spesifik T hücre serisinin pasif transferiyle hastalık indüklendiğinde ise NK hücre deplesyonunun hastalık semptomlarını şiddetlendirdiği bilinmektedir [75]. Ayrıca, EAE'nin NK hücre deplesyonu ile şiddetlendiği ve PLP uyarımlı EAE'deki NK hücrelerinin otoantijen-spesifik, ensefalitojenik T hücreleri üzerinde doğrudan sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir [78].

NK hücrelerinin otoimmünitede koruyucu bir rolü olabileceğine dair dolaylı kanıt, genlerde meydana gelen ve NK hücrelerinde defekte neden olan mutasyonların enfeksiyonlara duyarlılığa ve immün yetmezliğe yol açması ve kişileri otoimmün hastalıklara yatkın hale getirebilmesidir [76, 84-85]. NK hücreleri öz-dokulara karşı doğrudan sitotoksik etkileriyle ve/veya immün-regülatör aktiviteleriyle otoantijen-spesifik yanıtın boyutunu etkileyebilirler [86].



Şekil 2-4: NK hücrelerinin MS patogenezi için önerilen etki mekanizmaları [76]

Aktive NK hücreleri, akut enflamatuvar lezyonlarda bulunur ve otolog oligodendrositlere karşı sitotoksik aktiviteye sahiptir. Bu sitotoksik etkileşim, NK hücreleri tarafından eksprese edilen aktivatör NKG2D reseptörüyle, onun ligandları

olan, oligodendrositler ve fetal astrositler tarafından eksprese edilen "MHC sınıf 1 zincir-ilişkili molekül A ve B" (MICA/B) ve "UL16 bağlayıcı proteinler 1,2 ve 3" (ULBP) ve aynı zamanda astrositler üzerindeki LFA-1 reseptörleri ve CD54 arasında gerçekleşir [87-88]. NK hücreleri, üzerindeki NKG2D ve NKp46 reseptörlerinin dâhil olduğu etkileşimlerin sonucundaki perforin salınımıyla mikroglial hücreleri öldürebilirler [72].

MS'te periferik kan NK hücre sitotoksik aktivitesinin araştırıldığı çalışmalarda, hedef olarak K562 eritromiyeloid lösemi hücrelerinin kullanıldığı *in vitro* Cr51 salınım deneyi kullanılmıştır. K562 hücreleri, NK aktivitesini inhibe etmek için gerekli olan MHC sınıf-1'den yoksun olmaları sebebiyle, NK hücreleri tarafından kolayca öldürülürler [89]. K562 hücrelerinin bu özelliğinden yararlanılarak gerçekleştirilen çalışmalar, MS hastalarında K562 hedef hücrelerine karşı NK hücre sitolitik aktivitesinin sağlıklılara oranla daha düşük olduğunu göstermiştir [90-95].

Bu düşünceyi destekleyen çalışmalarda, atak fazındaki MS hastalarında dolaşımdaki NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerinde azalma görülürken [95], remisyon dönemindeki MS hastalarında ise atak dönemindekilere kıyasla NK hücrelerinin NK2 alt tipinde artış olduğu görülmüş ve NK2 alt tipinin hastalık gerilemesinde yararlı bir etkisinin olabileceği düşünülmüştür [96]. Aynı zamanda NK hücre deplesyonunun, otoantijenlere karşı hafıza T hücre yanıtını arttırdığı ve NK2 alt hücre grubunun antijen-spesifik otoreaktif T hücre aktivasyonunu negatif olarak düzenlediği görülmüştür [9]. İlâveten hastalık tedavisine verilen yanıtların gözlemlendiği pek çok çalışmada, MS hastalarında immün-modülatör ve immün-baskılayıcı tedaviler boyunca $CD56^{parlak}$ NK hücre sayısında artış olduğu, bu nedenle bu alt hücre grubunun tedavide faydalı etkisi olabileceği öne sürülmektedir.

Yapılan bir başka çalışmada, remisyon dönemindeki MS hastalarının çoğunluğunda, yüzeylerinde CD95 (Fas) eksprese eden NK hücrelerinin yüksek oranda (>%36) bulunduğu gösterilmiş ve NK hücrelerinin MSS'de enflamatuvar yanıtlara aracılık eden otoimmün T hücrelerini baskılayabileceği düşünülmüştür. Bu doğrultuda, remisyon fazındaki MS hastalarında, MS'te olası hedef antijenlerden olan miyelin bazik protein (MBP)'e karşı hafıza T hücre yanıtı üzerinde NK hücre deplesyonunun etkisi çalışılmıştır. $CD95^{+}$ NK'ları yüksek olan hastaların PKMH'lerinden NK hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra $CD4^{+}$ T hücrelerinin hızlı bir şekilde IFN-γ üreterek MBP'ye

yanıt verdiği, NK hücre varlığında bu yanıtın görülmediği, ayrıca $CD95^{+}$ NK oranı yüksek olan hastalarda NK hücrelerinin, hafıza otoimmün T hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır [9].

Pek çok çalışma MS hastalarında tedavi süresince $CD56^{parlak}$ NK hücre alt grubunun yararlı etkilerinin olduğunu ileri sürmektedir. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada RR-MS hasta populasyonu ile sağlıklı kontrollerdeki $CD16^{-}CD56^{parlak}$ ve $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre alt gruplarının sıklığı karşılaştırılmış, hasta ve sağlıklı gruplardaki $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre sıklığının benzer oranda bulunduğu fakat MS'te bu hücrelerin fonksiyonlarında yetersizlik olduğu, salgıladıkları IFN-γ miktarının sağlıklı kontrollere kıyasla düşük olduğu gösterilmiştir.

Çalışmada tedavi görmemiş RR-MS hastalarıyla sağlıklı gruplar ele alınmıştır. Deneyin sonucunda hasta grubunda dolaşımdaki $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücrelerinin sıklığı sağlıklı gruptakilerle karşılaştırılmış ve her iki NK hücre alt grubunun da sıklığının MS'te değişmediği görülmüştür. MS'te NK hücrelerinin çoğalmalarını izlemek için PKMH'ler NK hücre-aktive edici sitokinlerle (IL-2 ve IL-12) muamele edilmiş ve 72 saat boyunca kültüre edilmiştir. Sonuçta MS hastalarında $CD56^{parlak}$ NK hücre alt grubunun IL-12'ye sağlıklılara oranla daha az yanıt verdiği ve IFN-γ üretiminin düşük olduğu görülmüştür. $CD56^{parlak}$ NK hücre çoğalma ve fonksiyonlarındaki yetersizliğin IL-15Ra, CD25, NKG2D, NKG2A ve CXCR1 ekpresyonuyla ilgisi olmadığı, ancak MS hastalarında CD69 ve HLA-DR ekspresyonlarının $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerinin artışıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir [10].

Son yıllarda, IL-27'nin NK hücrelerinin immünregülatör fonksiyonlarını arttırıcı etkisinin olduğuna dair çeşitli çalışmalar yapılmış ve IL-27 terapisinin $CD56^{parlak}$ NK hücre fonksiyonunu arttırarak MS'in de dahil olduğu otoimmün hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceği ileri sürülmüştür [97].

2.4. Sitokinler

Sitokinler, farklı hücre tipleri tarafından üretilip sekrete olan proteinlerin geniş ve heterojen bir grubudur. Doğal ve edinsel immünitenin tüm yollarına aracılık ve düzenleyicilik yaparlar. Sitokinler enfeksiyonlara, immün yanıtlara, enflamasyona ve travmaya karşı konak yanıtlarının düzenleyicileridir. Bazı sitokinler hastalığın oluşumu

ve ilerlemesi yönünde etki gösterirken (pro-enflamatuvar), bazıları da enflamasyonu azaltıcı ve iyileşmeyi arttırıcı etki göstermektedirler (anti-enflamatuvar) [98].

Sitokinler genellikle önceden üretilip depolanan moleküller değildir, sentezleri hücresel aktivasyonun bir sonucu olarak başlatılır. Farklı hücre tipleri üzerine etki edebilirler ve multipl biyolojik etkileri vardır. Tersine, birden çok sitokin aynı etkiye de sahip olabilir. Bir sitokin diğerlerinin üretimini inhibe edebilir veya uyarabilir.

Çoğu sitokin, kendisini üretip salan hücre üzerine (otokrin) veya yakınındaki bir hücreye (parakrin) etki eder. Çok miktarda üretildiklerinde sitokinler dolaşıma katılabilir ve üretildikleri alandan uzak bir yerde etki gösterebilirler (endokrin).

Doğal immünitenin aracıları ve düzenleyicileri olan sitokinler, dendritik hücreler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi doğal immün hücreler tarafından üretilirler ve enflamasyon sürecini başlatırlar veya viral enfeksiyonlara karşı savunmaya katkıda bulunurlar. Diğer sitokinler, özellikle yardımcı T hücre alt grupları tarafından üretilenler, edinsel immün sistemin aracılık ettiği konak savunmasına katkı sağlarlar ve immün yanıtları düzenlerler. Ayrıca T ve B hücrelerinin aktivasyon ve farklılaşmasından da sorumludurlar. Bazı sitokinler hematopoez için büyüme faktörü olup, kemik iliğindeki öncüllerden farklı tip immün hücrelerin oluşumunu düzenlemektedirler [99].

2.4.1. İnterlökin-2 (IL-2)

IL-2, beyaz kan hücrelerinin aktivitesini düzenleyen, protein yapıdaki bir sitokindir. Enfeksiyonlara karşı vücudun doğal savunmasının bir parçası olup, yabancı ile öz olanı birbirinden ayırt etmede rol alır. Tanımlanan ve karakterize edilen ilk interlökin molekülüdür.

Primer olarak aktivasyonu takiben antijen-spesifik CD4 ve CD8 T hücreleri tarafından üretilir ve IL-2 reseptörü aracılığıyla otokrin/parakrin bir proliferatif programa aracılık etmektedir [6].

IL-2, T hücrelerinin büyüme, çoğalma ve efektör T hücrelerine farklılaşmaları için gereklidir [100-101]. T hücre reseptörüne (THR) antijen bağlanması, IL-2 salınımını ve IL-2 reseptör ekspresyonunu uyarır. IL-2 aynı zamanda regülatör T hücre olgunlaşması için timusta T hücre gelişimi boyunca da gereklidir [37, 47, 102].

T hücre büyüme faktörü olmasının yanında IL-2, NK hücrelerinin çoğalmalarını uyarmakta ve sitotoksik aktivitelerini arttırmaktadır [103]. Ayrıca B hücreleri tarafından antikor üretimi ve çoğalmasını desteklemektedir [104-105].

2.4.2. IL-4

IL-4, naif yardımcı T hücrelerinin (Th0) Th2 hücrelerine farklılaşmalarını uyarır. IL-4 tarafından aktivasyonu takiben, Th2 hücreleri ilave IL-4 üretirler. IL-4'ün fazla üretimi, allerjiyle ilişkilidir [106].

IL-4'ün pek çok biyolojik rolü vardır. Bunlardan bazıları aktive B ve T hücre çoğalmasını uyarmak ve B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmalarını sağlamaktır. Hümöral ve edinsel immünitede anahtar düzenleyici olan IL-4, B hücre IgE sınıf değişimini indüklemekte ve MHC sınıf-2 üretimini upregüle etmektedir. IL-4 Th1 hücrelerinin, makrofajların, IFN-γ'nın ve dendritik hücrelerden IL-12'nin üretimini azaltır.

2.4.3. IL-10

IL-10, insan sitokin sentez inhibitör faktörü (CSIF) olarak da bilinen bir anti-enflamatuvar sitokin olup, primer olarak monositler tarafından üretilmekte ve daha az olarak Th2, mastositler, $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ regülatör T hücreleri ve aktive T ve B hücrelerinin belirli bir alt grubunda üretilmektedir. IL-10 ekspresyonu, uyarılmamış dokularda minimal düzeydedir ve kommensal veya patojenik flora tarafından tetiklenmesi gerektiği bilinmektedir [107].

Viral enfeksiyona karşı immün yanıt süresince NK hücre aktivitesini inhibe etmek için sitotoksik T hücreleri tarafından salınan IL-10 [108], immünregülasyon ve enflamasyonda görev almaktadır. Th1 sitokinlerinin, MHC sınıf-2 antijenlerinin ve makrofajlar üzerindeki ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonunu azaltmakta ve aynı zamanda B hücre sağkalımını, çoğalmasını ve antikor üretimini arttırmaktadır. IL-10 NF-κB aktivitesini bloke edebilir.

IL-10, makrofajlar ve regülatör T hücreleri gibi hücreler tarafından üretilen IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-α ve GM-CSF gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe etme kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda antijen sunan hücrelerin (ASH) antijen sunma kapasitelerini baskılayabilmektedir. Ayrıca IL-10, Th2 hücreleri ve mast hücrelerine karşı uyarıcı etkiye sahiptir.

2.4.4. IL-12

IL-12, fizyolojik olarak fagositler, B lenfositleri ve diğer ASH'ler tarafından üretilen, heterodimerik bir sitokindir. IL-12'nin aktive T ve NK hücrelerinin proliferasyonunu sağladığı, NK hücrelerinin litik aktivitesini arttırdığı ve *in vitro* koşullarda potansiyel anti-proliferatif / anti-lösemik aktiviteli bir sitokin olan IFN-γ üretimini sağladığı bilinmektedir [109].

IL-12 NK hücrelerinin ve T lenfositlerinin aktivitelerini düzenlemede kritik rol oynamaktadır. Hayvan modellerinde IL-12, NK hücrelerinin ve sitotoksik T lenfositlerinin sitotoksik aktivitelerini arttırma ve NK ve T hücreleri tarafından IFN-γ üretimini indükleme kabiliyetleriyle, potansiyel antitümör etkilere sahiptir [110].

2.4.5. IL-22

IL-22, temel olarak Th17 ve dendritik hücreler tarafından üretilen bir IL-10 ailesi sitokinidir. Özellikle respiratuvar ve bağırsak epitelyal hücrelerinde olmak üzere gram negatif bakterilere karşı konak savunmasında önemli rol oynamaktadır. IL-22'nin, MS'in de dahil olduğu pek çok otoimmün hastalığın gelişim ve patogenezinde görev aldığı kanıtlanmıştır [111].

IL-22, IL-17 ile birlikte dalaktaki LTi-like (Lenfoid doku uyarıcı benzeri hücre) ve aynı zamanda Th17 hücreler tarafından hızlı bir şekilde üretilir ve hem edinsel hem de doğal immün sistemlerin koordinasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. NK hücrelerinin de IL-12, IL-18 ve IL-23 uyarımına yanıt olarak IL-22 ürettiği bilinmektedir [112-114].

2.4.6. İnterferon-gamma (IFN-γ)

IFN-γ (tip-2 interferon), tümör kontrolünde ve hücre içi bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı doğal ve edinsel immünitede kritik rol oynar. IFNγ, makrofajlar için önemli bir aktivatördür. IFN-γ ekspresyonundaki aşırı yükselme, otoimmün ve oto-enflamatuvar hastalıklarla ilişkilidir. İmmün sistemde IFN-γ'nın önemi, viral replikasyonu doğrudan inhibe etmesi ve en önemlisi immün-uyarıcı ve immün-düzenleyici etkilerinin olmasıdır. IFN-γ baskın olarak NK ve NKT hücreleri ve antijen-spesifik immün yanıtın parçası olan CD4 Th1 ve CD8 sitotoksik T lenfositleri (CTL) tarafından üretilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarına ait heparinize periferik kan örnekleri, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiş ve çalışmanın deneysel aşamaları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Tedavisiz RR-MS'li Olgular

McDonald tanı kriterlerine göre RR-MS tanısı konmuş, herhangi bir immünmodülatör tedavi almamış hastalar, "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur" formlarını imzalamalarının ardından çalışmaya dahil edilmiştir (n: 12; yaş ortalaması: 30.3 ± 14.0; 4 erkek - 8 kadın).

3.1.2. Tedavi Gören RR-MS'li Olgular

McDonald tanı kriterlerine göre tanısı konmuş ve en az 6 aydır immünmodülatör tedavi almakta olan RR-MS hastaları çalışmaya dahil edilerek, "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur" formları imzalatılmıştır (n: 11; yaş ortalaması: 30.4 ± 9.4; 2 erkek - 9 kadın).

3.1.3. Tedavisiz KİS'li Olgular

Herhangi bir immünmodülatör tedavi almayan KİS'li hastalara "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur" formu imzalatıldıktan sonra, hastalar çalışmaya dahil edilmiştir (n: 10; yaş ortalaması: 31.2 ± 11.3; 2 erkek - 8 kadın).

