

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

**FİNGOLİMOD TÜREVİ ORİJİNAL ST-1505 BİLEŞİĞİNİN
MULTİPL SKLEROZ TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA SANDAL

DENİZLİ, MART - 2019

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



**FİNGOLİMOD TÜREVİ ORİJİNAL ST-1505 BİLEŞİĞİNİN
MULTİPL SKLEROZ TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA SANDAL

DENİZLİ, MART - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Fatma SANDAL tarafından hazırlanan “Fingolimod Türevi Orijinal ST-1505 Bileşiminin Multipl Skleroz Tedavi Etkinliğinin Araştırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 01.03.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri EnstitüsüBiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Alaattin Şen

Üye
Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN

Üye
Dr.Öğr.Gör.İşıl GAZİOĞLU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
03/04/2019 tarih ve ... 15/12.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez alışması PAÜ-BAB tarafından 2017FEBE50 nolu proje ile desteklenmiştir.

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



FATMA SANDAL

ÖZET

FINGOLIMOD TÜREVI ORJİNAL ST-1505 BİLEŞİĞİNİN MULTİPL SKLEROZ TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA SANDAL

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, MART - 2019

Multiple skleroz (MS), beynin beyaz maddesinde T hücrelerinin miyelin proteinlerine ve diğer tanımlanmamış antijenlere karşı enflamatuvar bir kaskadı başlatıp demiyelinizasyon ve yoğun astrogliosis neden olduğu düşünülen otoimmün bir hastalık olarak kabul edilir. Hastalığın neden olduğu hala bilinmese de çeşitli çevresel risk faktörleri ve genetik faktörler tanımlanabilir. MS geliştirmek için artmış bir risk, Epstein- Barr virüsü enfeksiyonu, sigara içimi, yüksek tuz alımı, D vitamini eksikliği ve çoğunlukla immün fonksiyonla ilişkili genetik faktörler gibi çevresel faktörlerle ilişkilidir. MS için günümüzde hala uygun bir tedavi yöntemi yoktur. FDA tarafından onaylanmış ve hastalığı modifiye edici ilaçlardan ilk oral ilaç olan Fingolimod sfingozin 1-fosfat (S1P) reseptörünü modüle eden doğal sfingozinin yapısal bir analogudur. Fingolimod lenfositler üzerindeki S1P reseptörlerini baskılayarak, lenf nodlarından lenfositlerin göçünü önler. Fingolimod (ticari isimi Gilenya) türevi ST-1505 bileşiğinin SH-SY5Y ve CCRF-CEM hücrelerinde moleküler gen ifade değişkenlikleri analizleri gerçekleştirildi. ST-1505 bileşiğinin EC10 dozunda SH-SY5Y hücre hattında uygulanması sonucunda eflamasyon ile ilgili sitokinler olan CXCR3, TNF, CXCL9, HLA-DRB1, STAT3, C1S, CCL3, CD44, CSF1, IL10 ve NFkB1 genlerinin ifade düzeylerinde sırasıyla 6,68; 1,66; 8,00; 6,75; 2,42; 5,54; 5,56; 1,85; 3,46; 7,11; 1,64 kat baskılama gözlenmiştir. Benzer olarak CCRF-CEM hücre hattında aynı dozda IL-6, CXCR3, TNF, CXCL10, CXCL9, HLA-DRB1 ve STAT3 genlerinin ifade düzeyleri sırasıyla 1,96; 6,68; 1,66; 2,15; 8,00; 6,75 ve 2,42 kat azalma gözlemlenmiştir. CCRF-CEM hücre hattı ile tekrar çalışmalarımız devam etmektedir. Bu sonuçlar, ST-1505 bileşiğinin iyi bir anti-enflamatuvar etkiye sahip olduğunu ve MS tedavisi için umut verici olarak değerlendirilmesini sağlamıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Multiple skleroz (MS), Fingolimod Türevi ST-1505, Anti- enflammatuvar, Sitokin ifade düzeyi

ABSTRACT

INVESTIGATION THE TREATMENT EFFICIENCY OF FINGOLIMOD DERIVED NOVEL ST- 1505 COMPOUND IN MULTIPLE SCLEROSIS

MSC THESIS

FATMA SANDAL

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BİOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. ALAATTİN ŞEN

DENİZLİ, MARCH 2019

Multiple sclerosis (MS) is considered an autoimmune disease in the white matter of the brain, which is thought to induce an inflammatory cascade of T cells against myelin proteins and other unspecified antigens and is thought to be caused by demyelination and intense astrogliosis. Although the disease is still unknown, several environmental risk factors and genetic factors can be identified. An increased risk of developing MS is associated with environmental factors such as Epstein-Barr virus infection, smoking, high salt intake, vitamin D deficiency, and genetic factors, often associated with immune function. There is still no suitable treatment for MS today. Fingolimod is a structural analogue of natural sphingosine modulating the sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor, the first oral drug approved by the FDA and approved by the disease. Fingolimod suppresses S1P receptors on lymphocytes, preventing the migration of lymphocytes from lymph nodes. Molecular gene expression variability analyzes were performed on SH-SY5Y and CCRF-CEM cells of Fingolimod (trade name Gilenya) derivative ST-1505. The administration of the ST-1505 compound at the dose of EC10 in the SH-SY5Y cell line resulted in 6.68; 1.66; 8.00; 6.75; 2.42; 5:54; 5:56; 1.85; 3:46; 7:11; 1.64 fold suppression in the expression of the inflammatory cytokines CXCR3, TNF, CXCL9, HLA-DRB1, STAT3, C1S, CCL3, CD44, CSF1, IL10 and NFKB1, respectively. Similarly, the expression levels of IL-6, CXCR3, TNF, CXCL10, CXCL9, HLA-DRB1 and STAT3 genes at the same dose in the CCRF-CEM cell line were found to be 1.96; 6.68; 1.66; 2.15; 8.00; 6.75 and 2.42-fold suppressed. We are still working with CCRF-CEM cell line to confirm the results. These results provided that the compound ST-1505 had a good anti-inflammatory effect and was considered promising for the treatment of MS.

KEYWORDS: Multiple sclerosis, Fingolimod-Derived Novel St-1505 Anti-inflammatory, Cytokines expression

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBO LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	9
1.1 Multipl Skleroz.....	9
1.1.1 Tanısı.....	11
1.1.2 Etiyolojisi.....	13
1.1.3 Epidemiyolojisi.....	15
1.1.4 Patolojisi.....	16
1.1.5 Patogenezinde Rol Alan İmmün Hücreler.....	17
1.2 Multipl Skleroz Tedavisi.....	21
1.2.1 İmmünomodülatör İlaçlar.....	22
1.2.2 Monoklonal Antikorlar.....	23
1.2.3 Oral Tedaviler.....	24
1.2.3.1 Fingolimod.....	25
1.2.4 Alternatif Tedaviler.....	28
1.3 Çalışmanın Amacı.....	29
2. MATERYAL VE METOT	30
2.1 MATERYAL.....	30
2.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	30
2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
2.1.3 Hücre Kültürü.....	31
2.1.3.1 Sitotoksosite Çalışmaları.....	32
2.1.3.2 Hücrelere Bileşiklerin Uygulaması.....	33
2.2 METOT.....	34
2.2.1 Çalışmalarda Kullanılan Etken Madde.....	34
2.2.2 RNA İzolasyonu.....	34
2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi İle RNA Görüntülenmesi.....	35
2.2.4 cDNA Sentezi.....	35
2.2.5 Gerçek Zamanlı PZR.....	36
3. BULGULAR	39
3.1 CCRF-CEM ve SHSY-5Y Hücreleri.....	39
3.2 ST-1505 Bileşiğinin Hücre Canlılığına Etkisi.....	40
3.3 ST-1505 Bileşiğinin CCRF-CEM Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi.....	41
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇ	66
6. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:Multipl skleroz klinik seyir tipleri (Jacobs, 2016).....	11
Şekil 2:MS etiyojisine katkıda bulunan faktörler(Vojdani,2014).....	14
Şekil 3: Coğrafi bölgelere göre MS'in prevalansı (Multipl Skleroz Uluslar arası Federasyonu,2013)	15
Şekil 4: MS patolojisi: (Pathol 2007).....	16
Şekil 5:T hücre kaynaklı MS patolojisi (Fletcher ve diğ.,2010).....	20
Şekil 6:Hastalık modifiye edici tedaviler (Tintore ve diğ.,2018).....	22
Şekil 7:Fingolimod kimyasal yapısı A. Sfingozin 1-fosfat,B.Fingolimod (White ve diğ.,2016)	25
Şekil 8:Multipl sklerozda fingolimodun etkileri (Brinkmann,2009)	27
Şekil 9:SHSY-5Y Hücresinin Mikroskopik Görüntüsü.....	39
Şekil 10:CCRF-CEM Hücresinin Mikroskopik Görüntü.....	39
Şekil 11:ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi.....	40
Şekil 12:ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre canlılığına etkisi.....	40
Şekil 13:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında CXCR3 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	42
Şekil 14:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 geninin mRNA seviyesine etkisi olan etki	42
Şekil 15:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	43
Şekil 16:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında GFAP geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	43
Şekil 17:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında TNF geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	44
Şekil 18:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	44
Şekil 19:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında HLA-DRB1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	45
Şekil 20:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında STAT3 geninin mRNA seviyesine olan etkisi	45
Şekil 21:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında sitokin ilişkili genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.	47
Şekil 22:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında kemokin ilişkili genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.	47
Şekil 23:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında miyelin ilişkili genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	48
Şekil 24:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında T hücre ilişkili geninin mRNA seviyelerine olan etkisi.	48
Şekil 25:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında kalıtsal bağışıklık ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.	49
Şekil 26:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında apoptoz ilişkili geninin mRNA seviyelerine olan etkisi.....	49
Şekil 27:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında enflamasyon ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.....	50