3.1.4. Sağlıklı Olgular

Herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan, düzenli ilaç kullanımı olmayan ve hasta gruplarıyla yaş ve cinsiyetleri bakımından uyumlu sağlıklı bireyler çalışmaya dahil edilmiş, bireylere çalışmayla ilgili bilgi verilmesinin ardından "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur" formları imzalatılmıştır (n: 10; yaş ortalaması: 30.8 ± 9.8; 2 erkek - 8 kadın).

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

3.2.1. Lizis Çözeltisi

Lize edici solüsyon, flow sitometrik analiz için periferik kan hücrelerini floresan işaretli monoklonal antikorlarla boyamanın ardından, eritrositlerin patlatılması amacıyla kullanılmaktadır. Örnek hazırlama süresinin daha kısa olması ve toksik etkilerinin daha az olması nedeniyle Ficoll ile yoğunluk gradiyent ayrımının yerini almıştır.

10X konsantrasyona sahip olan ve <%15 formaldehit ve <%50 dietilen glikol içeren FACS Lysing Solüsyonu'nun (BD Bioscience, San Jose, USA) 1:10 oranında distile suyla dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirilmesi ve oda sıcaklığında muhafaza edilmesi gerekmektedir.

3.2.2. PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi)

PBS (Sigma-Aldrich, USA), kan ile izotonik bir çözelti (pH=7,4) olma özelliğinden dolayı, hücre süspansiyonu hazırlama ve santrifüj ile hücre yıkama gibi işlemlerde kullanılmaktadır.

3.2.3. RPMI-1640

Kültür için besi yeri malzemesi olarak kullanılan RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, UK) antibiyotik, antimikotik ve zenginleştirme maddelerinin eklenmesiyle *in vitro* deneyler için hazır hale getirilmektedir. Zenginleştirmede kullanılan malzemeler:

- %10 FBS (Fetal sığır serumu - Gibco, UK)
- %1 L-glutamin (Gibco, UK)
- %1 Streptomisin ve penisilin (Gibco, UK)

3.2.4. Fiksasyon ve Permeabilizasyon Kiti

Fiksasyon & Permeabilizasyon kiti (eBioscience, Inc., San Diego, USA) hücreleri flow sitometrik analizden önce hücre içi boyama işlemine hazırlamada kullanılmaktadır. 1X konsantrasyondaki fiksasyon çözeltisi %4 formaldehit içermekte olup, hücre yüzeyini sabitlemek amacıyla kullanılmaktadır. Permeabilizasyon çözeltisi ise 10X konsantrasyonda olup, kullanılmadan önce 1:10 oranında distile suyla dilüe edilmesi gerekmektedir. 1X permeabilizasyon çözeltisi %0.1 oranında saponin ve

%0.0009 oranında sodyum azid içermektedir. Hücre yüzeyini delerek boyamada kullanılacak monoklonal antikorun hücre içine girmesini sağlamaktadır.

3.3. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Heparinli tüp içerisinde gönüllülerden alınan 15 ml periferik venöz kan örneklerinde hücre yüzey molekül ekspresyonlarını saptamak amacıyla; anti-CD45/CD14, -CD3/CD19, -CD4/CD8 ve izotip kontrol olarak IgG1/IgG2a FITC/PE ikili boyaları ile -CD3 FITC, -CD16 APC ve -CD56 PE-Cy5 monoklonal antikorlarıyla boyama yapılmıştır (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar

Monoklonal Antikor	Renk	Firma
IgG1/IgG2a	FITC/PE	BD/Simultest, San Jose, CA
CD45/CD14	FITC/PE	BD/Simultest, San Jose, CA
CD4/CD8	FITC/PE	BD/Simultest, San Jose, CA
CD3/CD19	FITC/PE	BD/Simultest, San Jose, CA
CD3	FITC	Biolegend, San Diego, CA
CD16	APC	Biolegend, San Diego, CA
CD56	PE-Cy5	Biolegend, San Diego, CA

Bunun için tüplere, önceden titrasyon yapılarak uygun miktarları belirlenen floresan işaretli monoklonal antikorların üzerine 50 µl kan örneği eklenmiş, tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından eritrositleri patlatmak amacıyla tüplere 1,5 ml lize edici solüsyon (BD FACS Lysing Solution, San Jose, CA) eklenip vorteksle karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 2 ml PBS eklenen tüplerin 1800 devirde 10 dakika santrifüjünü takiben üst sıvılar uzaklaştırılmış ve tekrar 2 ml PBS eklenerek 1800 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvıların

uzaklaştırılmasını takiben, tüplere 300 µl FACS Flow Sheat sıvısı eklenmiş ve FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) cihazında değerlendirilmiştir.

3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) Eldesi

Heparinli tüp içerisine alınan 15 ml periferik venöz kan örneği, 1:1 oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra, 50 ml'lik konik tabanlı falcon tüpü içerisinde, oda sıcaklığındaki steril Biocoll (Biochrom AG, Berlin, Germany - yoğunluk:1,077 gr/ml) üzerine 1:1 oranında pastör pipeti ile eklenmiş, bu işlem sırasında ficoll ve sulandırılmış kan örneğinin birbirine karışmamasına ve ficoll ile kan örneğinin ayrı katmanlar halinde kalmasına dikkat edilmiştir.

Falcon tüpleri içindeki örneklerin 2000 devirde, 20 dakika ve $+20^0$C'de santrifüj edilmesini takiben, ayrı katmanlara ayrılmış olan kan-PBS karışımının en üstte kalan plazma kısmı pastör pipeti ile uzaklaştırıldıktan sonra PKMH'lerin bulunduğu, ficoll ile plazma arasında ince bir tabaka halinde gözlenen beyaz bulutsu katman pastör pipeti ile toplanarak 15 ml'lik konik tabanlı steril falcon tüpüne alınmıştır. Üzerine 15 ml'ye tamamlanacak şekilde steril PBS çözeltisi eklendikten sonra tüpler, 2000 devirde 10 dakika ve $+8^0$C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvının uzaklaştırılması ile elde edilen PKMH'lerin üzerine tekrar 15 ml steril PBS eklenerek 5 dakika 1250 devirde ve $+4^0$C'de ikinci kez yıkama işlemi yapılmıştır.

Yıkama sonrası üst sıvıları uzaklaştırılan PKMH'lerin üzerine $+4^0$C'deki 2 ml zenginleştirilmiş RPMI-1640 medyumu eklenerek hücre sayımı aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, 20 µl PKMH hücre süspansiyonu, 20 µl tripan mavisi boyasıyla karıştırıldıktan sonra, tripan mavisinin yalnız ölü hücreleri boyama özelliğinden yararlanılarak Neubauer Sayma Kamarası yardımıyla ışık mikroskobunda 1 ml'de bulunan canlı PKMH sayısı hesaplanmıştır.

3.5. Hücre Kültürü

PKMH'ler 24 ve 72 saat süreyle hrIL-2, hrIL-4 ve hrIL-12 varlığında veya sitokin ilavesi olmadan (unstimüle - US) kültüre edilmiştir (Tablo 3-2). Bu amaçla PKMH'ler, 24 ve 72 saat deneyleri için ayrı ayrı olmak üzere ve her kuyucukta $1x10^6$ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu steril kültür plaklarına eklenmiştir. IL-2, IL-4, IL-12 sitokinleri eklenen ve sitokin ilavesi yapılmayan her bir kuyucuğa, totalde 1 ml olacak şekilde zenginleştirilmiş RPMI-1640 medyumu eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücrelerin

homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Kültür plakları 37^0C'de %5 CO_2 içeren etüvde kültüre alınmıştır.

Kalan PKMH'ler NK sitotoksisite ölçümü yapılmak üzere kültür flasklarına alınarak gece boyu 37^0C'de %5 CO_2 içeren etüvde bekletilmiştir. 24 saat kültür yapılacak olan kuyucuklara kültürün son 4 saatinde, sitokin salınımının durdurulması amacıyla, bir protein transport inhibitörü olan Brefeldin A (eBioscience, San Diego, CA) eklenmiş ve pipetaj yapılarak karışması sağlandıktan sonra kültür plakları tekrar etüve kaldırılmıştır.

Tablo 3-2: Hücre kültüründe kullanılan uyaranlar ve kimyasallar

Uyaran	Kullanım Dozu	Marka
IL-2	20 ng/ml	BioLegend, San Diego, CA
IL-4	25 ng/ml	BioLegend, San Diego, CA
IL-12	15 ng/ml	BioLegend, San Diego, CA
Brefeldin A	3 μg/ml	eBioscience

3.6. NK Sitotoksisite Ölçümü

NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini tayin etmek amacıyla hedef hücre olarak K-562 eritromyeloid lösemi hücre serisi kullanılmıştır. Flasklar içinde 37^0C %5 CO_2 içeren etüvde üretilen ve düzenli olarak pasajları yapılan K-562'ler ile gece boyu etüvde muhafaza edilen PKMH'ler, 15 ml'lik falcon tüplerine alınıp üzerlerine RPMI-1640 eklenerek 2000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıları uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 2 ml tamamlanmış RPMI-1640 medyumu eklenmiştir.

K-562 hücre süspansiyonunun üzerine karanlık ortamda 4 μl CFSE (Molecular Probes Europe, BV, Leiden, The Netherlands) ilave edilip 10 dk $+4^0$C'de bekletildikten sonra steril PBS eklenerek 5 dakika 2000 devirde santrifüj edilmiş ve üst sıvıları uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml RPMI-1640 eklenmiştir. K-562 ve PKMH'ler tripan mavisi

ile eşit oranda karıştırıldıktan sonra Neubauer kamarası kullanılarak ışık mikroskobunda hücre sayımları yapılmıştır.

K-562 ve PKMH'ler, hedef:efektör oranı 1:10 ($5x10^4$ K-562 ve $5x10^5$ PKMH) olacak şekilde 48 kuyucuklu kültür plaklarına eklenmiş, pipetaj ile hücrelerin karışması sağlanmıştır. Kontrol olarak yalnız K-562 ve yalnız PKMH'lerin bulunduğu kuyucuklar hazırlandıktan sonra ve tüm kuyucuklara toplam hacim 500 µl olacak şekilde RPMI-1640 eklenerek 37^0C %5 CO_2 içeren etüvde 4 saat kültüre alınmıştır.

Kültür sonrası plaklardan toplanıp tüplere alınan hücrelerin üzerine, ölü hücreleri işaretlemek amacıyla 5 µl propidium iodid (50 µg/ml, Becton Dickinson, San Jose, USA) eklenerek -20^0C'de 5 dakika inkübasyonu takiben hücrelerin sitotoksik aktivitesi flow sitometri cihazı ile saptanmıştır (BD FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, USA) .

3.7. Hücre Yüzey Molekülleri ve Hücre İçi Sitokin Tayini

Hücreler, 24 saat ve 72 saat kültürün sonunda tüplere alınıp üzerlerine 2 ml PBS eklenerek 1800 devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 300 µl PBS eklenerek PKMH hücre süspansiyonu elde edilmiştir.

PKMH süspansiyonunda önce hücre yüzey boyaması yapılarak $CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre alt grupları ve takiben hücre içi IFN-γ, IL-10 ve IL-22 sitokin seviyeleri flow sitometri cihazı ile saptanmıştır (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA)

3.7.1. Hücre Yüzey Boyaması

IL-2, IL-12, IL-4 uyarımı yapılan ve sitokin uyarımı yapılmayan her bir koşul için ayrı ayrı olmak üzere tüplere anti-CD3-FITC, -CD16-APC ve -CD56-PE-Cy7 işaretli monoklonal antikorlar ve $2,5x10^5$ hücre içerecek miktarda PKMH süspansiyonu eklenerek 20 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben üzerlerine 2 ml PBS eklenen tüpler, 1800 devirde 10 dk santrifüj edilerek hücre içi boyama aşamalarına geçilmiştir.

3.7.2. Hücre İçi Boyama

Hücre içi sitokin miktarlarını belirlemek için Fiksasyon & Permeabilizasyon kiti (eBioscience Inc., San Diego, CA) kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle üst sıvılar

uzaklaştırılıp tüplere 100 µl 1X fiksasyon sıvısı eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksasyon işlemini takiben, tüplere 2 ml 1X permeabilizasyon sıvısı eklenip ve 1800 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 100 µl 1X permeabilizasyon sıvısı ve ayrı tüplerde olmak üzere PE işaretli anti-IFN-γ (Gen-Probe Inc., San Diego, USA), -IL-10 ve -IL-22 (BioLegend, San Diego, CA) monoklonal antikorları eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben tüplere 2 ml 1X permeabilizasyon sıvısı eklenerek 1800 devirde 5 dk santrifüj edilmiş, üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 300 µl FACS flow sheat sıvısı eklenen tüplerin değerlendirilmesi flow sitometrik olarak yapılmıştır.

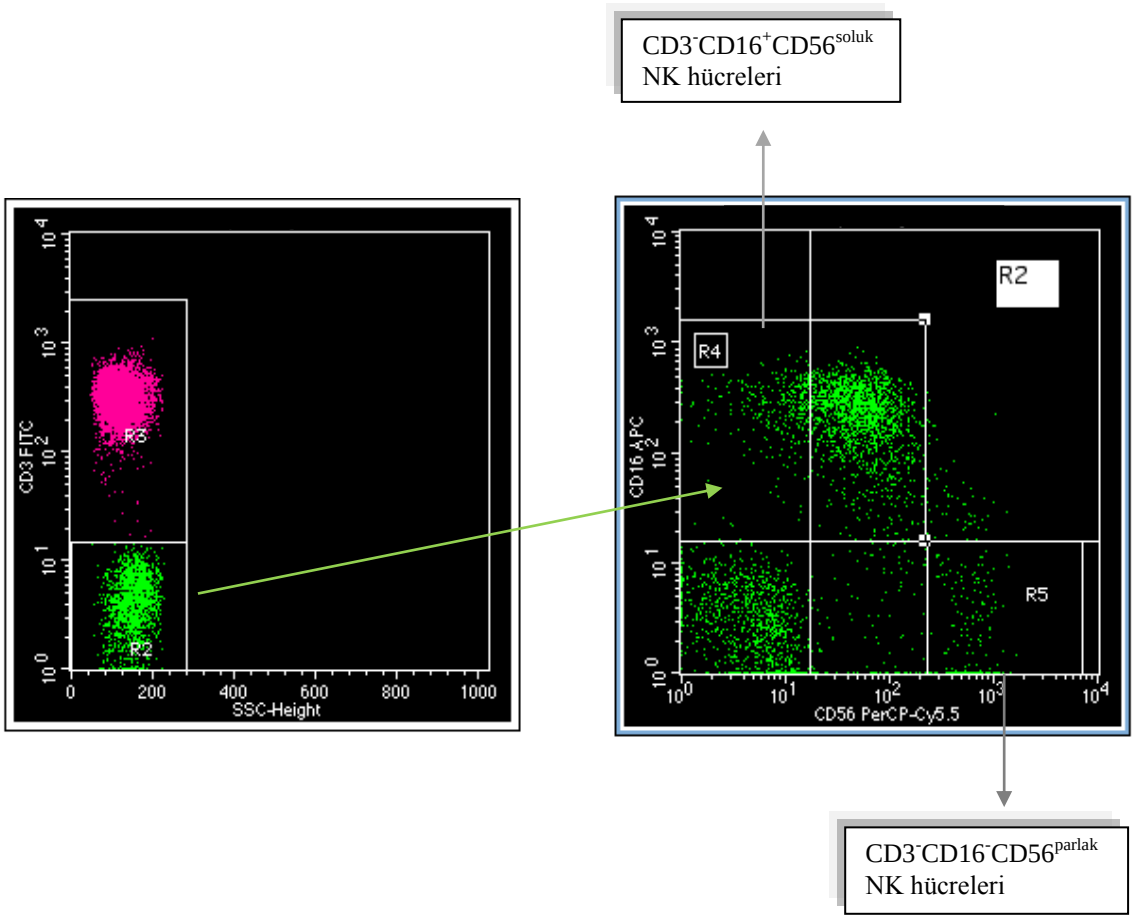
3.8. Analiz ve İstatistikler

Çalışmada gerçekleştirilen tüm deneylerin sayım ve analizleri BD CellQuest yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 21 programı ile yapılmış ve gruplar arası farkların değerlendirilmesinde non-parametrik Mann-Whitney U testi, grup içi parametrelerin değerlendirilmesi için Wilcoxon testi kullanılmıştır. $p \leq 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

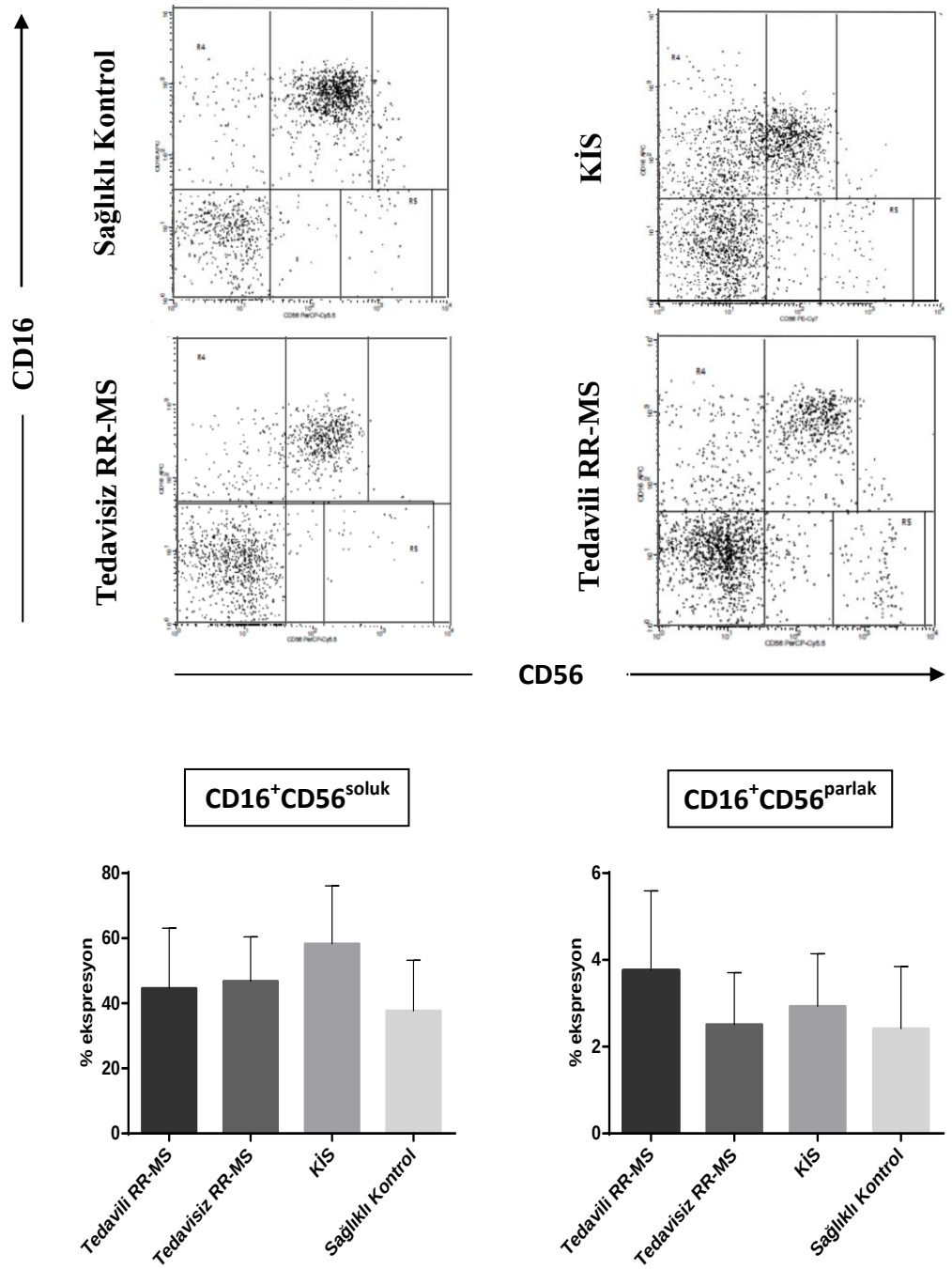
4. BULGULAR

4.1. Periferik Kan NK Hücre Alt Grupları

MS patogenezinde NK hücrelerinin rolünü saptamak amacıyla tedavili-tedavisiz RR-MS ve KİS hastaları ile sağlıklı kontrol periferik kan $CD3^-$ hücre popülasyonunda NK hücre alt grup oranları flow sitometrik olarak incelenmiştir. $CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre alt gruplarını saptamak için, CD3/SSC histogramında, öncelikle $CD3^-$ hücreler kapılanmış ve bu kapı içindeki hücrelerin CD16/CD56 oranları, CD16/CD56 histogramında değerlendirilmiştir (Şekil 4-1). Hasta gruplarının NK hücre alt grup oranları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4-2).

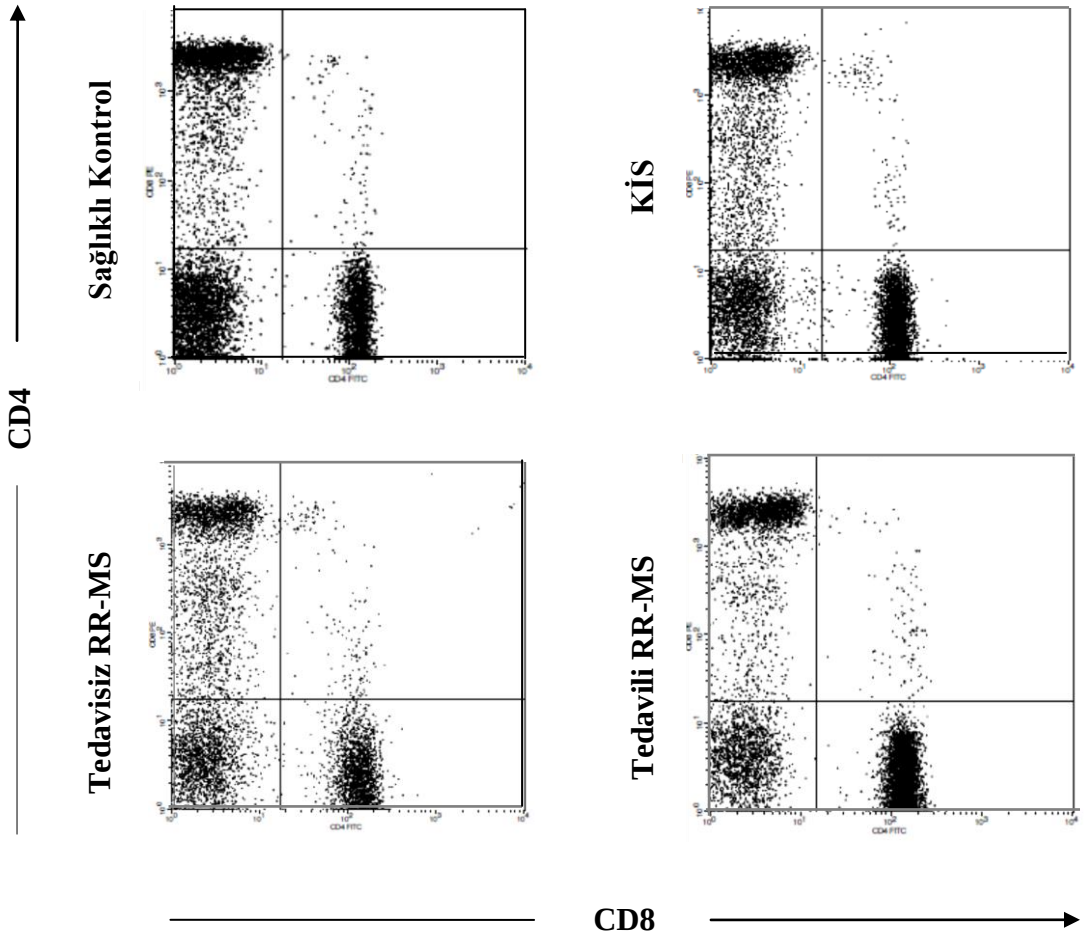


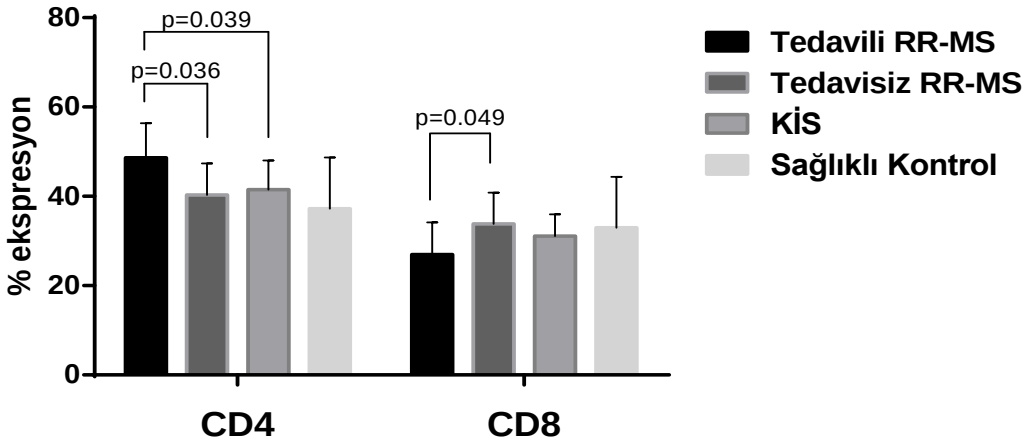
Şekil 4-1: $CD3^-$ hücre grubunda NK hücre alt grup kapılama stratejisi



Şekil 4-2: Sağlıklı ve hasta gruplarında periferik kan $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}$ $CD56^{parlak}$ NK hücre oranları

Hasta gruplarında, periferik kan $CD4^{+}$ yardımcı T, $CD8^{+}$ sitotoksik T ve $CD19^{+}$ B lenfosit oranları sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında NK hücrelerine benzer şekilde anlamlı bir fark görülmemiştir. Hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, $CD4^{+}$ T lenfositleri, tedavili RR-MS hastalarında, tedavisiz RR-MS ve KİS hastalarına göre anlamlı derecede yüksek ($p=0.036$, $p=0.039$; sırasıyla), $CD8^{+}$ T lenfositleri ise tedavisiz RR-MS hastalarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4-3).



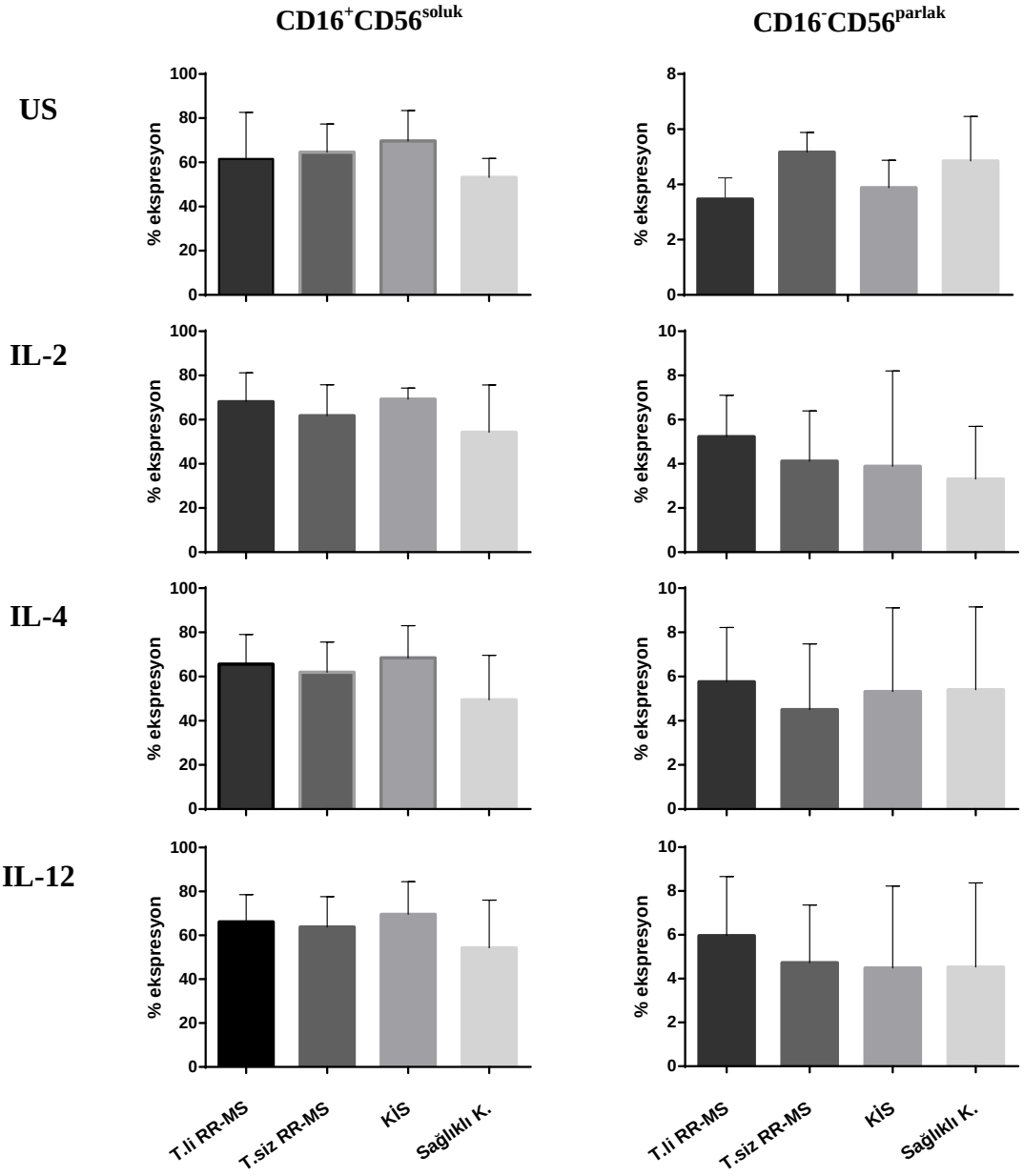


Şekil 4-3: Sağlıklı ve hasta gruplarında CD4 ve CD8 hücre yüzey ekspresyonları

4.2. Sitokin Aktive PKMH'lerde NK Hücre Yanıtı

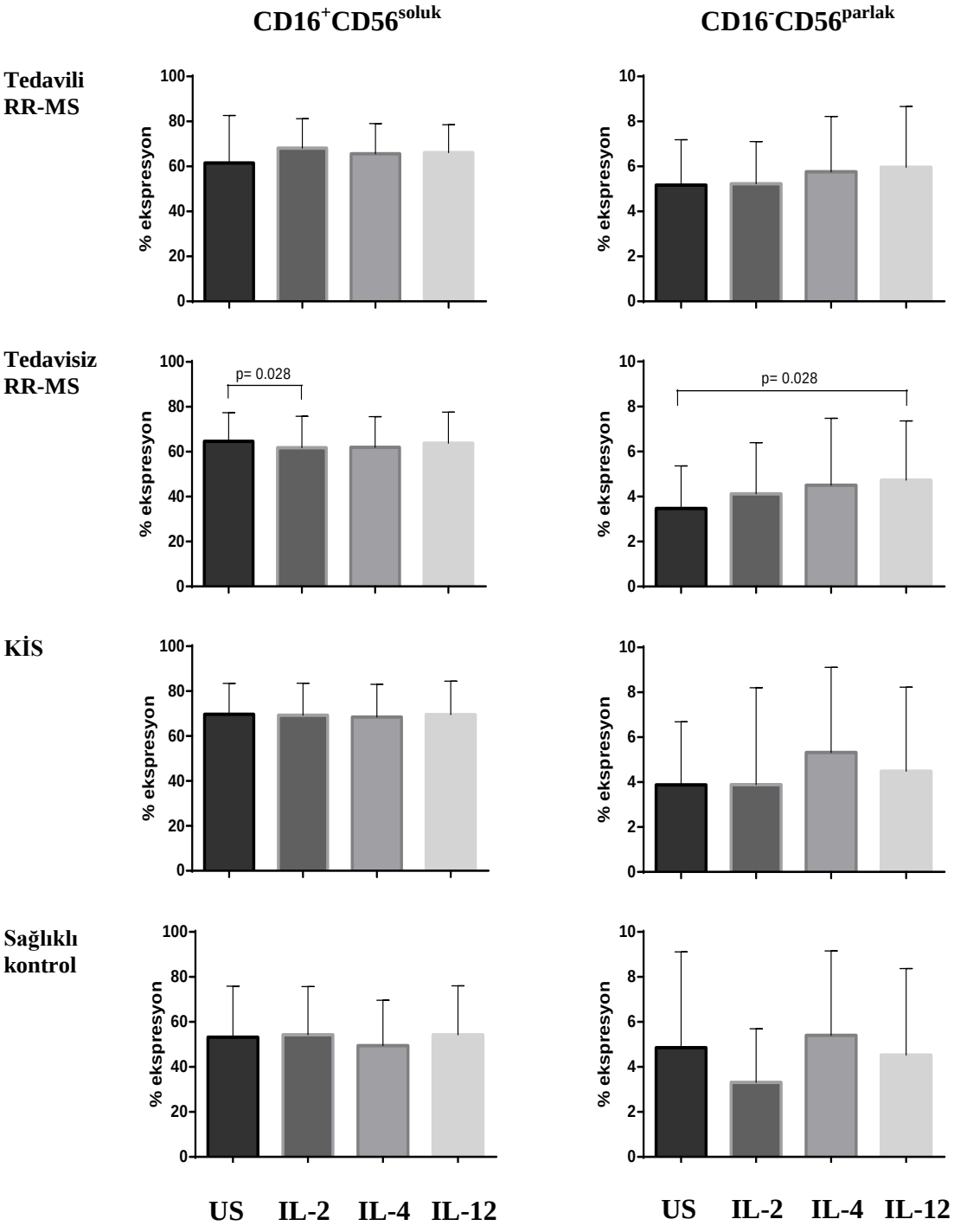
PKMH'lerin IL-2, IL-12 ve IL-4 ile 24 saat *in vitro* şartlarda kültürünü takiben NK hücre oranları flow sitometrik olarak değerlendirilmiştir. PKMH'ler, DH ile uyarılan NK hücre aktivasyonunu ve IFN-γ üretimini taklit etmesi için IL-12, NK1 ve NK2 hücre alt gruplarına yönlendirme için ise, IL-2 ve IL-4 sitokinleri ile uyarılmıştır.