Şekil 28: Fingolimod türevi ST-1505 bileşiminin SHSY-5Y hücre hattında adezyon ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.	50
Şekil 29:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiminin SHSY-5Y hücre hattında diğer genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Schumacker Kriterleri (Ceccarelli,2012).....	12
Tablo 2: Poser Kriterleri(Önder,2006).....	12
Tablo 3: Multipl skleroz için McDonald teşhis kriterlerine 2017 revizyonları(Thompson ve diğ.,2018).....	13
Tablo 4: cDNA Sentez Karışımı ve Prosedürü	36
Tablo 5: PZR koşulları	37
Tablo 6: Sıcaklık ve Zaman Koşulları.....	37
Tablo 7: İnsan T-lenfoblastoma: CCRF-CEM ve SK-N-SH hücre hatların çalışmalarında kullanılan primer dizileri.	38
Tablo 8: CCRF-CEM hücre hattında ST-1505 bileşiği uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.	53
Tablo 9: SH-SY5Y hücre hattında ST-1505 bileşiği uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.....	54

SEMBOL LİSTESİ

ASH	:	Antijen Sunan Hücre
BSA	:	Sığır Serum Albumin
BOS	:	Beyin Omurilik Sıvısı
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DAE	:	Deneysel Alerjik Ensefalit
FDA	:	Food and Drug Administration
KBB	:	Kan Beyin Bariyeri
MHC	:	Ana Histo-Uyumluluk Kompleks
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
MS	:	Multipl Skleroz
PBS	:	Fosfat Tampon Tuzu
PPMS	:	Primary-Progressive MS
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik Asit
RRMS	:	Relapsing-Remitting MS
PRMS	:	Progressive-Relapsing MS
RT-PCR	:	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SPMS	:	Secondary-Progressive MS
TAE	:	Tris-Asetik asit-EDTA

ÖNSÖZ

Tez çalışma süresince hem bilimsel anlamda hem de bilgi birikiminin artmasına katkıda bulunan, tecrübeleriyle bana yön veren, desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen, kariyerimin inşasında temel yapıtaşı olarak gördüğüm sayın danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN' e;

Laboratuvarda bir aile ortamı gibi hissettiren, desteklerini ve bilgilerini benden esirgmeden bana destek olan doktora öğrencisi Gurbet TURGUT ÇELİK'e, Özden ÖZGÜN ACAR'a, ve Elif KALE'e, yüksek lisans öğrencilerinden Hajarat Abilo ALFA'a, Hatice ORUÇ' a ve Şule IRMAK'a;

Maddi desteklerinden dolayı Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine;

Bu zamana kadar verdiğim kararlarda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hep arkamda hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

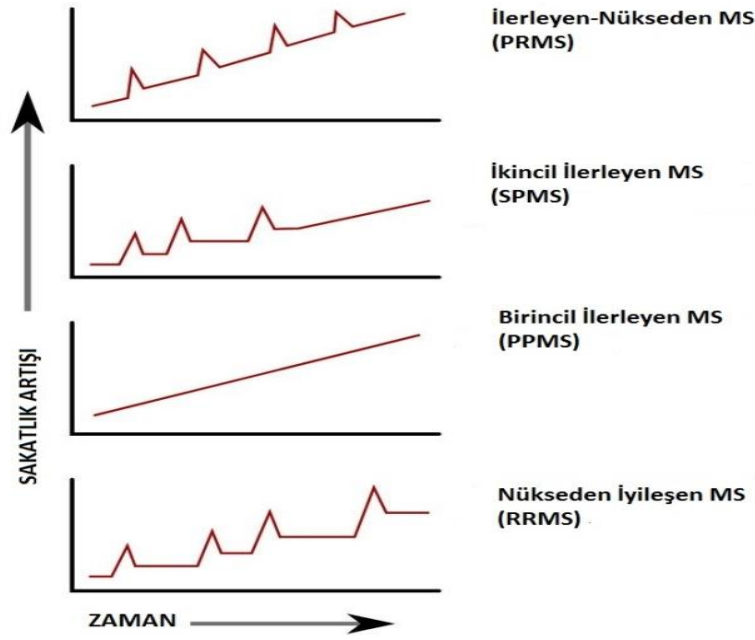
1.1 Multipl Skleroz

Multipl Sklerozun (MS), beynin beyaz maddesinde miyelin proteinlerine ve diğer tanımlanmamış antijenlere karşı T hücrelerinin enflamatuvar bir kaskadı başlattığı ve oligodendrositleri ve mikroglıyeni hasarına neden olduğu düşünölen T hücre aracılı otoimmün hastalık olarak kabul edilir(Elkama ve Karahalil,2017; Alonso ve diğ.,2018). Bu hastalığa ilişkin klinik ve patolojik tanımlama ilk kez 1877 yılında Charcot tarafından ortaya konulmuştur(Feijo,2003). O zamandan bu yana hastalıkla ilgili henüz kesin bir tanı ve tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Dünya genelinde yaklaşık 2,5 milyon insanda özellikle genç erişkinlerde ve kadınlarda ciddi fiziksel sakatlığın bir nedeni sayılan nöroenflamatuvar hastalık olarak ortaya çıkmaktadır(Comston and Coles,2008).Yapılan birçok çalışmaya dayanarak hastalık nedeninin netlik kazanmamış olmasıyla, genetik ve çevresel etkenlerin birlikte etkisinin ortaya çıktığı düşünülmektedir. MS geliştirmek için artmış bir risk, Epstein-Barr virüsü enfeksiyonu, sigara içimi, yüksek tuz alımı, D vitamini eksikliği ve çoğunlukla immün fonksiyonla ilişkili genetik faktörler gibi çeşitli çevresel risk faktörleri tanımlanabilir (Gold,2018). Genetik çalışmalarda ise 6.kromozomun HLA bölgesine yakın olan genlerle ilişkilendirilmektedir. Son yıllarda ise MS patogenezi ile uğraşanlar bağışıklık sisteminde hem doğuştan hem de uyarlanabilir olan efektör hücrelerin multipl skleroz hastalığına etki ettiği ve T ve B lenfositlerin bu hastalığa önemli katkıda bulunduğu bilinmektedir. Lenfositler CNS'ye sızarak miyelin ve aksonlara zarar verir ve inflamatuvar kaskadını başlatır. Beyin ve spinal kord beyaz cevherinde ortaya çıkan inflamatuvar plaklar multifokal nörolojik hasarlarla kendini gösteren, hastalanma ve iyileşme dönemlerinin birbirini izlediği ataklara neden olur. Her atakta birkaç akson hasara uğrar ve sonraki ataklar da aynı etkiyi gösterirse toplam bir etki ile akson kaybı kalıcı hale gelir (Yılmaz,2006). Daha sonrasında oluşan nörodejenerasyonla birlikte kas-iskelet disfonksiyonuna, kas güçsüzlüğüne

ve ağrısına, görme bozuklukları gibi çeşitli problemlere ve nihayetinde ölüme yol açabilir (Elkama ve Karahalil,2017).