Hasta grupları birbiriyle ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: 24.saat $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD3^{-}CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranları

Hasta grupları ve sağlıklı kontrol örnekleri kendi içlerinde değerlendirildiğinde, yalnızca tedavisiz RR-MS hastalarında IL-2 uyarımına yanıt olarak $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre grubu oranında anlamlı derecede azalma ve IL-12 uyarımına cevaben $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranlarında anlamlı artış saptanmıştır (p=0.028, p=0.028; sırasıyla) (Şekil 4-5).

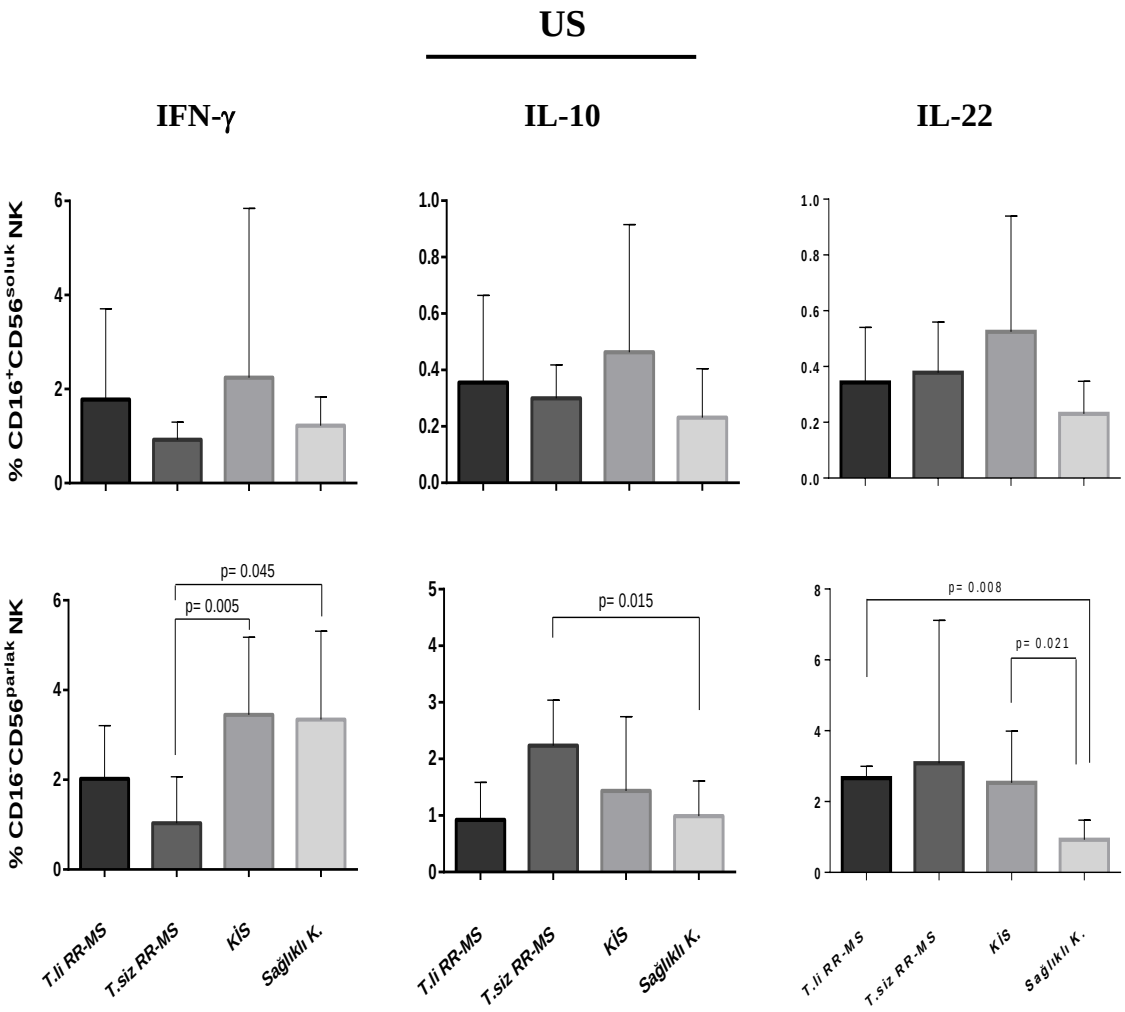


Şekil 4-5: Hasta grupları ve sağlıklı kişilerde farklı sitokinlere 24. saat yanıtları

4.3. NK Hücre Alt Grupları Hücre İçi Sitokin İçeriği

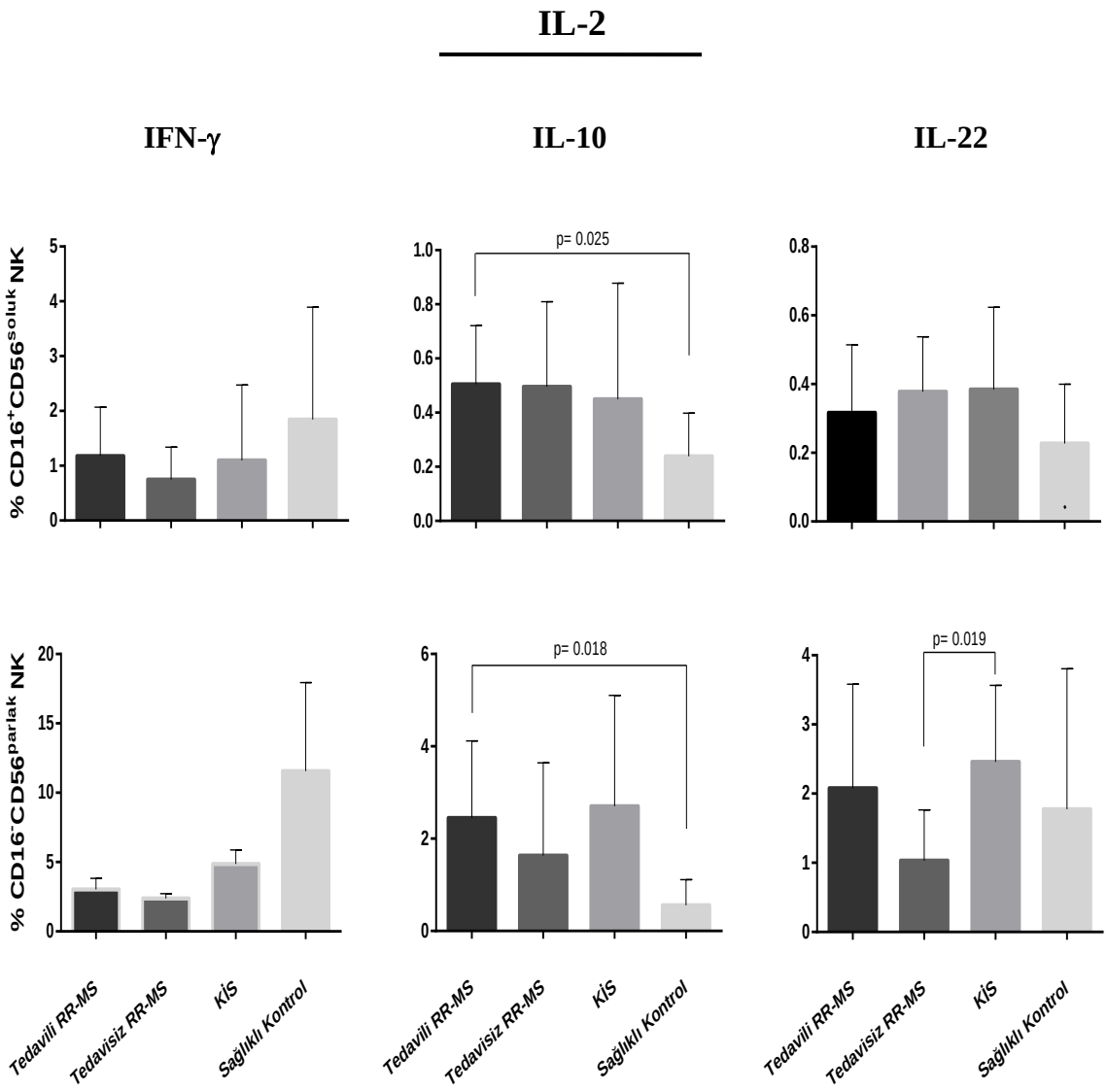
MS patogenezinde NK hücrelerinin immünoregülatör rolünü saptamak amacıyla, PKMH'ler IL-2, IL-12 ve IL-4 sitokinleriyle 24 saat süreyle *in vitro* şartlarda kültüre alınmıştır. Kültür sonrası $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre alt gruplarında hücre içi IFN-γ, IL-10 ve IL-22 seviyeleri saptanmıştır.

Uyarım yapılmayan koşullarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, tedavisiz RR-MS hastalarında $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IFN-γ içeriğinde anlamlı derecede azalma, IL-10 içeriğinde ise artış saptanmıştır (p=0.045, p=0.015; sırasıyla). Tedavili RR-MS ve KİS hastaları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ise, her iki grubun $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IL-22 içeriği sağlıklılara oranla anlamlı derecede artış göstermiştir (p= 0.008, p=0.0021; sırasıyla) (Şekil 4-6).



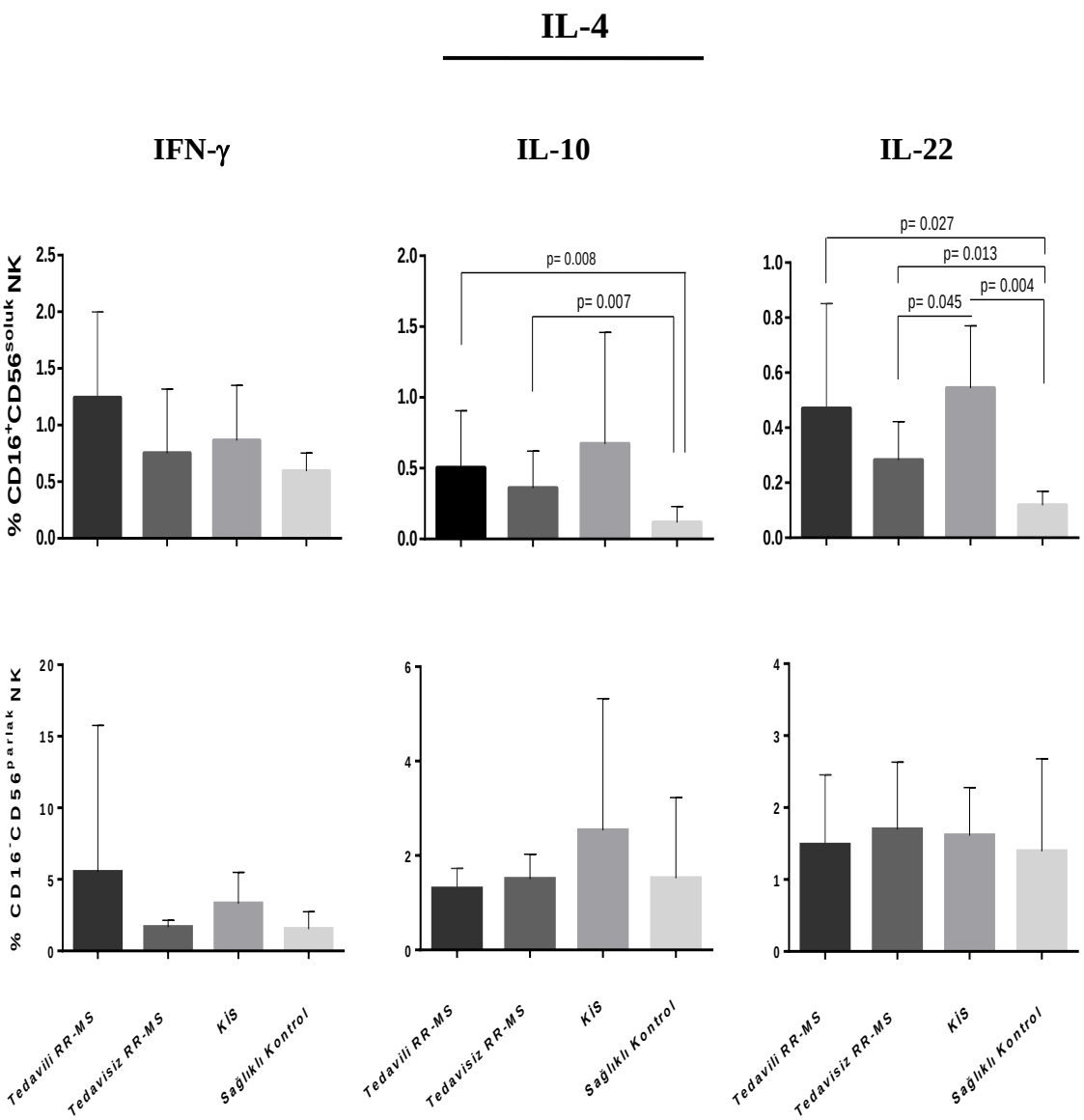
Şekil 4-6: Sitokin uyarısı olmayan kültür koşullarında $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre içi sitokin seviyeleri

IL-2 uyarımı sonucunda tedavili RR-MS hastalarında $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IL-10 seviyelerinde sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış saptanmıştır (p=0.025, p=0.018, sırasıyla). Tedavisiz RR-MS hastalarında $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre IL-10 miktarı tedavili gruptakine yakın ve KİS hastalarında sağlıklılarla karşılaştırıldığında artış göstermesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir (Şekil 4-7).



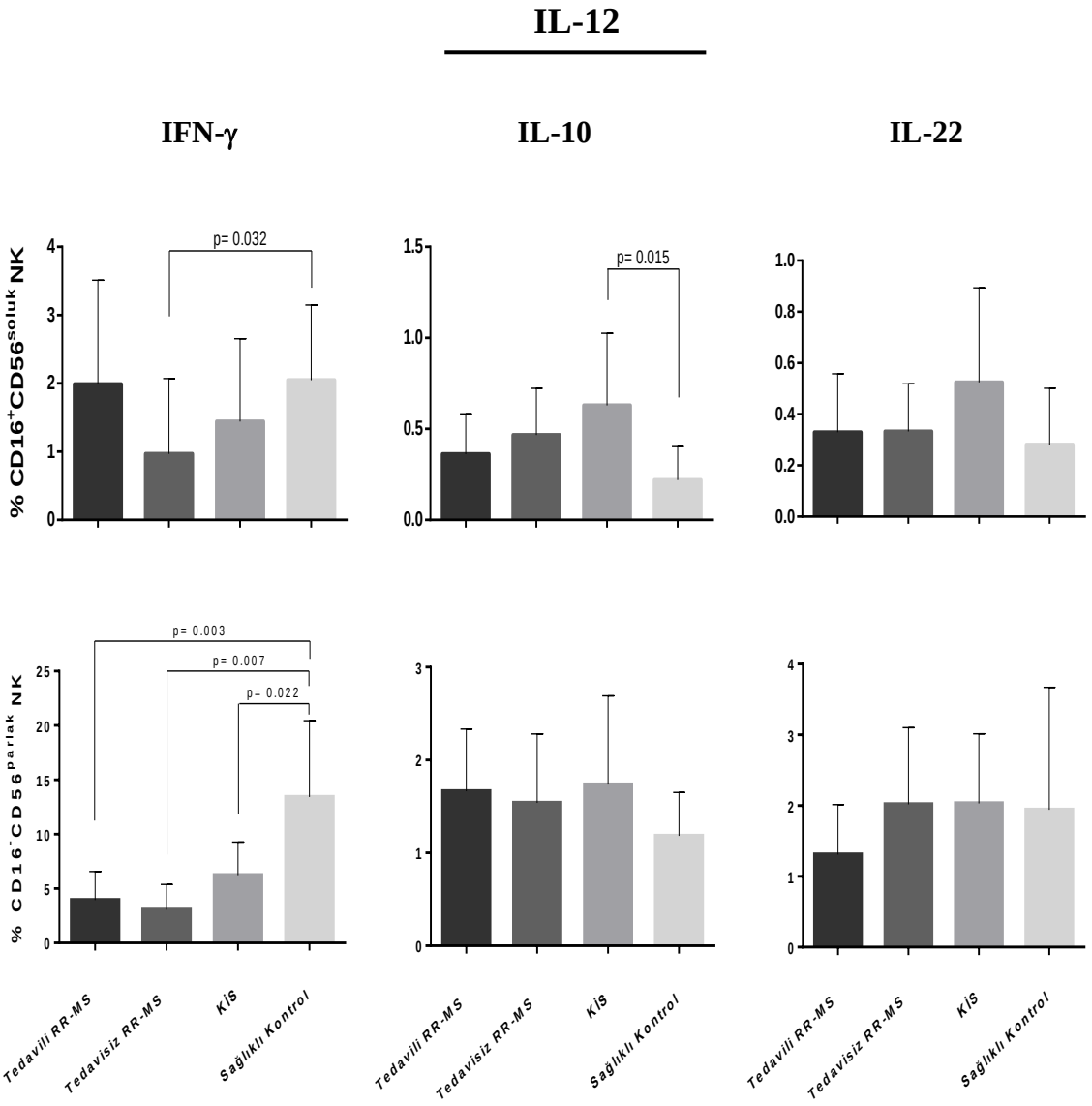
Şekil 4-7: IL-2 uyarımına yanıt olarak $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre içi sitokin seviyeleri

IL-4 uyarımına yanıtta, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, tedavili ve tedavisiz RR-MS ve KİS hastalarında $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre IL-22 miktarı (p=0.027, p=0.013, p=0.004; sırasıyla) ile tedavili RR-MS ve KİS hasta $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre IL-10 seviyeleri anlamlı derecede artış göstermiştir (p=0.008, p=0.007; sırasıyla) (Şekil 4-8).

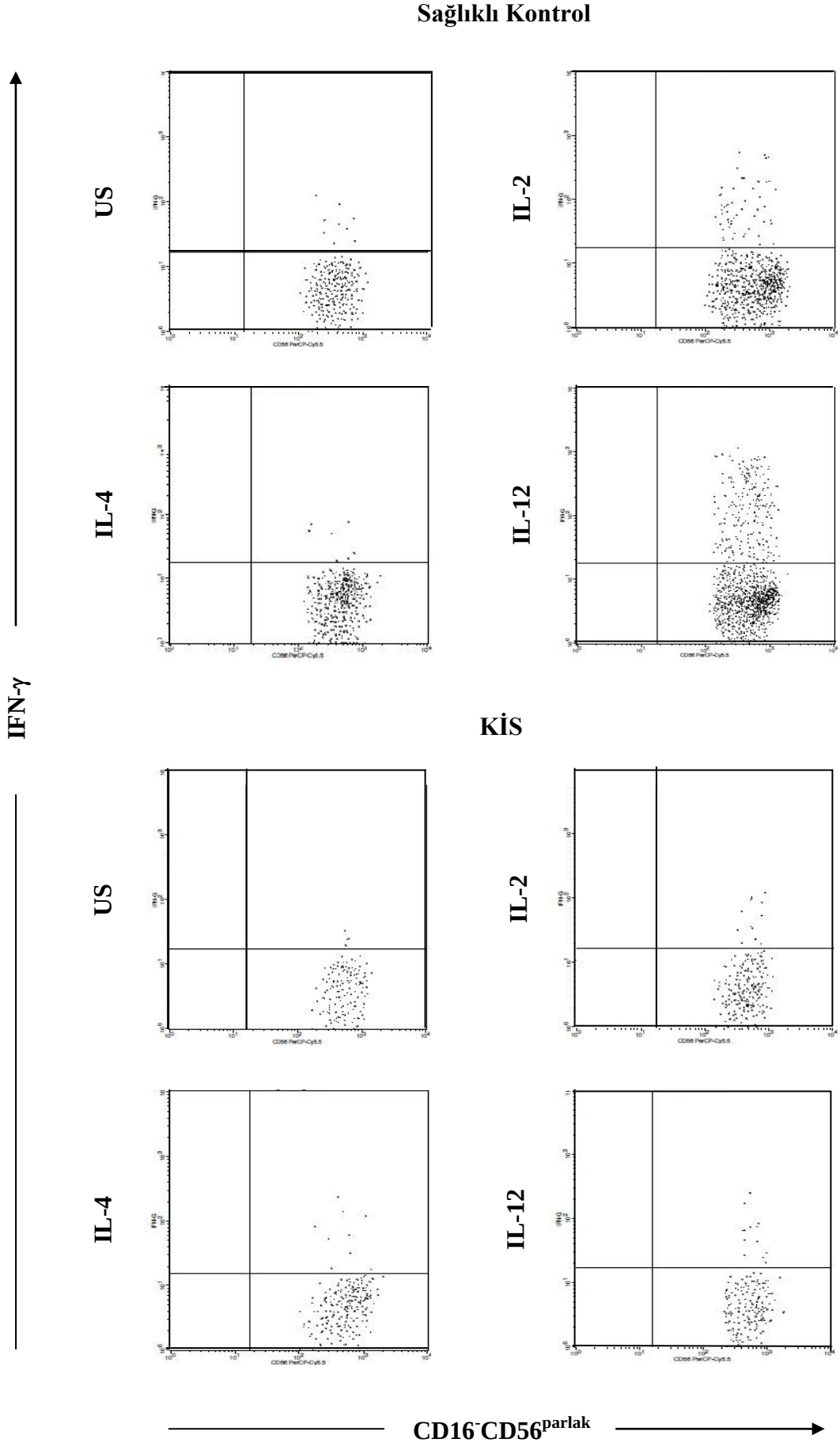


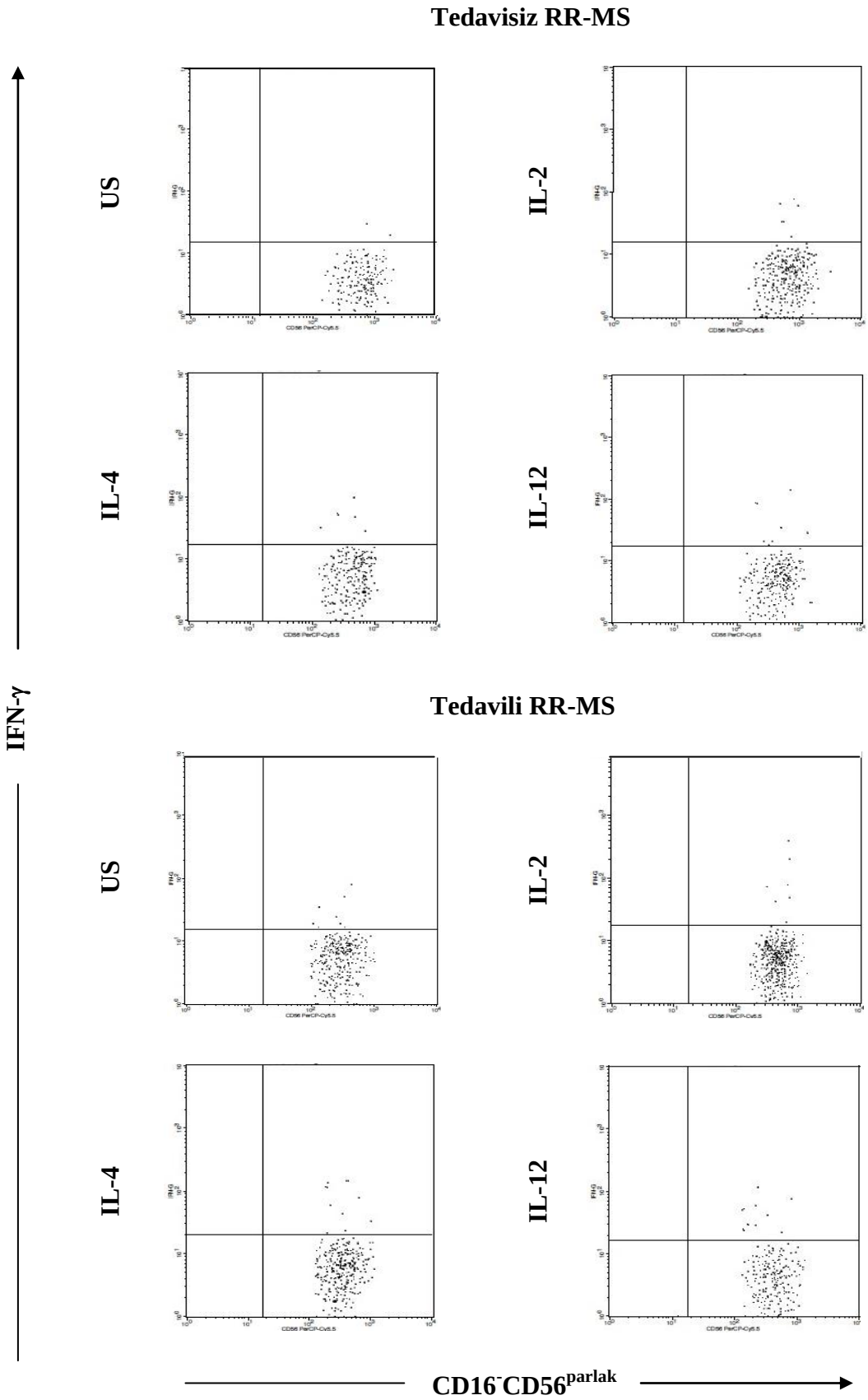
Şekil 4-8: IL-4 uyarımına yanıtta $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre IL-10 ve IL-22 üretimi

IL-12 ile uyarımı sonucunda $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IFN-γ içeriği sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, tedavili ve tedavisiz RR-MS ile KİS hastalarında anlamlı derecede düşüş göstermiştir (p=0.003, p=0.007, p=0.022; sırasıyla). Tedavisiz RR-MS hasta grubunda ayrıca $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre IFN-γ içeriği ve KİS hasta CD16+$CD56^{soluk}$ hücre IL-10 seviyeleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0.032, p=0.015; sırasıyla) (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: IL-12 uyarımına yanıt olarak IFN-γ, IL-10 ve IL-22 düzeyleri


Sağlıklı Kontrol
US
IL-2
IL-4
IL-12
KİS
US
IL-2
IL-4
IL-12
IFN-γ
CD16-CD56parlak

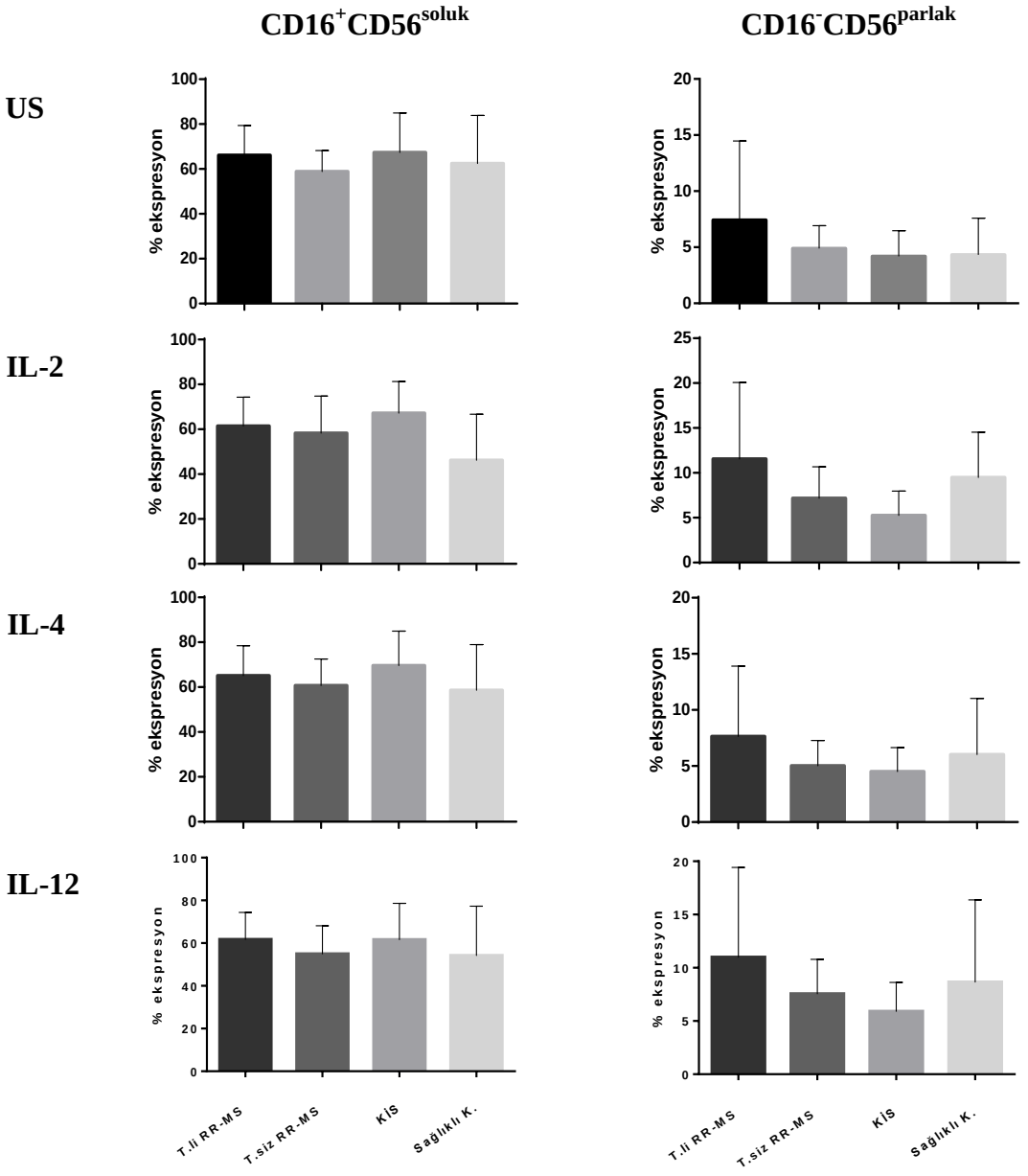


Şekil 4-10: $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre gruplarında 24. saat IFN-γ düzeyleri

4.4. 72. Saat Kültür Sonrasında NK Hücre Alt Grupları

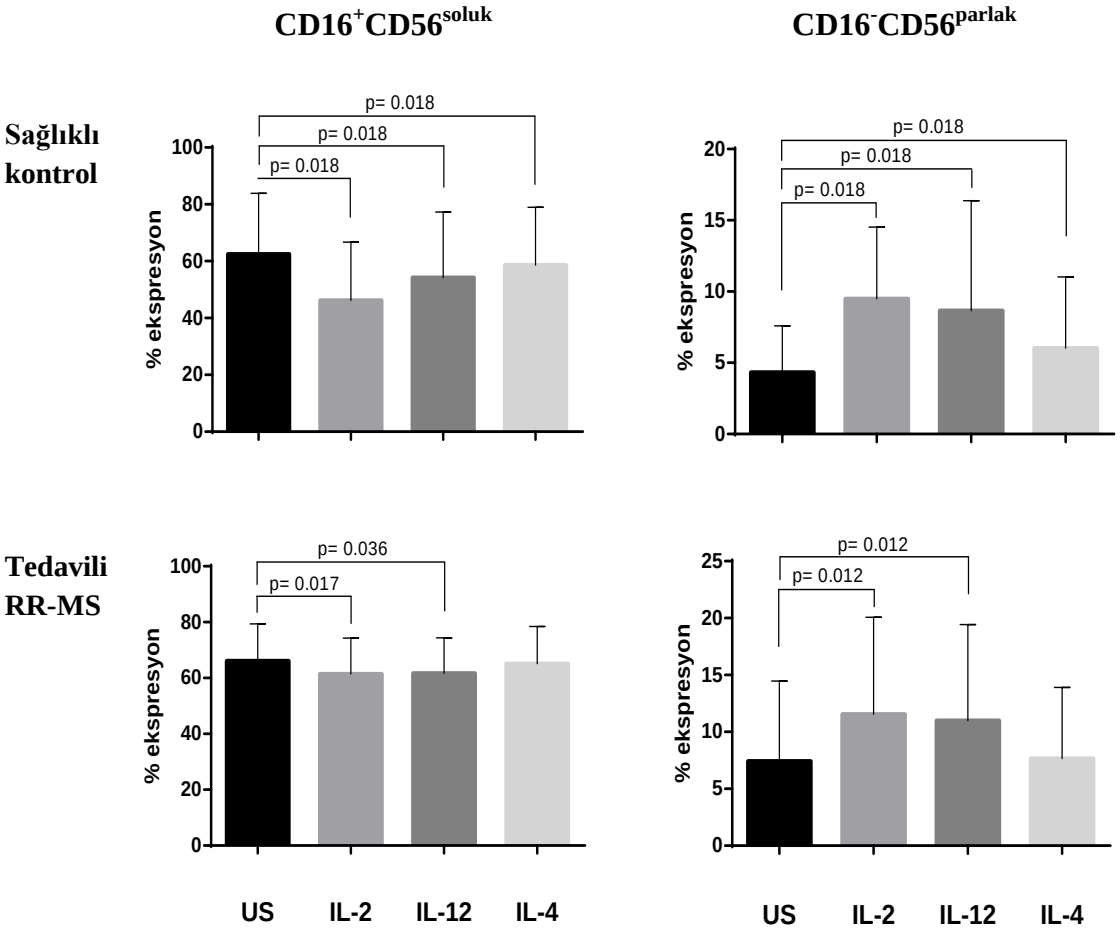
IL-2, IL-4 ve IL-12 ile uyarılan ve uyarılmadan kültüre alınan PKMH'lerin, 72 saat *in vitro* kültürünü takiben hücre yüzey CD3, CD16 ve CD56 ekspresyonları saptandığında, hasta grupları ve sağlıklı kontroller arasında $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre alt grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Şekil 4-10).