Hastalığın klinik belirtilerine göre dört tipi tanımlanabilir:

1. Nükseden-İyileşen MS (NİMS-RRMS): MS'in yaklaşık %85 ini oluşturan formdur. Açıkça belirlenmemiş yeni atak veya tekrarlayan semptomlar görülmektedir. Ataklar sonucunda tamamen veya hafif iyileşme görülebilmektedir. Bu formda enflamasyon belirgin şekildedir.
2. Birincil İlerleyen MS (BİMS-PPMS); MS hastalarının yaklaşık %10-15 kısmıdır. Relaps veya remisyon olmaksızın ilerleyici formdur. Başlangıçtan itibaren hastalık ilerlemesi kötüleşmeye gider, arada sırada geçici küçük iyileştirmelere izin verilir. PPMS formu araştırıldığı üzere hastalığı tedavi etmek için kullanılan ilaçlara daha dirençli olduğu belirtilmiştir (Goldenberg, 2012).
3. İkincil İlerleyen MS (İİMS-SPMS): İİMS hastalarının yaklaşık %50'si İİMS'ye dönüşür. Hastalığın atak ve remisyonlarla devam ederek hangi dönemde kötüleşmeye gidildiğini ve semptom şiddetine göre İİMS tanısı konulmaktadır.
4. İlerleyen-Nükseden MS (İNMS-PRMS): Az sayıda hastayı etkileyen formdur. Remisyon dönemi olmayan ve başlangıçtan itibaren ilerleyen semptomların kötüleşmesi ilerleyicidir.



Şekil 1:Multipl skleroz klinik seyir tipleri (Jacobs, 2016).

1.1.1 Tanısı

MS hastalığının etiolojisinin heterojen özellik göstermesi tanı koyma sıkıntısını da beraberinde getirmektedir. MS için henüz spesifik tanı testi bulunmamaktadır. Bu yüzden hastalığın zamansal ve mekansal olarak yayılımının gösterilmesi ve buna göre değerlendirilmesi gerekmektedir. Yayılımın değerlendirilmesi için hastalarda MR, nörofizyolojik testler ve beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesi gibi tetkiklerin yapılması tanıya ulaşmada katkılar sağlamaktadır (Yılmaz, 2006). Tanı koyarken hastalık seyrinde oluşan semptom ve bulgular dikkate alınmaktadır. Bu semptom ve bulgulara karşılık hastalık seyrine etkili olabilen immun tedavilerin uygulanması ve bu süreçte hastada neler yapabilecekleri hakkındaki sürece olanak sağlar.

Hastalığın ortaya çıkmasından itibaren birçok tanı kriteri ortaya konulmuştur. İlk olarak kriter tanımlaması 1965 yılında Schumacker ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Tablo 1). Kriterlerini klinik değerlendirmeye yani lezyonların zaman ve mekân dağılımına dayalı olarak ortaya konmuştur (Ceccarelli ve diğ., 2012).

Tablo 1: Schumacker Kriterleri (Ceccarelli,2012)

<i>Klinik olarak kesin MS tanısı için gerekli 6 kriter:</i>
1. Belirtilebilecek nörolojik muayenede objektif anormallikler CNS disfonksiyonu; Sadece semptomlar tanı için yeterli değildir.
2. Nörolojik muayenede veya tıbbi öyküde kanıt olmalı CNS'nin 2 veya daha fazla ayrı bölümünde tutulum
3. CNS hastalığının objektif kanıtı, ağırlıklı olarak beyaz maddeden oluşmalıdır. Diskalifiye olan küçük gri madde ile tutulumu.
4. Nöralis tutulumu geçici olarak gerçekleşmiş olmalıdır. aşağıdaki kalıplardan birinde: • 2 veya daha fazla kötüleşme (nüksetme) dönemi, bir dönemle ayrılır Bir ay veya daha fazla, her bölüm en az 24 saat sürüyor. • En az 6 ay boyunca belirti ve semptomların yavaş ya da adım adım ilerlemesi.
5. Hastanın yaşı 10-50 yıl arasında olmalıdır.
6. Belirtiler ve semptomlar başka bir hastalık süreci tarafından daha iyi açıklanamaz.

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve BOS zaman içinde tanıya büyük katkı sağlamasıyla yeni kriterlerin ortaya çıkmasında etkili olmuştur. 1983 yılında Poser kriterleri bunlardan biri olan tanılama metodu olmuştur (Tablo 2). Poser kriterleri daha önceki kriterlere göre asemptomatik hasarı belirlemek için paraklinik testler (uyarılmış potansiyeller) ve BOS'u klinik değerlendirmelerine dahil etmiştir. Bu bilgilere dayanarak MSS, zaman ve mekanda yayılımının gerçekleşmesi söz konusudur.

Tablo 2: Poser Kriterleri(Önder,2006)

<i>Poser kriterlerine göre MS klasifikasyonu (1983)</i>	
KESİN MS Klinik olarak kesin	OLASI MS Klinik olarak olası
A1: İki atak, iki ayrı lezyona ait muayene bulgusu A2: İki atak, bir lezyona ait muayene bulgusu ve bir başka lezyona ait paraklinik bulgu	C1: İki atak, bir lezyona ait muayene bulgusu C2: Bir atak, iki ayrı lezyona ait muayene bulgusu C3: Bir atak, bir ayrı lezyona ait muayene bulgusu ve başka bir lezyona ait paraklinik bulgu
LABORATUVAR DESTEKLİ KESİN MS	LABORATUVAR DESTEKLİ OLASI MS
B1: İki atak, bir lezyona ait muayene bulgusu veya paraklinik bulgu ve bir BOS bulgusu B2: Bir atak, iki ayrı lezyona ait muayene bulgusu ve BOS bulgusu B3: Bir atak, bir lezyona ait muayene bulgusu, bir başka lezyona ait paraklinik bulgu ve BOS bulgusu	D1: İki atak ve BOS bulgusu

MS hastalığının tanısında MRG'nin önemindeki artışa dayanarak yeni kriterler ortaya atılmıştır. Bu kriterlerden biri olan McDonald kriterleri 2001 yılında Ulusal Multipl Skleroz Federasyonları Derneği'nin toplantısında belirlenmiştir(Pittock ve diğ.,2004). Bu kriterler 2001,2005 ,2010 ve son olarak 2017 (Tablo 3) yıllarında revize edilmiştir. McDonald kriterlerini diğer kriterlerden ayıran ise Sinir Sistemi MGR'si ve erken klinik tanı özelliklerinin mevcut olmasıdır(Acar,2015). Erken tanı sunma özelliğinden yola çıkarak erken tedavi olanağı sağladığı düşünülmektedir.

Tablo 3: Multipl skleroz için McDonald teşhis kriterlerine 2017 revizyonları(Thompson ve diğ.,2018)

	Objektif klinik kanıt olan lezyon sayısı	Multipl skleroz tanısı için gerekli ek veriler
≥2 klinik ataklar	≥2	Yok
≥2 klinik ataklar	1 (ayrı bir anatomik lokasyonda bir lezyonu içeren daha önceki bir saldırının açık ve net kanıtı)	Yok
≥2 klinik ataklar	1	Farklı bir MSS sitesi veya MRI ile ilgili ek bir klinik saldırı tarafından gösterilen uzayda yayılma
1 klinik ataklar	≥2	Ek bir klinik atak veya MRG ile veya CSF'ye özgü oligoklonal bantların gösterilmesiyle ortaya çıkan zaman içinde yayılma
1 klinik ataklar	1	Farklı bir MSS sitesi veya MRI ile ilgili ek bir klinik saldırı tarafından gösterilen uzayda yayılma Ek bir klinik atak veya MRG ve OR ile CSF-spesifik oligoklonal bantların gösterilmesi ile zaman içinde yayılma

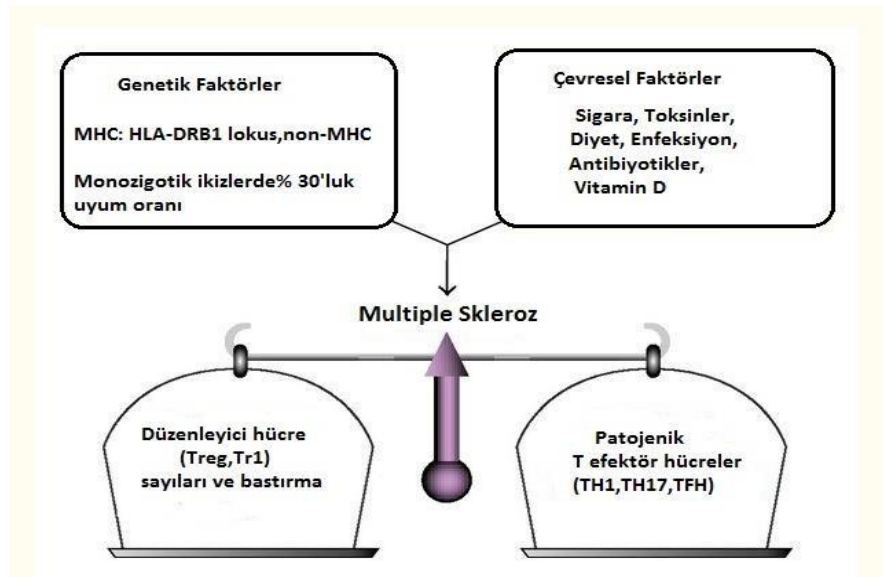
Eğer olası durum kriterleri tam olarak karşılıyorsa ve klinik olarak daha kuvvetli bir açıklama yoksa tanı “MS”dir. Var olan kriterler tam olarak karşılamıyorsa “olası MS”dir. Eğer klinik olarak durumu tanımlayan başka bir tanı varsa tanı “MS değil”dir(Toğrol ve Demir,2016).