Sağlıklı kontrollerde, uyarımsız hücrelerle karşılaştırıldığında IL-2, IL-4 ve IL-12 uyarımına bağlı $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranlarında anlamlı artış saptanmıştır (p=0.018, p=0.018, p=0.018, p=0.018, p=0.018, p=0.018; sırasıyla) (Şekil 4-11).



Şekil 4-10: 72. saat $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD3^{-}CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranları

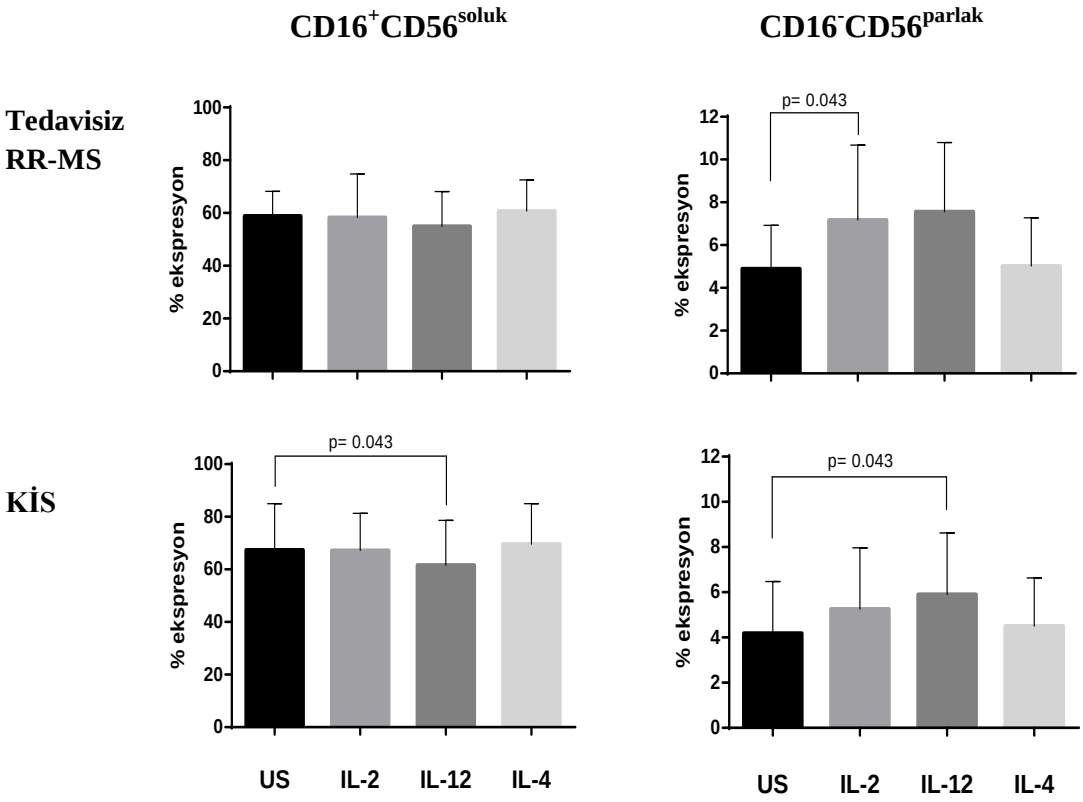
Tedavili RR-MS hastalarında IL-2 ve IL-12 uyarımı sonucunda hem $CD16^{+}CD56^{soluk}$ hem de $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre alt grubunda anlamlı derecede artış görülmüştür (p= 0.017, p= 0.036, p= 0.012, p= 0.012; sırasıyla) (Şekil 4-12).



Şekil 4-11: 72 saat kültür sonrası sağlıklı ve hasta gruplarında farklı sitokin uyarılarına yanıt olarak $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre alt grup oranları

Uyarımsız grup ile karşılaştırıldığında, tedavisiz RR-MS hastalarında IL-2 uyarımına yanıtta $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranında anlamlı artış gözlenmiştir (p=0.043) (Şekil 4-13).

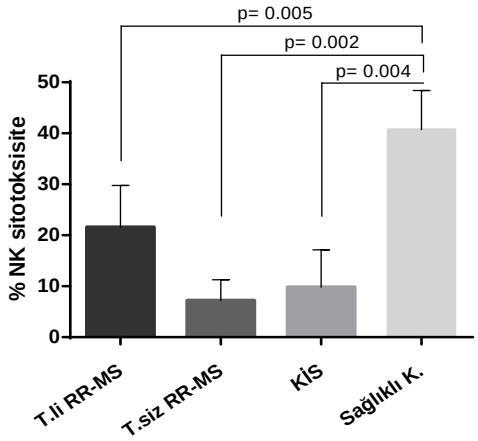
KİS hastalarında ise yalnızca IL-12 uyarımına yanıt olarak $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerinde anlamlı derecede azalma, $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücrelerinde ise anlamlı derecede artış saptanmıştır (p=0.043, p=0.043; sırasıyla) (Şekil 4-13).



Şekil 4-12: 72 saat uyarımlı ve uyarımsız kültür sonrasında tedavisiz RR-MS ve KİS hasta $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranları

4.5. NK Hücre Sitotoksik Aktivitesi

NK hücre sitotoksik aktivitesi, K562 eritromiyeloid lösemi hücre serisi ile flow sitometrik olarak saptanmıştır. Sağlıklı hasta grupları ile karşılaştırıldığında, tüm hasta gruplarında NK hücre sitotoksik aktivitesinin anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır (p=0.002, p=0.004, p=0.005; sırasıyla) (Şekil 4-14).

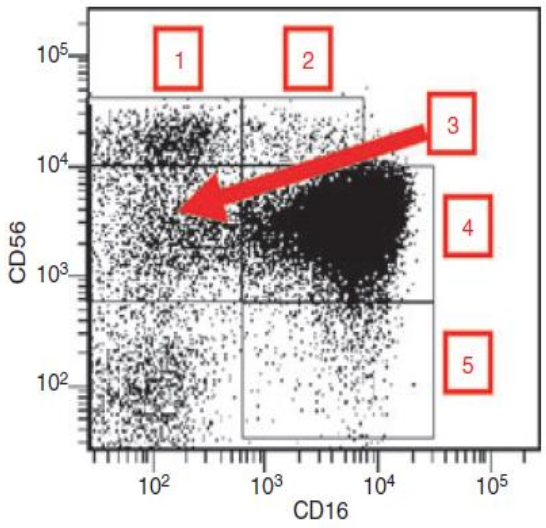


Şekil 4-13: Hasta ve sağlıklı kontrollerde NK hücre sitotoksik aktivitesi

5. TARTIŞMA

Doğal immünitenin temel elemanlarından biri olan NK hücreleri farklı morfolojik, fenotipik ve fonksiyonel özelliklere sahip hücrelerdir. İmmün sistemdeki diğer hücrelerle ilişkide düzenleyici fonksiyon gösteren NK hücreleri, antikor-bağımlı olarak veya doğrudan hedef hücre üzerine sitolitik etki gösterebilme yeteneğindedirler [115].

NK hücreleri CD16 ve CD56 antijenlerinin hücre yüzeyinde ekspresyonlarına bağlı olarak beş farklı alt gruba ayrılmakla birlikte, sağlıklı insanlarda baskın olarak bulunan ve fonksiyonel özellikleri bilinen $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ hücreler olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir (Şekil 5-1). $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri yüksekken, $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücreleri ise sitokin salınımı aracılığıyla enflamasyonda rol oynayan grubu oluşturmaktadırlar. Doğal immün yanıttaki rolünü saptamak amacıyla, çalışmalarda genellikle bu iki NK hücre alt grubunun fenotipik özellikleri ve fonksiyonları incelenmektedir [116].

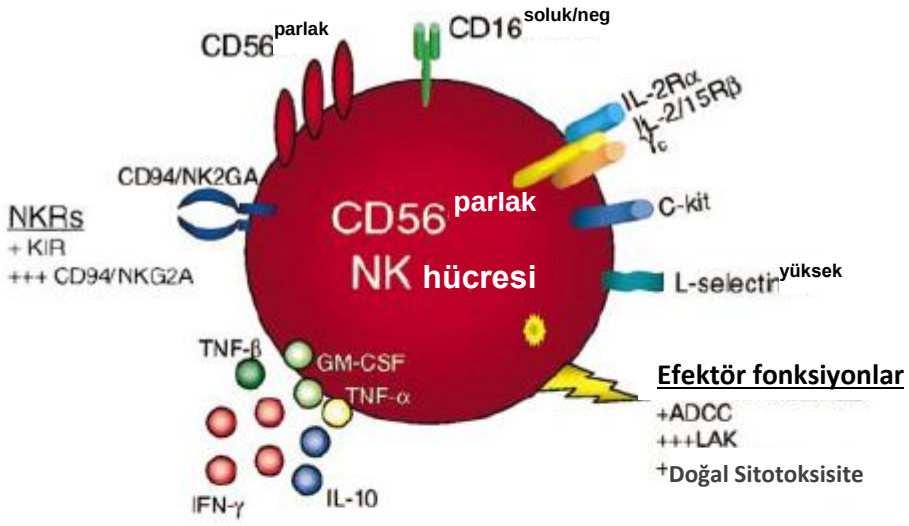


Şekil 5-1: CD56 ekspresyonuna göre NK hücre alt grupları.

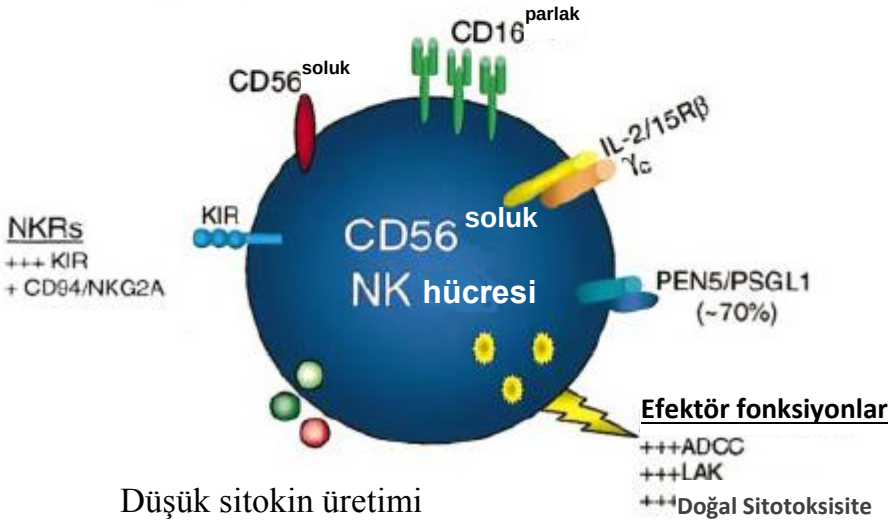
1. $CD16^{-}CD56^{parlak}$ 2. CD16solukCD56parlak, 3. CD16-CD56soluk, 4. CD16+CD56soluk, 5. CD16+CD56- [116]

$CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerinin öncülleri olduğu öne sürülen $CD56^{parlak}$ NK hücreleri tercihen sekonder lenfoid dokulara göç ederken, $CD56^{soluk}$ NK hücreleri akut

enflamatuvar alanlara yönelmektedir. CD56^{parlak} NK hücreleri yüksek afiniteli IL-2 reseptörü taşımakta ve bu sebeple çok düşük miktarlardaki IL-2'ye dahi yanıt olarak çoğalma yeteneğine sahip olmakta iken, CD56^{soluk} NK hücreleri orta afiniteli IL-2 reseptörü taşımakta ve yüksek miktarda IL-2 uyarımına yanıt olarak zayıf bir çoğalma göstermektedirler. CD56^{parlak} NK hücrelerinin uyarana bağlı olarak ürettikleri temel sitokinler IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, IL-10 ve IL-13'tür. CD56^{soluk} NK hücreleri ise sitokin üretiminden çok sitotoksik yanıtlardan sorumlu hücrelerdir (Şekil 5-2).



Yüksek sitokin üretimi



Düşük sitokin üretimi

Şekil 5-2: CD56^{soluk} ve CD56^{parlak} NK hücreleri farklı fenotipik özellikler ve immün fonksiyonlara sahiptirler [73]

MS'li hastaların demiyelinizan lezyonlarında NK hücrelerinin bulunduğu bilinmekle birlikte, NK hücrelerinin MS patogenezinde rol oynadığına dair çalışmalar çelişkili bulgular ortaya koymaktadır. Remisyon fazındaki MS hastalarında atak fazındakilere kıyasla "NK2" hücre alt grubu oranında artış gözlenmiştir. Bu durum, NK2 hücre altgrubunun MS'te remisyon fazının devamında yararlı bir rolü olabileceğini düşündürmektedir [96]. Aynı NK hücre alt grubunun, antijen spesifik öze-duyarlı T hücre aktivasyonunu negatif düzenlediği gösterilmiştir [9]. Bilindiği gibi, *in vitro* koşullarda IL-12 varlığında kültüre edilen NK hücreleri (NK1) IFN-γ ve IL-10 üretirken, IL-4 ile uyarılan NK hücreleri (NK2) IL-5 ve IL-13 üretmektedirler (65-66). IL-2 ise, klasik NK hücre bölünmesini uyaran bir sitokin olmanın yanısıra, yüksek afiniteli IL-2R aracılığıyla $CD56^{parlak}$ NK hücrelerini IFN-γ üretimi için stimüle etmektedir [6].

Farklı çalışmalar farklı immüno-modülatör terapiler sonucunda MS hastalarında tedavi sürecinde $CD56^{parlak}$ NK hücrelerindeki artışın hastalığın patogenezinde faydalı olabileceğini göstermektedir. $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücrelerinin MS'te enflamasyondan sorumlu olduğu ve NK hücreleri üzerine etkisi olan MS ilaçlarının periferik kanda $CD16^{-}CD56^{parlak}$ olgunlaşmamış NK hücre popülasyonunu arttırdığı yönündeki bulguların yanısıra, NK hücre alt gruplarının oranlarından çok fonksiyonlarındaki bozukluğun hastalık patogenezinde etkili olduğunu ileri süren çalışmalar da mevcuttur [10].

Çalışmamızda, tedavisiz ve en az altı aydır tedavi görmekte olan RR-MS ile KİS hastalarının periferik kanlarındaki $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, hasta ve sağlıklılar arasında anlamlı farklılık saptanmaması, diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla uyumluluk göstermiştir.

Periferik kan NK hücre oranlarına paralel şekilde hasta gruplarına ait PKMH'ler 24 ve 72 saat süreyle IL-2, IL-4 ve IL-12 sitokinleriyle kültüre edildiğinde de hasta gruplarının $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre oranlarında sağlıklılara göre anlamlı farklılık görülmemiştir. Buna karşılık olarak, 24 saat *in vitro* kültür sonrası hasta gruplarının $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücrelerindeki sitokin oranlarının incelendiği çalışmamızda, uyarımsız koşullarda tedavisiz RR-MS hastalarının $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücrelerindeki IFN-γ miktarının sağlıklılara göre

azaldığı, IL-10 miktarının ise arttığı gözlenmiştir. IL-12 uyarımına cevaben tedavisiz RR-MS hastalarının $CD16^{-}CD56^{parlak}$ ve $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerinden salınan IFN-γ oranı anlamlı derecede azalma gösterirken, IL-4 uyarımıyla $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerindeki IL-22 oranı sağlıklılara göre anlamlı derecede artmıştır.

Tedavili RR-MS hastaları incelendiğinde, uyarımsız koşullarda $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IL-22 içeriğinin, IL-2 uyarımının ise $CD16^{+}CD56^{soluk}$ ve $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IL-10 seviyelerinin anlamlı derecede arttığı görülmüştür. IL-4 uyarımına yanıtta $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre IL-10 ve IL-22 içeriklerindeki anlamlı artışa karşılık, IL-12 uyarımı $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IFN-γ içeriğinde anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur.

KİS hastalarında uyarımsız koşulda, tedavili RR-MS hastalarına benzer şekilde $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IL-22, IL-2 uyarımına cevaben $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IL-10 ve IL-4 uyarımına yanıtta $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerindeki IL-10 içerikleri sağlıklılara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tedavili ve tedavisiz RR-MS hastalarına benzer şekilde IL-12 uyarımına yanıt olarak KİS hastalarının $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IFN-γ üretimlerinin anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir.

Tedavili-tedavisiz RR-MS ve KİS hastaları karşılaştırıldığında, uyarım yapılmayan koşulda tedavisiz RR-MS hastalarının $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IFN-γ, IL-2 uyarımlı $CD16^{-}CD56^{parlak}$ IL-22 ve IL-4 uyarımlı $CD16^{+}CD56^{soluk}$ IL-22 içeriğinin, KİS hastalarına göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Farklı sitokin uyarımlarına yanıt olarak tedavili ve tedavisiz RR-MS hastaları arasında anlamlı farklılık saptanmaması ise farklı NK hücre alt gruplarının tedaviden etkilenmediğini düşündürmektedir.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, hasta gruplarının tamamında IL-4 uyarımına yanıtta $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücre IL-22 seviyelerinde anlamlı derecede artış, $CD16^{-}CD56^{parlak}$ NK hücre IFN-γ miktarlarında ise anlamlı derecede azalma olduğu göze çarpmaktadır. Ayrıca farklı uyaranlara yanıt olarak hasta gruplarında IL-10 üretimindeki artış dikkati çeken diğer bir noktadır.

IL-10'un düşük üretiminin MS için bir risk faktörü olabileceği ve MS hastalarının IL-10 üreten T hücre oranının sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğu

[117], IL-10'u aşırı eksprese eden farelerin EAE indüklenmesine yüksek direnç gösterdiği ileri sürülmektedir [118-119]. Aynı zamanda, omurilikte artmış IL-10 seviyelerinin EAE gerilemesiyle ilişkili olduğu ve eksojen IL-10'nun, doğrudan MSS'yi hedeflemesi durumunda EAE'yi iyileştirdiği düşünülmektedir [120]. Benzer şekilde, insanlarda IL-10'un düşük üretimi, MS için bir risk faktörüdür. Deneysel bulgular IL-10'un EAE ve MS'te hastalığın baskılanmasında önemli bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Çalışmamızda farklı hasta gruplarında saptanan yüksek IL-10 üretiminin, hastalık sürecinde ortaya çıkan ve hastalığın kontrol altına alınmasında oluşan doğal immün sistemin bir yanıtı olarak düşünülebilir.

NK hücrelerinin, IL-12 ve IL-18 veya IL-23'e yanıt olarak IL-22 ürettiği bilinmektedir. IL-22'nin, MS de dahil olmak üzere çok sayıda otoimmün hastalığın gelişim ve patogenezinde görev aldığı kanıtlanmıştır. IL-22 geni "knockout" olan veya IL-22 proteinlerinin inhibe edildiği murin modellerde, otoimmün hastalıklarda iyileşme gözlenmiş ve IL-22RA2'nin MS için bir risk geni olabileceği ileri sürülmüştür [121]. Başka bir çalışmada ise IL-22'nin Th17 hücreler tarafından IL-23 bağımlı olarak üretildiği, ancak EAE gelişimi için gerekli olmadığı ileri sürülmüştür [122]. Farklı çalışmalardan elde edilen bu çelişkili sonuçlardan dolayı IL-22'nin MS'teki rolünü açıklamak için daha detaylı araştırmalara gereksinim duyulmaktadır [111]. Aynı zamanda, akut EAE'nin farklı fazlarında IL-10, IL-21 ve IL-22 ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada, remisyon fazının başlangıcında IL-22 seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Bu dikkat çekici sonuç, bu sitokinin indükleyici olduğu ve atak fazı sırasında meydana gelen enflamatuvar olayları yönettiği, böylece IL-22 üretimindeki bir azalmanın enflamasyonu durdurmaya ve iyileşmenin başlamasına neden olabileceğini düşündürmektedir [123]. Çalışmamızda sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında hasta gruplarında saptanan yüksek IL-22 üretimi, IL-22'nin hastalık gelişiminde rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir.

NK hücrelerinin, IFN-γ üretimi aracılığıyla EAE'de patojenik Th1 ve Th17 efektör yanıtlarının gelişimini inhibe ettiği bilinmektedir [124]. Hasta gruplarının tümünde sağlıklı gruplara oranla IFN-γ üretiminde azalma, hastalık gelişiminde IFN-γ üretimindeki yetersizliğin önemli bir rolü olduğu ve MS hastalarında NK hücre fonksiyonlarındaki bozukluğa bağlı olarak IFN-γ üretiminin düştüğü görüşünü desteklemektedir.

$CD56^{parlak}$ NK hücrelerinin otoimmün yanıtı düzenlemedeki rolleri, sitokin salınım şekilleri tarafından belirlenmekle birlikte, sitotoksik özellikleri de bu düzenlemede etkilidir [73]. MS hastalarının $CD16^{+}CD56^{soluk}$ NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerinde azalma olduğunu ileri süren çalışmalar bulunmakla birlikte, NK hücre sitolitik aktivitesinin MS patogenezinde otoimmün yanıtları önlemedeki rolü hakkında bilgiler yetersizdir. Çalışmamızda, sağlıklılarla karşılaştırıldığında hasta gruplarının tümünde saptanan düşük sitotoksik yanıt, MS hastalarında NK hücre sitotoksik aktivitesinde bozukluk olduğunu düşündürmektedir.

Sonuçlarımız, MS hastalık patogenezinde NK hücre alt gruplarının oranlarından çok fonksiyonel bozukluklarının hastalık patogenezinde etkili olabileceğini desteklemektedir. KİS hastalarında da RR-MS hastalarının bulgularına benzer sonuçlar elde edilmesi, KİS'in MS'e benzer bir mekanizmayla meydana gelen ve MS'in öncül formu olan bir otoimmün hastalık olduğu fikrini doğrulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Gandhi, R., A. Laroni, and H.L. Weiner, Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2010. **221**(1-2): p. 7-14.
2. Goverman, J.M., Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev*, 2011. **241**(1): p. 228-40.
3. Turan, O.F., Klinik izole sendromlar. *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2009. **2**(2): p. 15-21.
4. Deniz, G., NK ve NKT hücreler. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007. **3**(43): p. 18-25.
5. Deniz, G., M. Akdis, E. Aktas, K. Blaser, and C.A. Akdis, Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(3): p. 879-84.
6. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, G.J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, and M.A. Caligiuri, CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
7. Chanvillard, C., R.F. Jacolik, C. Infante-Duarte, and R.C. Nayak, The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 63.
8. Peritt, D., S. Robertson, G. Gri, L. Showe, M. Aste-Amezaga, and G. Trinchieri, Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 5821-4.
9. Takahashi, K., T. Aranami, M. Endoh, S. Miyake, and T. Yamamura, The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, 2004. **127**(Pt 9): p. 1917-27.
10. Lunemann, A., B. Tackenberg, T. DeAngelis, R.B. da Silva, B. Messmer, L.D. Vanoaica, A. Miller, B. Apatoff, F.D. Lublin, J.D. Lunemann, and C. Munz, Impaired IFN-gamma production and proliferation of NK cells in multiple sclerosis. *Int Immunol*, 2011. **23**(2): p. 139-48.
11. Nylander, A. and D.A. Hafler, Multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 2012. **122**(4): p. 1180-8.
12. Mavioğlu, H., Multipl Skleroz hastalığı ve yaşam kalitesi. *Sağlıkta Birikim*, 2006. **1**(2): p. 77-82.
13. Karakoc-Kumsar, A., N. Olgun, and Ö.K. Korel, Multiple Sklerozlu Hastada Yorgunluğun Değerlendirilmesi. *Maltepe Üniversitesi Hemşirelik Bilim Ve Sanatı Dergisi*, 2009. **2**(2): p. 100-103.
14. Aktas, O., O. Ullrich, C. Infante-Duarte, R. Nitsch, and F. Zipp, Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurol*, 2007. **64**(2): p. 185-9.
15. Akman-Demir, G., Multipl sklerozda tanı süreci. *İstanbul Tıp Fakültesi Hasta Okulu Yayınları : Multipl Skleroz Hasta Okulu*, 2008.

16. Wynia, K., B. Middel, J.P. van Dijk, J.H. De Keyser, and S.A. Reijneveld, The impact of disabilities on quality of life in people with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2008. **14**(7): p. 972-80.

17. Luessi, F., V. Siffrin, and F. Zipp, Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies. *Expert Rev Neurother*, 2012. **12**(9): p. 1061-76; quiz 1077.

18. Eraksoy, M., Multiple Skleroz İle Yaşamı Nasıl Kolaylaştırırız? *İstanbul Tıp Fakültesi Hasta Okulu Yayınları: I*, 2005.

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

20. CDC, Multiple sclerosis fact sheet. *CDC medical records on VoxHealth* 2013.

21. Miller, D., F. Barkhof, X. Montalban, A. Thompson, and M. Filippi, Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(5): p. 281-8.

22. Phadke, J.G., Survival pattern and cause of death in patients with multiple sclerosis: results from an epidemiological survey in north east Scotland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1987. **50**(5): p. 523-31.

23. Alonso, A. and M.A. Hernan, Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*, 2008. **71**(2): p. 129-35.

24. Zivadinov, R., L. Iona, L. Monti-Bragadin, A. Bosco, A. Jurjevic, C. Taus, G. Cazzato, and M. Zorzon, The use of standardized incidence and prevalence rates in epidemiological studies on multiple sclerosis. A meta-analysis study. *Neuroepidemiology*, 2003. **22**(1): p. 65-74.

25. WHO, Atlas: Multiple sclerosis in the world. 2008: p. 1-56.

26. Kızıltaş-Tokmak, G., Multipl Skleroz hastalarında beyinsapı refleksleri ile manyetik rezonans görüntüleme arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. *Uzmanlık tezi*, 2008.

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

28. Dyment, D.A., G.C. Ebers, and A.D. Sadovnick, Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2004. **3**(2): p. 104-10.

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

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

31. Bennett, J.L. and O. Stuve, Update on inflammation, neurodegeneration, and immunoregulation in multiple sclerosis: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol*, 2009. **32**(3): p. 121-32.

32. Inglese, M., Multiple sclerosis: new insights and trends. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2006. **27**(5): p. 954-7.

33. Consortium, T.I.M.S.G., Risk alleles for multiple sclerosis identified by genomwide study. *The New England Journal of Medicine*, 2007. **357**(9): p. 851-862.

34. Ascherio, A. and K. Munger, Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Semin Neurol*, 2008. **28**(1): p. 17-28.

35. Koch-Henriksen, N. and K. Hyllested, Epidemiology of multiple sclerosis: incidence and prevalence rates in Denmark 1948-64 based on the Danish Multiple Sclerosis Registry. *Acta Neurol Scand*, 1988. **78**(5): p. 369-80.

36. Hernan, M.A., M.J. Olek, and A. Ascherio, Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women. *Neurology*, 1999. **53**(8): p. 1711-8.

37. Marrie, R.A., Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*, 2004. **3**(12): p. 709-18.

38. Acheson, E.D., C.A. Bachrach, and F.M. Wright, Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1960. **35**(147): p. 132-47.

39. Sutherland, J.M., J.H. Tyrer, and M.J. Eadie, The prevalence of multiple sclerosis in Australia. *Brain*, 1962. **85**: p. 149-64.

40. Kulie, T., A. Groff, J. Redmer, J. Hounshell, and S. Schrager, Vitamin D: an evidence-based review. *J Am Board Fam Med*, 2009. **22**(6): p. 698-706.

41. Li, J., C. Johansen, H. Bronnum-Hansen, E. Stenager, N. Koch-Henriksen, and J. Olsen, The risk of multiple sclerosis in bereaved parents: A nationwide cohort study in Denmark. *Neurology*, 2004. **62**(5): p. 726-9.

42. Welsh, C.J., A.J. Steelman, W. Mi, C.R. Young, R. Storts, T.H. Welsh, Jr., and M.W. Meagher, Neuroimmune interactions in a model of multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1153**: p. 209-19.

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

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

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

46. Serafini, B., B. Rosicarelli, D. Franciotta, R. Magliozzi, R. Reynolds, P. Cinque, L. Andreoni, P. Trivedi, M. Salvetti, A. Faggioni, and F. Aloisi, Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 2899-912.

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

48. Multiple-sclerosis, Wikipedia. *http://en.wikipedia.org/wiki/Multiple_sclerosis*, 2013.

49. Pathophysiology-of-multiple-sclerosis,Wikipedia. *http://en.wikipedia.org/wiki/Pathophysiology_of_multiple_sclerosis*, 2013.

50. Kurtzke, J.F., Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*, 1993. **6**(4): p. 382-427.

51. Gilden, D.H., Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(3): p. 195-202.

52. Polman, C.H., S.C. Reingold, G. Edan, M. Filippi, H.P. Hartung, L. Kappos, F.D. Lublin, L.M. Metz, H.F. McFarland, P.W. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A.J. Thompson, B.G. Weinshenker, and J.S. Wolinsky, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*, 2005. **58**(6): p. 840-6.

53. Trojano, M. and D. Paolicelli, The differential diagnosis of multiple sclerosis: classification and clinical features of relapsing and progressive neurological syndromes. *Neurol Sci*, 2001. **22 Suppl 2**: p. S98-102.

54. Poser, C.M. and V.V. Brinar, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. *Clin Neurol Neurosurg*, 2004. **106**(3): p. 147-58.

55. McDonald, W.I., A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H.P. Hartung, F.D. Lublin, H.F. McFarland, D.W. Paty, C.H. Polman, S.C. Reingold, M. Sandberg-Wollheim, W. Sibley, A. Thompson, S. van den Noort, B.Y. Weinshenker, and J.S. Wolinsky, Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2001. **50**(1): p. 121-7.

56. Rashid, W. and D.H. Miller, Recent advances in neuroimaging of multiple sclerosis. *Semin Neurol*, 2008. **28**(1): p. 46-55.

57. Gronseth, G.S. and E.J. Ashman, Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 2000. **54**(9): p. 1720-5.

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

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

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

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

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

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

64. McDonald, W.I. and T.A. Sears, Focal experimental demyelination in the central nervous system. *Brain*, 1970. **93**(3): p. 575-82.

65. Robertson, M.J. and J. Ritz, Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 1990. **76**(12): p. 2421-38.

66. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.

67. Aktas, E., G. Erten, U.C. Kucuksezer, and G. Deniz, Natural killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, 2009. **5**(4): p. 405-20.

68. Steinman, L., Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 762-4.

69. Strowig, T., F. Brilot, and C. Munz, Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J Immunol*, 2008. **180**(12): p. 7785-91.

70. Ferlazzo, G., D. Thomas, S.L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W.A. Muller, A. Moretta, and C. Munz, The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*, 2004. **172**(3): p. 1455-62.

71. Dalbeth, N., R. Gundle, R.J. Davies, Y.C. Lee, A.J. McMichael, and M.F. Callan, CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 6418-26.

72. Lunemann, J.D. and C. Munz, Do natural killer cells accelerate or prevent autoimmunity in multiple sclerosis? *Brain*, 2008. **131**(Pt 7): p. 1681-3.

73. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, and M.A. Caligiuri, Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3146-51.

74. Matsumoto, Y., K. Kohyama, Y. Aikawa, T. Shin, Y. Kawazoe, Y. Suzuki, and N. Tanuma, Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(5): p. 1681-8.

75. Zhang, B., T. Yamamura, T. Kondo, M. Fujiwara, and T. Tabira, Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med*, 1997. **186**(10): p. 1677-87.