1.1.2 Etiyolojisi

MS ile ilgili literatür taramalarında etiyolojisi ile ilgili birçok hipotez ortaya atılmaktadır. Bu hipotezlerden en güçlüsü olan hastalığın otoimmün bir hastalık olduğu saptanmıştır. Hastalığın ortaya çıkışında genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin yer aldığı düşünülmektedir(Şekil2). Epstein-Barr virüsü enfeksiyonu, sigara içimi, yüksek tuz alımı, genç yaşta obezite D vitamini

eksikliği, diyet ve çoğunlukla immün fonksiyonlar (otoreaktif lenfositler) hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir(Gold, 2018). Ayrıca, çoğu omurgalılarda bulunan Major Histocompatibility Complex (MHC), memeli genomunda geniş bölgeye sahip gen ailesidir ve bağışıklık sisteminde, otoimmitede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir(Compston ve Coles, 2008).

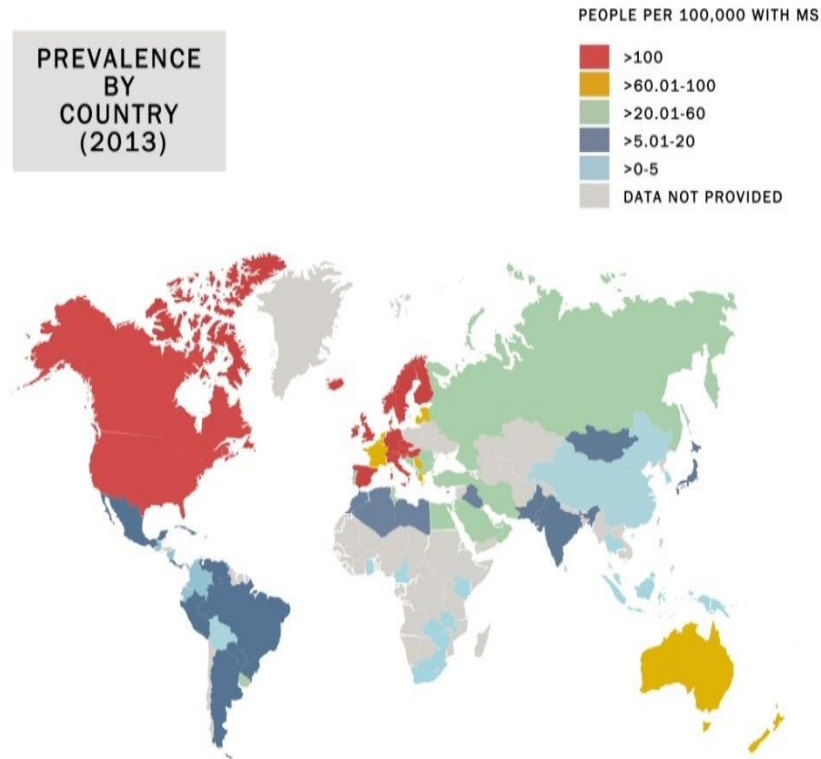
Çeşitli genetik çalışmalar yapılmıştır ve bunlardan biri MS'de ailesel agregasyonunda tahmini genel nüks oranı %20–22.8'di(Verma ve Singh,2017). İzlenen birçok çalışmada HLA genini taşıyan insanlarda hastalığın düşük sonuç vermesine rağmen çevresel faktörlerle birleşmesiyle pozitif sonuç elde edilmiştir.HLA-DRB1*15 antijeni MS hastalığına sahip olan hastaların %55-60'ında bulunmaktadır (Tireli, 2006). Risk birinci dereceden akrabalarda %2,77 iken, ikinci derece akrabalarda %1,02 ve üçüncü derece akrabalarda %0,88 iken, genel populasyonda %0,3'tür (Mosca ve diğ. 2017). İkiz çalışmalarda ise özellikle monozigotik ikizlerde %30'luk bir uyum oranı gösterirken dizigotik ikizler için bu oran oldukça düşük seviyede olduğu görülmektedir (Milo ve Miller, 2014).



Şekil 2:MS etiyojisine katkıda bulunan faktörler(Vojdani,2014).

1.1.3 Epidemiyolojisi

Ulusal MS Federasyonu'un tahminlerine göre MS kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre iki ya da üç kat daha yaygın şekilde bulunmaktadır. Genç ve orta yaşlı yetişkinlerde yani ortalama 20 ve 50 yaşları arasında nörolojik sakatlık olarak ifade edilen hastalığın başta gelen nedenini olarak düşünülmekte ve dünya çapında 2,3 milyondan fazla insanı (Ulusal Multipl Skleroz Derneği, 2018) en az iki ila üç kat daha fazla insanı etkilediği tahmin edilmektedir (Kavrochorianou ve diğ., 2016). Dünyada hastalığın prevalansı beyazlarda ve Avrupa kökenlilerde sık görülür iken, tropikal bölgelerde daha nadir prevalansı ortaya çıkmıştır. Kuzey Avrupa, Güney Kanada, İsrail, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Güney Avustralya'da MS hastası olma sıklığı daha fazla iken, Asya'da ise MS hastalığı seyrek görülmektedir(Öztürk, 2016).

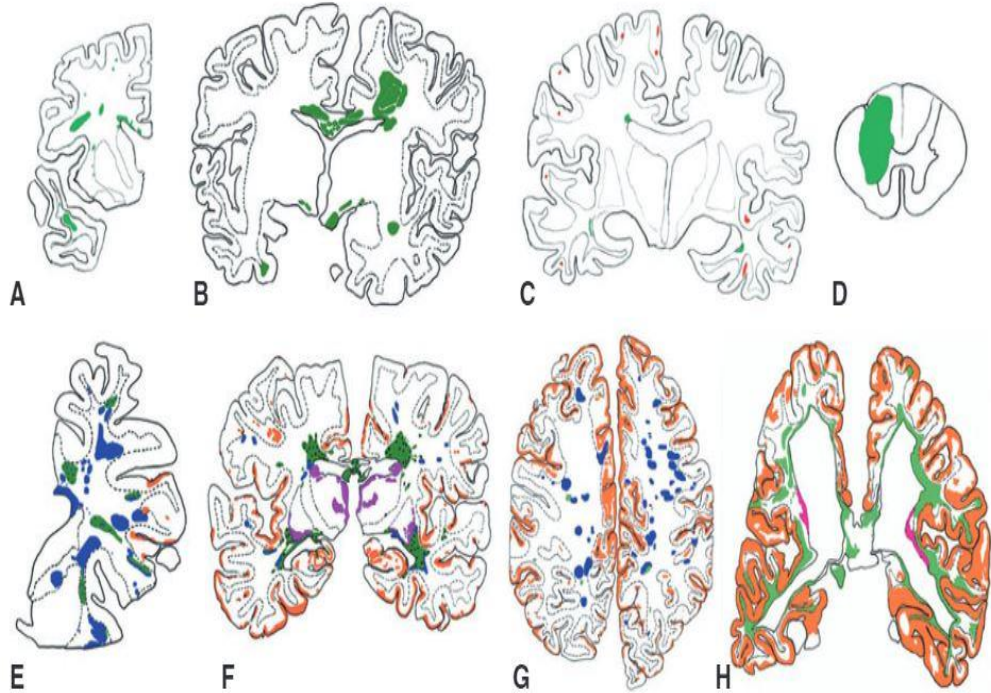


Şekil 3:Coğrafi bölgelere göre MS'in prevalansı (Multipl Skleroz Uluslar arası Federasyonu,2013)

MS hastalığının görülme sıklığı coğrafi bölgelere ve ırksal farklılıklara göre MS'in dağılımı değişiklik göstermektedir. Ekvator'dan uzaklaştıkça yani Kuzey Amerika ve Avrupa'nın kuzey bölgelerine gidildikçe hastalığın görülme sıklığı artmaktadır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda MS hastalığının bölgeden bölgeye değişiklik gösterdiği ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak hastalığın prevalansı çeşitlilik göstermektedir.

1.1.4 Patolojisi

MS patolojisinin hala netlik kazanamamasının önemli nedenlerinden biri hastalığın heterojenlik göstermesidir. Genetik olarak yatkın bireylerde D vitamini veya bakteriyel, viral infeksiyon gibi çevresel etmenler MS hastalığının oluşumunu tetiklenmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Merkezi Sinir Sisteminin (MSS)'nindeki enflamatuvar demiyelinizasyon sonucunda immun yanıt sağlayan ve hastalığın başlangıcında önemli olan akson zedelenmesi, oligodendrosit (OG) kaybı ve astrositik gliyosiz görülmektedir (Şekil 4).



Şekil 4: MS patolojisi: Multipl skleroz patolojisi: fokal A. Akut MS; bazı yerlerde demiyeline plaklar oluşturan çoklu enflamatuvar demiyelinizan lezyonlar.

B. Akut MS; fokal büyük demiyeline plaklar (yeşil lezyonlar). C, D.Başlangıç MS; omurilikte aktif olmayan demiyeline lezyonlar (D); Çok az sayıda ve minik lezyonlar beyin beyazında ve kortekste. E. Nükseden-İyileşen MS; çoklu beyaz cevher lezyonları; birkaç demiyeline lezyon etkindir. F. İkincil ilerici MS; çok sayıda büyük beyaz cevher plağı; çoğu lekeler demiyelinizedir, koyu gri maddede geniş kortikal demiyelinizasyon ve multipl lezyonlar. G.Birincil- İlerleyen MS; çoğu remiyelinize olmuş multipl küçük fokal beyaz cevher lezyonları; Ek olarak normal görünen beyaz maddede yaygın dağınık yaralanma vardır H. İkincil-İlerleyen MS, büyük fokal demiyelinize beyaz cevher lezyonları, koyu gri maddede de birçok lezyon mevcuttur (Pathol 2007).

MS patolojisinde birçok araştırma ve buna bağlı da çalışmalar yapılmakla birlikte hastağılı destekleyen düşüncelerden en önemlilerinden biri otoreaktif T hücreleri kan-beyin bariyerini (KBB) geçer ve orada aktif hale gelen lenfositler MSS otoimmünesini indüklemektedir (Fletcher ve Lalor,2010). MSS venüllerinin endotel hücrelerinde karşılıklı değışimleri kontrol eden matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), aktive hücrelerin endotele yapışmasını sağlarken kan-beyin bariyerinden geçişlerini kolaylaştırdığı düşünölmektedir (Milo ve Miller,2014). KBB'ini geçen bu immün hücreler, hücre adezyon molekülleri ve sitokin reseptörlerini yukarı regüle eder ve çeşitli pro-enflamatuar sitokinleri salgılagılamaktadır. Sitokinler ise MS'in seyri boyunca, MSS'deki patojenik T hücre farklılaşmasına, iltihap ve doku hasarına neden olaylar içerisinde yer almaktadır (Kasper ve diğ.,2005).

1.1.5 Patogenezinde Rol Alan İmmün Hücreler

MS'de immün yanıtın bir işareti olan MS lezyonları, enflamasyonun izole bölgelerininin oluşmasının göstergesi olarak kabul edilmektedir. İmmün sistemdeki bağışıklık hücreleri tarafından doğrudan hasar sonucu veya çeşitli hücreler tarafından salınan enflamatuar sitokinlerin oluşturduğu lezyonlar hem beyaz cevherde hem de korteks, nükleus ve omurilikte gri cevherde de bulunabilmektedir (Maghazachi,2012).

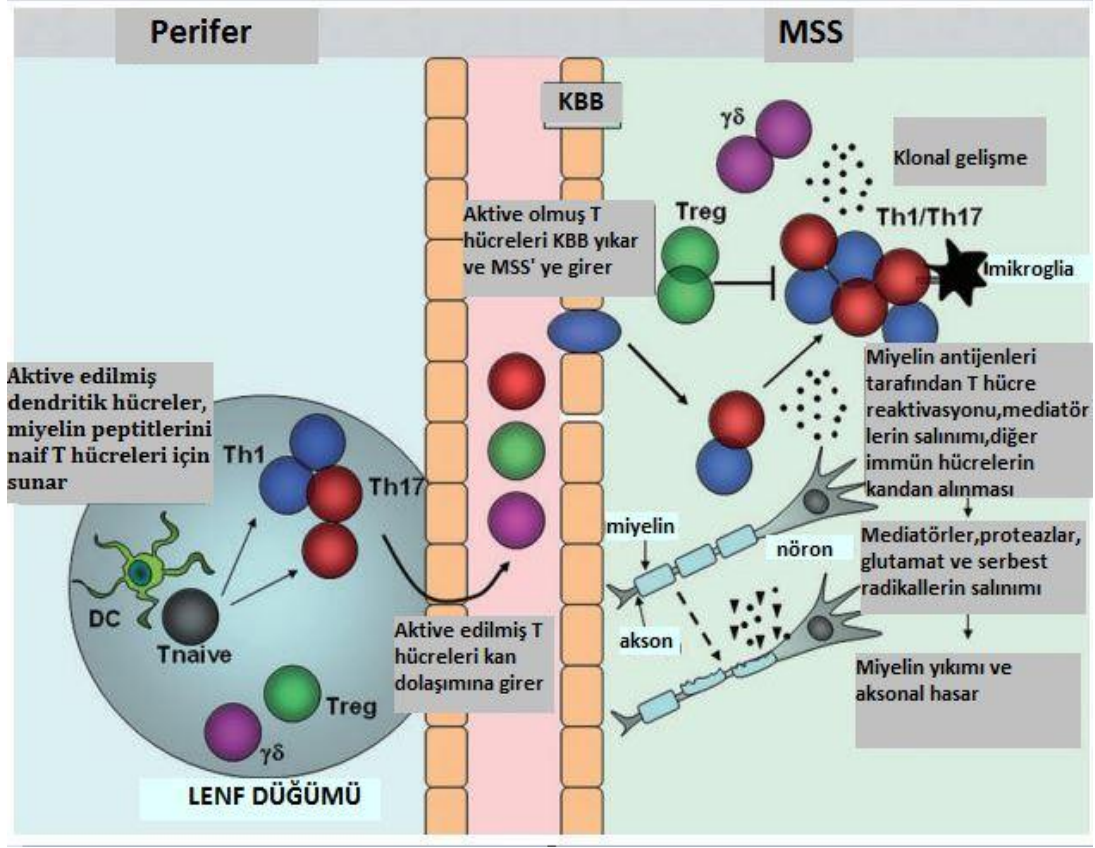
Hücresel bağışıklığın önemli elemanlarından biri olan T hücreler kemik iliğinde oluştan sonra timusa gelir ve çoğalarak gelişir; böylece olgunlaşma sürecine girerler. Bu gelişim sürecinde antijen reseptörünü (T hücre reseptörü,TCR) ve spesifik yüzey molekülü (CD) kazanırlar. T lenfositleri timusun korteksinde olgunlaşması tamamlandıktan S1P ve S1P1 reseptörü tarafından dolaşıma ve dokulara göçü yönlendirilmektedir (Yılmaz,2011). T hücrelerinin her biri özgül antijen reseptörlerine sahip olmaktadır.TCR, ortamda bilinmeyen tümör antijenleri için bilgi taşıyan ve bir CD3 kompleksi ile ilişkili α ve β zincirleri tarafından oluşturulmuş bir heterodimer membran proteinidir (Ataca ve Arslan ,2015). TCR, $\alpha\beta$ ve $\gamma\delta$ formu olmak üzere iki çeşittir. $\alpha\beta$ genellikle lenf dolaşımında, $\gamma\delta$ formu mukozal yüzeylerde bulunurak viral ve bakteriyel antijenleri tanımaktadır (Mayer ve Nyland,2016). Ana histo-uyumluluk kompleksi (MHC)-antijen ilişkili kompleksi, TCR'yi harekete geçirir ve buna bağlı olarak bağışıklık tepkisini kontrol eden sitokinlerin salgılanmasıyla T hücrelerinin gruplanmasını yönlendirmektedir (Warrington ve diğ.,2011).