76. Morandi, B., P. Bramanti, I. Bonaccorsi, E. Montalto, D. Oliveri, G. Pezzino, M. Navarra, and G. Ferlazzo, Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol Res*, 2008. **57**(1): p. 1-5.

77. Constantinescu, C.S., N. Farooqi, K. O'Brien, and B. Gran, Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(4): p. 1079-106.

78. Xu, W., G. Fazekas, H. Hara, and T. Tabira, Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 2005. **163**(1-2): p. 24-30.

79. Galazka, G., A. Jurewicz, W. Orlowski, M. Stasiolek, C.F. Brosnan, C.S. Raine, and K. Selmaj, EAE tolerance induction with Hsp70-peptide complexes depends on H60 and NKG2D activity. *J Immunol*, 2007. **179**(7): p. 4503-12.

80. Huang, D., F.D. Shi, S. Jung, G.C. Pien, J. Wang, T.P. Salazar-Mather, T.T. He, J.T. Weaver, H.G. Ljunggren, C.A. Biron, D.R. Littman, and R.M. Ransohoff, The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J*, 2006. **20**(7): p. 896-905.

81. Winkler-Pickett, R., H.A. Young, J.M. Cherry, J. Diehl, J. Wine, T. Back, W.E. Bere, A.T. Mason, and J.R. Ortaldo, In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4495-506.

82. Vollmer, T.L., R. Liu, M. Price, S. Rhodes, A. La Cava, and F.D. Shi, Differential effects of IL-21 during initiation and progression of autoimmunity against neuroantigen. *J Immunol*, 2005. **174**(5): p. 2696-701.

83. Hammarberg, H., O. Lidman, C. Lundberg, S.Y. Eltayeb, A.W. Gielen, S. Muhallab, A. Svenningsson, H. Linda, P.H. van Der Meide, S. Cullheim, T. Olsson, and F. Piehl, Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci*, 2000. **20**(14): p. 5283-91.

84. Gilmour, K.C., H. Fujii, T. Cranston, E.G. Davies, C. Kinnon, and H.B. Gaspar, Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood*, 2001. **98**(3): p. 877-9.

85. Moins-Teisserenc, H.T., S.D. Gadola, M. Cella, P.R. Dunbar, A. Exley, N. Blake, C. Baykal, J. Lambert, P. Bigliardi, M. Willemsen, M. Jones, S. Buechner, M. Colonna, W.L. Gross, and V. Cerundolo, Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet*, 1999. **354**(9190): p. 1598-603.

86. Kerschensteiner, M., C. Stadelmann, G. Dechant, H. Wekerle, and R. Hohlfeld, Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol*, 2003. **53**(3): p. 292-304.

87. Saikali, P., J.P. Antel, J. Newcombe, Z. Chen, M. Freedman, M. Blain, R. Cayrol, A. Prat, J.A. Hall, and N. Arbour, NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci*, 2007. **27**(5): p. 1220-8.

88. Darlington, P.J., C. Podjaski, K.E. Horn, S. Costantino, M. Blain, P. Saikali, Z. Chen, K.A. Baker, J. Newcombe, M. Freedman, P.W. Wiseman, A. Bar-Or, T.E. Kennedy, and J.P. Antel, Innate immune-mediated neuronal injury consequent to loss of astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008. **67**(6): p. 590-9.

89. Drexler, H.G., Academic Press. *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook*, 2000. San Diego.

90. Benczur, M., G.G. Petranyl, G. Palffy, M. Varga, M. Talas, B. Kotsy, I. Foldes, and S.R. Hollan, Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. *Clin Exp Immunol*, 1980. **39**(3): p. 657-62.

91. Merrill, J., M. Jondal, J. Seeley, M. Ullberg, and A. Siden, Decreased NK killing in patients with multiple sclerosis: an analysis on the level of the single effector cell in peripheral blood and cerebrospinal fluid in relation to the activity in the disease. *Clin Exp Immunol*, 1982. **47**(2): p. 419-30.

92. Neighbour, P.A., A.I. Grayzel, and A.E. Miller, Endogenous and interferon-augmented natural killer cell activity of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Studies of patients with multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 1982. **49**(1): p. 11-21.

93. Oger, J., L.F. Kastrukoff, D.K. Li, and D.W. Paty, Multiple sclerosis: in relapsing patients, immune functions vary with disease activity as assessed by MRI. *Neurology*, 1988. **38**(11): p. 1739-44.

94. Kastrukoff, L.F., N.G. Morgan, D. Zecchini, R. White, A.J. Petkau, J. Satoh, and D.W. Paty, A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 1998. **86**(2): p. 123-33.

95. Kastrukoff, L.F., A. Lau, R. Wee, D. Zecchini, R. White, and D.W. Paty, Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. *J Neuroimmunol*, 2003. **145**(1-2): p. 103-14.

96. Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, K. Terao, M. Hatakenaka, S. Hashimoto, and T. Yamamura, Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 2001. **107**(5): p. R23-9.

97. Laroni, A., R. Gandhi, V. Beynon, and H.L. Weiner, IL-27 imparts immunoregulatory function to human NK cell subsets. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e26173.

98. Dinarello, C.A., Proinflammatory cytokines. *Chest*, 2000. **118**(2): p. 503-8.

99. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, Cellular and molecular immunology. *USA*, 2012. Elsevier Saunders.

100. Heesen, C., D.C. Mohr, I. Huitinga, F.T. Bergh, J. Gaab, C. Otte, and S.M. Gold, Stress regulation in multiple sclerosis: current issues and concepts. *Mult Scler*, 2007. **13**(2): p. 143-8.

101. Martinelli, V., Trauma, stress and multiple sclerosis. *Neurol Sci*, 2000. **21**(4 Suppl 2): p. S849-52.

102. Baranzini, S.E., Revealing the genetic basis of multiple sclerosis: are we there yet? *Curr Opin Genet Dev*, 2011. **21**(3): p. 317-24.

103. Siegel, J.P., M. Sharon, P.L. Smith, and W.J. Leonard, The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science*, 1987. **238**(4823): p. 75-8.

104. Mingari, M.C., F. Gerosa, G. Carra, R.S. Accolla, A. Moretta, R.H. Zubler, T.A. Waldmann, and L. Moretta, Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature*, 1984. **312**(5995): p. 641-3.

105. Liao, W., J.X. Lin, and W.J. Leonard, Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 2013. **38**(1): p. 13-25.

106. Hershey, G.K., M.F. Friedrich, L.A. Esswein, M.L. Thomas, and T.A. Chatila, The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*, 1997. **337**(24): p. 1720-5.

107. Li, X., J. Mai, A. Virtue, Y. Yin, R. Gong, X. Sha, S. Gutchigian, A. Frisch, I. Hodge, X. Jiang, H. Wang, and X.F. Yang, IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33628.

108. Eskdale, J., D. Kube, H. Tesch, and G. Gallagher, Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*, 1997. **46**(2): p. 120-8.

109. Sarina, B., A. Cortelezzi, C. Cattaneo, M. Pomati, I. Silvestris, M. Di Stefano, D. Lambertenghi-Deliliers, C. Hu, M. Monza, and A.T. Maiolo, In vitro effects of IL-12 and IL-2 on NK cells, cytokine release and clonogenic activity in myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*, 1997. **11**(10): p. 1726-31.

110. Wang, K.S., D.A. Frank, and J. Ritz, Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*, 2000. **95**(10): p. 3183-90.

111. Pan, H.F., X.P. Li, S.G. Zheng, and D.Q. Ye, Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. **24**(1): p. 51-7.

112. Guo, H. and D.J. Topham, Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection. *J Virol*, 2010. **84**(15): p. 7750-9.

113. Zenewicz, L.A. and R.A. Flavell, Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol*, 2011. **23**(3): p. 159-63.

114. Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, J.K. Lennerz, J.M. Doherty, J.C. Mills, and M. Colonna, A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, 2009. **457**(7230): p. 722-5.

115. Aktas, E., U.C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, and G. Deniz, Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*, 2009. **254**(2): p. 149-54.

116. Poli, A., T. Michel, M. Theresine, E. Andres, F. Hentges, and J. Zimmer, CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009. **126**(4): p. 458-65.

117. Vandenbark, A.A., T. Finn, D. Barnes, N. Culbertson, Y.K. Chou, K. Hicks, A. Bakke, M. Mass, R. Whitham, H. Offner, and D. Bourdette, Diminished frequency of interleukin-10-secreting, T-cell receptor peptide-reactive T cells in

multiple sclerosis patients might allow expansion of activated memory T cells bearing the cognate BV gene. *J Neurosci Res*, 2001. **66**(2): p. 171-6.

118. Bettelli, E., M.P. Das, E.D. Howard, H.L. Weiner, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo, IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol*, 1998. **161**(7): p. 3299-306.

119. Cua, D.J., H. Groux, D.R. Hinton, S.A. Stohlman, and R.L. Coffman, Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 1999. **189**(6): p. 1005-10.

120. Croxford, J.L., M. Feldmann, Y. Chernajovsky, and D. Baker, Different therapeutic outcomes in experimental allergic encephalomyelitis dependent upon the mode of delivery of IL-10: a comparison of the effects of protein, adenoviral or retroviral IL-10 delivery into the central nervous system. *J Immunol*, 2001. **166**(6): p. 4124-30.

121. Beyeen, A.D., M.Z. Adzemovic, J. Ockinger, P. Stridh, K. Becanovic, H. Laaksonen, H. Lassmann, R.A. Harris, J. Hillert, L. Alfredsson, E.G. Celius, H.F. Harbo, I. Kockum, M. Jagodic, and T. Olsson, IL-22RA2 associates with multiple sclerosis and macrophage effector mechanisms in experimental neuroinflammation. *J Immunol*, 2010. **185**(11): p. 6883-90.

122. Kreymborg, K., R. Etzensperger, L. Dumoutier, S. Haak, A. Rebollo, T. Buch, F.L. Heppner, J.C. Renauld, and B. Becher, IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2007. **179**(12): p. 8098-104.

123. Almolda, B., M. Costa, M. Montoya, B. Gonzalez, and B. Castellano, Increase in Th17 and T-reg lymphocytes and decrease of IL22 correlate with the recovery phase of acute EAE in rat. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27473.

124. Grajewski, R.S., A.M. Hansen, R.K. Agarwal, M. Kronenberg, S. Sidobre, S.B. Su, P.B. Silver, M. Tsuji, R.W. Franck, A.P. Lawton, C.C. Chan, and R.R. Caspi, Activation of invariant NKT cells ameliorates experimental ocular autoimmunity by a mechanism involving innate IFN-gamma production and dampening of the adaptive Th1 and Th17 responses. *J Immunol*, 2008. **181**(7): p. 4791-7.

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)	
Araştırmanın Adı / Protokol Numarası:	Multipl Skleroz patogenezinde doğal öldürücü hücre sıklığı ve sitokin içeriği
Araştırmanın Konusu:	Multipl Sklerozda doğal öldürücü (NK) hücrelerinin rolü
Araştırmanın Amacı:	Bu araştırmada, Multipl Skleroz hastalığında etkili olabilecek hücre popülasyonlarının ve fonksiyonlarının tanımlanması amaçlanmaktadır.
Araştırmanın Süresi:	12 ay
Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı:	Tedavisiz RR-MS hastaları: 10 IFN-beta tedavisi alan MS hastaları: 10 Klinik İzole Sendromlu hastalar: 10 Sağlıklı kontrol grubu: 10
Araştırmada İzlenecek Yöntem:	• Gönüllülerden 10 ml heparinize periferik kan alınacak, alınan kan örneklerinde hücre yüzey molekül ekspresyonu ve hücre içi sitokin tayini yapılacaktır. • Çalışmada gönüllünün sadece periferik kan örneği alınacak ve gönüllü üzerinde başka herhangi bir çalışma yapılmayacaktır. • Alınan kanlar, hücre yüzey molekül ekspresyonu ve hücre içi sitokin tayini dışında başka hiçbir amaç doğrultusunda kullanılmayacaktır.
Alternatif Tedavi Veya Girişimler:	Yoktur.
Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler:	Uygulama sırasında herhangi bir risk söz konusu değildir.
Araştırma İlacının Olası Yan Etkileri:	Gönüllüye herhangi bir ilaç verilmeyecektir.
Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilecek Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:	Bio. İlhan TAHRALI - 0537 741 08 70

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp, tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü, arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılma hakkına sahiptir.
- Yapılacak çalışma için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecek ve gönüllüye herhangi ücret ödenmeyecektir.
- Gönüllünün çalışmaya katılma zorunluluğu yoktur; istediği takdirde çalışmadan ayrılma hakkına sahiptir.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi, onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkide bulunmayacaktır.
- Gönüllünün çalışmaya katılım süreci, yalnızca gönüllüden kan örneği alınmasıyla sınırlıdır.
- Gönüllünün çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamaması halinde, araştırmacının isteği ile çalışmadan çıkarılabilmesi mümkündür.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı'nda yapılacak olan tıbbi araştırmanın konusu ve amacı ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün;

Adı-Soyadı **İmzası** **Telefonu**

Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin;

Adı-Soyadı **İmzası**

Tarih

Gerekiyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin;

Adı -Soyadı **İmzası**

Tarih

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI

Sayı : 23227
Konu :

İstanbul ...../ ..... / .....

İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğüne

03 Ağustos 2011

İLGİ: 21.07.2011 tarihli,579 sayılı yazınıza:

Enstitünüz İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Günnur DENİZ'in** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi İlhan TAHRALI'nın** yürütücülüğünde **"Multiple Skleroz Patogenezinde Doğal Öldürücü Hücre Sıklığı ve Sitokin İçeriği"** başlıklı **Uzmanlık Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **26 Temmuz 2011** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatiş ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar
Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarda yazımızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İlhan	**Soyadı**	Tahralı
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	14.02.1987
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	11855686752
Email	tahralii@yahoo.com	**Tel**	05377410870

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji A.D.	2013
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Nişantaşı Nuri Akın (Yabancı Dil Ağırlıklı) Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji A.D.	2012-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	Orta	İyi	65	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	86,975		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi
SPSS 21	İyi
Graphpad 6	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

- Gelmez Y, Kasapoğlu P, Adas CU, Tahrali I, Gazioğlu S, Cevik A, Deniz G. "Metabolik Sendromda Deneysel Hayvan Modelleri". DETAE Tıp Dergisi. Sayı 4 (Aralık 2012),15-21

- Çınar S, Yılmaz A, Aydın B, Tahralı İ, Küçüksezer UC, Deniz G. Pediyatrik B hücreli akut lenfoblastik lösemi olgularında flow sitometri ile Minimal Rezidüel Hastalık riski bulguları. (S-08) 4. Detae Günleri, 14-15 Kasım 2012, İstanbul, Türkiye.

- Cinar S, Yilmaz A, Kucuksezer Uc, Tahrali I, Aydin B, Deniz G. Pediyatrik T Hücreli-Akut Lenfoblastik Lösemili olgularda Minimal Rezidüel Hastalık riskinin flow sitometri ile saptanması. (Pp-02) 4. Detae Günleri, 14-15 Kasım 2012, İstanbul, Türkiye.

- Altıntaş A, Uygunoğlu U, Tahralı İ, Küçüksezer UC, Yılmaz A, Deniz G. Immunoregulatory role of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis. 11th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2012), 4-8 Kasım 2012, Boston, Amerika Birleşik Devletleri.

- Tahralı İ, Küçüksezer UC, Yılmaz A, Uygunoğlu U, Altıntaş A, Deniz G. The role of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis pathogenesis. (PP-174) European Congress of Immunology (ECI2012), 5-8 Eylül 2012, Glasgow, İskoçya.

- Tahralı İ, Çetin-Aktaş E, Okumuş-Akdeniz N, Altıntaş A, Deniz G. The Role Of Natural Killer Cell frequency and cytokine content in the pathogenesis of Multiple Sclerosis. (PP- 73). Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC2012). 27-29 Nisan 2012, Antalya, Türkiye.

- Kucuksezer UC, Tahrali I, Adin-Cinar S, Gemicioglu B, Akdis AC, Akdis M, Deniz G. Can innate inflammatory factors break immunotherapy-induced T cell tolerance in patients with allergic asthma? (P-0770). European Congress of Immunology (ECI) 2012, 5-8 Eylül 2012, Glasgow, İskoçya.

Ödüller:

- Çınar S, Yılmaz A, Aydın B, Tahralı İ, Küçüksezer UC, Deniz G. "Pediyatrik B hücreli akut lenfoblastik lösemi olgularında flow sitometri ile minimal rezidüel hastalık riski bulguları". (SS-08) Poster Birincilik ödülü. 4. DETAE Günleri, 14-15 Kasım 2012, İstanbul, Türkiye.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Keman çalmak, karakalem portre çizmek