CD4+ T hücreleri, bağışıklık sisteminin hem hücre aracılı hem de antikor aracılı dalları için gereklidir (Coombs ve diğ.,2002). MHC sınıf II alelleri ile birleşmesinden dolayı MS hastalığının oluşumunda özellikle CD4+ T hücrelerinin aracılık etmesinden dolayı otoimmüne bir hastalık olarak kabul görmektedir. CD4+ Th hücreler dört gruba ayrılmıştır; Th1,Th2,Th17 ve düzenleyici T hücreleridir (Treg) (Gülhan ve diğ.,2013). Th1, Th2 ve Th17 gibi T yardımcı (Th) hücreleri, patojenin bulunduğu yere doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini harekete geçirmeye ve çeşitli sitokinlerin salgılanmasına aracılık etmektedir(Kirby ve Reparaz,2018). Özellikle Th1, otoimmün hastalıklardan olan MS'e yönlendirici olduğu kavramı Deneysel Alerjik Ensefalit (DAE) modelleri tarafından desteklenmektedir (Yılmaz,2006). Th17 hücreleri yapılan birçok çalışmada, IL-17 salgılanmasıyla son zamanlarda enflamatuar ve otoimmün hastalıklarda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir(Li ve diğ.,2018). Bu çalışmalardan biri olan DAE' deki sakatlığın oluşumunda IL-17 üreten miyelin-reaktif T hücreleri arasındaki ilişki ile ilgili bağlantı olmasına dayanmaktadır(Cummings ve diğ.,2018). MS hastalarından alınan lezyon çalışmaları, aktif lezyonlarda IL-17 eksprese eden hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinin varlığını doğrulamaktadır(Høglund ve Maghazachi,2014). Düzenleyici T hücreleri (Treg) hücreleri, yabancı hedeflerine veya yanlış yönlendirilmiş immün

yanıtlarda yardımcı ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunda baskılayıcı bir rol oynar(Luo ve Ming,2018). Treg hücrelerinin varlığı T hücresi proliferasyonunu baskılayabilme yeteneklerini gösterirken, eksikliğinde ise supresör özelliğinden dolayı diyabet, gastrit, tiroidit ve iltihaplı bağırsak hastalığı gibi otoimmün hastalıklarla sonuçlandığı varsayılmaktadır(Zadeh ve diğ.,2016). Bunlara bağlı olarak Treg hücrelerinin lenf dokularındaki varlığı lenfositlerin göçünü inhibe ettiği düşüncesine varılmaktadır.

CD8+ T hücreleri ,antijen sunan hücreler (ASH)'in ve inflamasyonla artış gösteren ligandların yüzeylerindeki MHC-I molekülü ile bütünleşmiş antijenleri, sitotoksik T hücre reseptörleri sayesinde tanıyarak uyarılırlar(Beyaz,2004). MHC I sınıfı üzerinde viral peptitleri gösteren enfekte hücreleri, tümör hücreleri, işi bitmiş bazı hücreleri doğrudan öldürme yeteneğine sahiptirler (Heather ve diğ.,2015). CD8+ T hücrelerinin sıklığı iltihaplı plaklarda, BOS'ta ve kanda oligoklonal genişleme göstermesi MS'de patojenik bir role işaret etmektedir (Fletcher ve diğ.,2010).

Sonuç olarak multipl skleroz (MS), otoreaktif T hücre aracılı immünopatolojisi olan merkezi sinir sisteminin antijenlerini tanıyarak inflamasyon ve miyelin kılıf demiyelizasyon bozukluğuna neden olduğu düşünülmektedir(Şekil 5) (Sinha ve diğ.,2014). Multipl skleroz'un Th1 hücre etkili bir hastalık olduğu düşüncesi Deneysel Alerjik Ensefalit (DAE) modellerine dayanmaktadır(Yılmaz,2016). Hem DAE hem de MS için daha kabul edilen patojenik model, otoreaktif miyeline özgü CD4 + T hücrelerinin öncesinde periferde aktive olması sonrasında ise KBB'yi geçerek CNS'ye girmesi ve ASH'leri tarafından yeniden aktive edilmesidir (Tuosto,2015).



Şekil 5: T hücre kaynaklı MS patolojisi (Fletcher ve diğ.,2010)

B hücresi gelişimi, aktivasyonu ve olgunlaşması kemik iliğinde gerçekleşen adaptif hümmoral bağışıklık içerisinde yer alır. Antijen ile aktive olan B hücreleri, işlevi sentezleme ve antikorları salgılama işlevini sağlayan efektör plazma hücrelerine farklılaşır(Puri ve Paolo,2013). Plazma hücreleri fonksiyonel olarak işlevsel özelliklik kazanmaktadır. B hücrelerinin multipl skleroz (MS) patogeneğinde rol oynadığını destekleyen T hücresine antijen sunma özellikleri gibi yollarla katkıda bulunduğu varsayılmaktadır. Bu yollardan biri hem kronik MS plaklarında hem de akut MS lezyonlarında bulunan plazma hücrelerince üretilen otreaktif antikorlar MSS'de opsonin görevi görerek Fc reseptör aracılı fagositozu ve sitotoksosite yoluyla inflamatuarı indükleyerek inflamasyona ve demiyelinizasyona neden olur (Tüzün,2011;Acar,2015).

NK (Doğal öldürücü hücre) hücrelerinin, tümör hücrelerine ve bazı virüslerle enfekte olmuş hücelere karşı konak savunmasında önemli bir rolü bulunmaktadır (Judy Owen ve diğ.,2013). MS'in patogenezi ile ilgili literatür taramalarında, DAE modelinde, NK hücrelerinin tükenmesi, şiddetli tekrarlayan DAE ve belirgin şekilde

gözükten CNS patolojisi söz konusu olmuştur (Chanvillard ve Duarte,2013;Høglund ve Maghazachi,2014).

Antijen sunan hücreler içinde olan DC (Dendritik hücreler), efektör veya hafıza T hücrelerindeki TCR 'lerin aktive olmasında etkili olan kuvvetli ASH olarak kabul edilmektedir(Giles ve diğ.,2018). MS'li hastalarda sağlıklı bireylere göre daha yüksek düzeylerde proinflamatuvar sitokin salgılayan ve myeloid dendritik hücre bulundurdıkları saptanmış olarak dendritik hücreler CNS otoimmün inflamasyonuna katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz (Groves ve diğ.,2013).

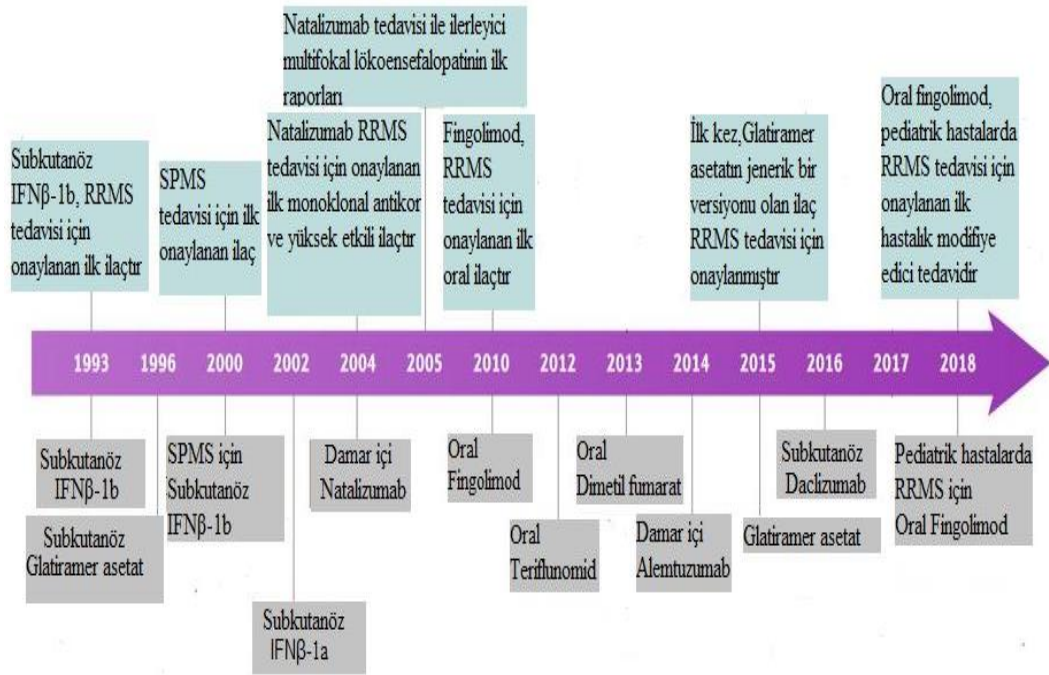
Kemokinler, monositler ve fibroblastlar için kemotaksis olarak adlandırılan bu sitokinler doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtları birbiri ile olan ilişkileri düzenlemede önemli rol oynarlar(Maghazachi,2012;Güner ve diğ.,1997). Kemotaksisin yanı sıra, nöronların gelişimi,impulsun sinaptik iletimi, hücre adezyon düzenlemesi, fagositoz, sitokin salınımı, matriks metalloproteinaz (MMP) salımı, T hücresi farklılaşması ve aktivasyonu, apoptoz gibi birçok işlevsel fonksiyonlarda rol oynarlar(Szczucinski ve Losy,2007). Demiyelinizan olan aktif bölgelerdeki lezyonlarda kemokinler tespit edilmiş ve relaps sırasında MS'li hastaların beyin omurilik sıvısında (BOS) yüksekliğiyle etkisi araştırılmıştır (Scand,2007).

Kemokinler çeşitli reseptörler ve bunlara eş olarak ligandlar bulundurmaktadır. Bunlardan MS ile ilişkilendirilenler arasında CXCR3 (CXCL10 reseptörü), lezyonlarda lenfositler üzerinde saptanırken , aktif MS lezyonlarında lenfositler, makrofajlar ve mikroglial hücreler üzerinde CCR5 (CCL5 reseptörü) lokalize olur ve CC-kemokin reseptörü 7 (CCR7) ise lenfositlerin lenf nodlarında daha uzun süre tutulmasını sağlamaktadır (Ransohoff,2002;Acar,2015).

1.2 Multipl Skleroz Tedavisi

MS hastalığında yapılan ve yapılmakta olan çalışmalar şunu göstermektedir ki hastalık üzerinde çevresel ve genetiksel faktörler birlikte rol oynamaktadır. Tedavi yöntemi olarak da birçok yöntem denenmesine ve uygulanmasına rağmen henüz kesin bir çözüm yolu bulunmamaktadır. Ancak erken tanı ve tedavi yöntemi kullanımı sonucunda olumlu yönde etkilere sahip olabilmektedir. Uygulanan ve

FDA tarafından da kabul gören birçok ilaç tedavisi uygulanmıştır ve hala uygulanmaktadır. Bunlardan hastalık modifiye edici tedaviler (DMT) mevcuttur: IFN-β ve Glatiramer asetat (GA) immünomodülatör olmak üzere kendi kendine enjekte edilebilir ilaçlar; immünosüpresif ajanlar olarak monoklonal antikor (Natalizumab, Alemtuzumab ve Daclizumab); ve üç oral bileşik (fingolimod, teriflunomid ve dimetil fumarat) teröpatik amaçlı olarak hastalığın ilerlemesini engelleme ve hastalık seyrinde görülen ataklarda azalma söz konusu olmuştur(Fox ve diğ.,2012).



Şekil 6:Hastalık modifiye edici tedaviler (Tintore ve diğ.,2018)

1.2.1 İmmünomodülatör İlaçlar

İnterferon beta (IFN-β),1993'te RRMS'li hastalarda yapılan ilk insan çalışmalarında FDA onaylı immünomodülatör tedavi niteliğinde deri altı enjeksiyon olarak kullanılmıştır (Buttmann ve Rieckmann,2014). Bağışıklık sisteminde bulunan hücrelerin özgül reseptörlerine bağlanarak bazı genlerin ekspresyonu baskılanması sonucu adezyon moleküllerinin miktarındaki azalma sonucunda enflamatuar

hücrelerin MSS'ine göçünün inhibe edilmesinde etkili olmuştur(Jankovic,2010). IFN- β ile MMP-9 seviyelerinde bir azalış söz konusu olmuştur(Yadav ve diğ.,2010). Bu bilgilere ek olarak, IFN- β , MS'nin immünopatolojisinde önemli bir role sahip olduğu düşünülen Th17 ve IL-17 sitokinini azalttığı yönde izlenimler bulunmaktadır(Dargahi ve diğ.,2007).

Glatiramer asetat, yapısında dört farklı amino asit (L-alanin, glutamik asit, lizin ve tirozin) içeren dizayn edilmiş polipeptit zincirlerinden oluşmaktadır. MBP'nin antijenik özelliklerini taklit ederek insan MBP'ye özel olan T-hücrelerinin IL-2 salgısını inhibe ettiği bulunmaktadır(Teitelbaum ve diğ.,1992). GA'nın, multipl sklerozun (MS) hayvan modeli olan DAE önleme ve baskılamada oldukça etkili olduğu gösterilmesine ek olarak MHC sınıf II'ye bağlı olduğu ve MS patolojisinde özellikle relapsing MS tipinde T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesi sonucunda tedavisi onaylanmıştır(Ziemssen ve Schrempf,2007).

1.2.2 Monoklonal Antikorlar

Natalizumab,relapsing-remitting MS (RRMS) tedavisi için ilk etkili monoklonal antikor olarak bilinmektedir (Tintore ve diğ.,2018,). İlk olarak,farelerde lenfositlerin yüksek endotelial venüller olarak adlandırılan kan damarları yoluyla lenf düğümlerine girdiği tespit edilmiştir(Gowans ve Knight,1964). Natalizumab, lenfositlerde ve miyeloid hücrelerde α 4-integrine bağlanarak lenfositler üzerindeki etkisi sayesinde MSS dokusuna lenfositlerin göçlerini ve onların pro-enflamatuar tepki oluşturmalarını inhibe eder(Ali ve diğ.,2013). Natalizumab kullanılan hastalarda yorgunluk,baş ağrısı,bulantı gibi yan etkiler gözlenmektedir.

Alemtuzumab, lenfositler, monositler ve diğer immün ve immün olmayan hücrelerde bulunan CD52 reseptörüne karşı geliştirilen bir monoklonal antikor terapisi olarak FDA onayından sonra satışa sunulmuştur(Cohen ve diğ.,2012; Coles ve diğ.,2012).Tedavi amaçlı olarak hematoloji, onkoloji (özellikle B-hücresi kronik lenfositik lösemi) ve transplantasyon alanlarında başarılı bir sonuç elde edilmesinden sonra multipl skleroz tedavisinde de uygulanmıştır(Katsavos ve Coles,2018). CD52'yi hedeflerken ortamda bulunan ve dolaşan T ve B hücrelerini

tüketir ve bununla birlikte immün sistemini düzenleyerek MS'in terapötik etkisinde rol oynadığı düşünülmektedir(Havrdova ve diğ.,2015).

Daclizumab, başlarda akut böbrek transplantasyonlarının önlenmesi için 1997 yılında FDA tarafından onaylanmıştır ancak düşük piyasa talebi sonucu durdurulmuş MS terapisi için tekrar kullanıma açılmıştır ancak güvenlik endişeleri nedeniyle Mart 2018'de geri çekilmesine yol açılmıştır(Dargahi ve diğ.; Tintore ve diğ.2018). CD25'e karşı T hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli IL-2 sinyalleşmesindeki anormalliklerin meydana gelmesi multipl skleroz ve diğer otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır.Bu durumda Daclizumad ,IL-2 sinyalini inhibe ettiği düşünülen insancillaştırılmış bir monoklonal antikor olarak kabul edilmektedir(Kappos ve diğ.,2015;Bielekova,2013).

1.2.3 Oral Tedaviler

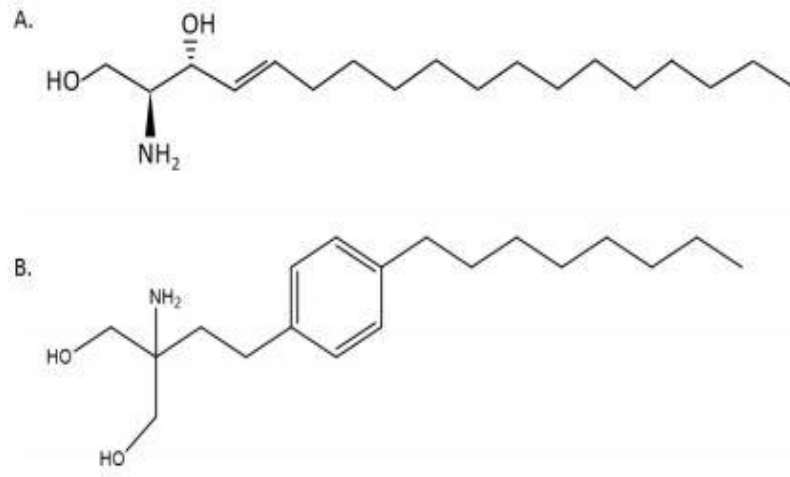
Teriflunomid, başta romatizmal artrit (RA) tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanan leflunomidin aktif metaboliti olarak bilinmektedir(Oh ve Connor,2014). MS'in tekrarlayan formlarının tedavisi için 2012 yılında onay alınmasıyla günlük bir tablet halinde kullanılmaktadır. Kesin bir etkisinin görülmemesiyle birlikte ,MS cevabında lenfositlerin pirimidin sentezinde rol alan mitokondriyal enzim olan dihidroorotat-dehidrojenaz (DHODH)'ı bloke edilmesine bağlı olarak lenfosit çoğalmasını engellediği düşünülmektedir (Jiwon ve Paul,2014 ; Bar ve diğ.,2014).Tedavisinin yanında yan etki olarak karaciğer problemlerine ve doğum kusurlarına yol açabileceği düşüncesiyle FDA tarafından “kara kutu” uyarısını taşımaktadır(Anonim,2018). Görülen bazı yan etkileri de bulantı, saçlarda dökülme, karaciğer fonksiyonlarında bozulma gibi durumlar söz konusu olabilmektedir.

Dimetil fumarat (BG-12), Fumarik asit ve esterlerinin tuzları fumaratlar olarak bilinen fumarik asidin dimetil esteridir ve doğada bazı bitki ve mantarlarda fumar veya toprak dumanı (Fumaria officinalis) olarak bilinmektedir(Linker ve Gold,2013).Tedavi amaçlı olarak enflamatuvar sitokinler, kemokinler ve adezyon moleküllerinin ekspresyonundan sorumlu olan nükleer faktör kappa B'nin (NF-κB)

hücre çekirdeğinde translokasyonunu azalttığı ve apoptozu indükleyici etki gösterdiği bilinmektedir(Lin ve Lisi,2011).

1.2.3.1 Fingolimod

Fingolimod (2-amino-2-(2-(4-octilfenil)etil)propan-1,3- diol hidroklorid) Isaria sinclairii adlı mantardan izole edilen yapısal olarak endojen sfingozine benzeyen lipofilik bir moleküldür (Şekil 5) (Altunrende ve diğ.2017). Fingolimod, Eylül 2010'da FDA tarafından onaylanarak birçok ülke tarafından ilk oral ilaç olarak kabul edilmektedir.Türkiye'de de Nisan 2011'de ruhsat alarak kullanılmaya başlanmıştır. Fingolimod, multipl skleroz (MS) hastalarında, hastalık sıklığını azaltığı düşünülen doğal sfingozinin bir yapısal analogudur. Doğal bir bioaktif sfingolipid yapısında olan Sfingozin 1-fosfat (S1P), inflamasyon ve onarımda önemli rol oynamaktadır(Miron ve diğ.2008).

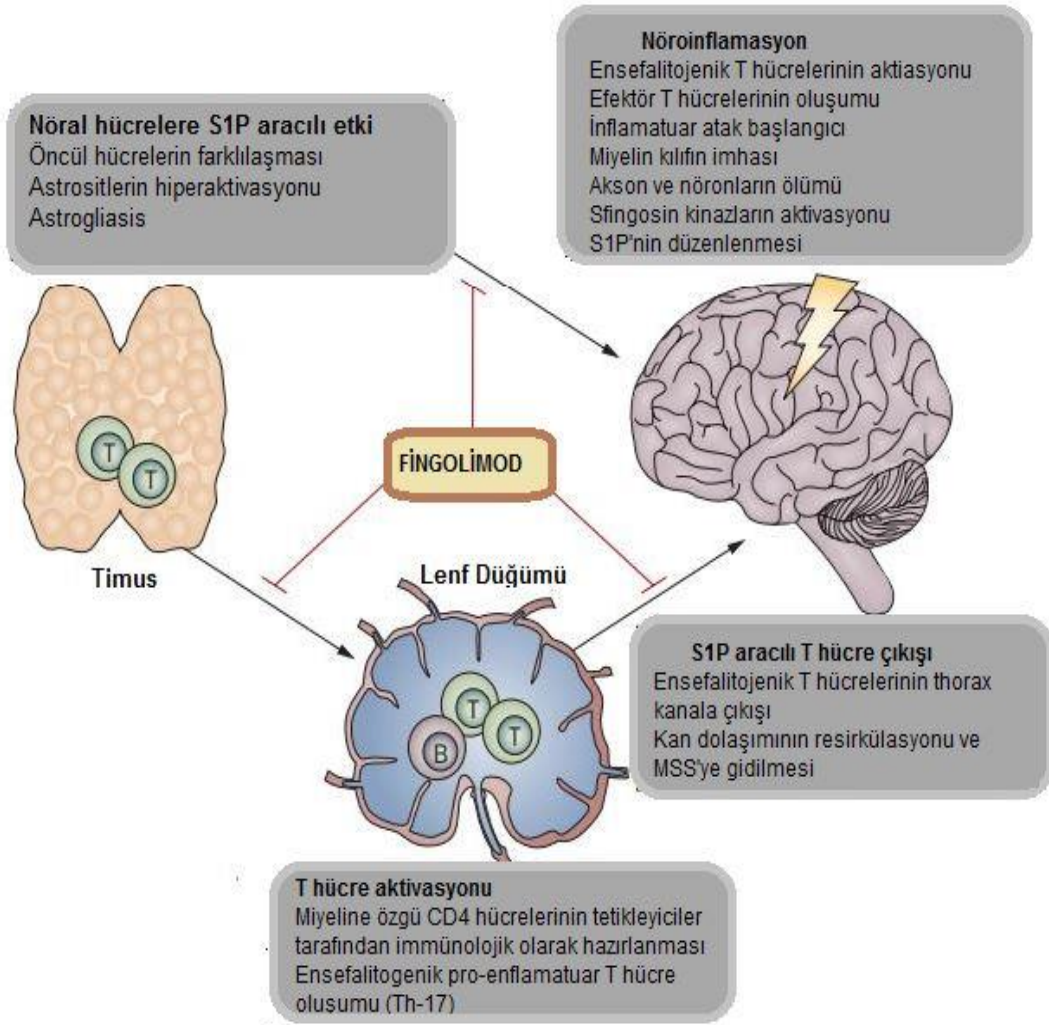


Şekil 7:Fingolimod kimyasal yapısı A. Sfingozin 1-fosfat,B.Fingolimod (White ve diğ.,2016)

S1P, doğuştan gelen bağışıklık sistemi ve MSS'de endotelial hücreler, nöronlar ve astrositler tarafından ekspre edilir ve immün ve nöral hücreler üzerinde hücre iletişimleri içerisinde olabilir (Miron ve diğ.,2008). S1P, B ve T gibi bazı lenfositlerin yüzeyinde bulunan S1P1 reseptörleriyle etkileşerek onların aktive olarak lenf nodlarından çıkışlarını düzenler. S1P'in G proteinine bağlı 5 (S1P1, S1P2, S1P3,

S1P4 ve S1P5) bilinen reseptör izoformu bilinmektedir. S1P1, S1P2 ve S1P3 reseptörleri çoğunlukla doku hücrelerinde bulunurken , S1P4 bağışıklık sistemi hücrelerinde, S1P5 ise dalakta (doğal öldürücü hücreler ve diğer lenfositler) ve merkezi sinir sisteminde (CNS; özellikle oligodendrositlerde) ifade edilmektedir (Groves ve diğ.,2013). S1P oluşumunu fosfatlayan sfingosin kinazın doğrudan hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayarak kemokinlerin ve sitokinlerin üretimini bu şekilde etkilediğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Barra ve diğ.,2017).

FTY720, aktive edilmek üzere sfingosin kinaz (SphK) 1/2 ile fosforile edilir. Fosforile edilmiş FTY720, S1P1'in lenfositler üzerinde içselleştirilmesine neden olan S1P1 reseptörüne bağlanır ve böylece lenf düğümlerinden ve timustan lenfositlerin çıkışını inhibe etmiş olmaktadır (Draayer ve diğ.,2017). Böylece otoraktif lenfositlerin inflamatuvar ve doku hasarına neden olduğu düşünülen CD4 + ve CD8 + T hücrelerinin sayısını azalttığı yönündeki tartışmaları desteklemektedir. Fingolimod, lipofilik özelliğinden kaynaklı olarak hücre zarından kolaylıkla geçebilmektedir. Ayrıca, santral hafıza T hücrelerine olan etkisi efektif hafıza T hücrelerine olan etkisinden daha belirgin olmakla birlikte MS'te BOS'taki T hücrelerin %90'ından fazlası santral hafıza T hücrelerin oluşturması, fingolimodun MS'teki terapötik yönündeki etkisi ile açıklanabilir (Acar,2015). Fingolimod, timus ve lenf düğümleri gibi lenfoid organlardan lenfositlerin çıkışını inhibe ederek TH17 ve diğer T hücrelerinin hücrelerinin MSS'ye geçişini önler ve böylece olası hastalık ilerleyişini engelleme durumu söz konusu olmaktadır(Şekil 8;Brinkmann,2009).



Şekil 8:Multipl sklerozda fingolimodun etkileri (Brinkmann,2009)

Sonuç olarak fingolimod ile tedavi lenfosit oluşumuna ve gelişimine bağlı olarak genel periferik kan lenfosit sayısında azalma ile ilişkilendirilmektedir. Fingolimod terapötik etkilerinin yanında her ilacın bir yan etkisinin olabileceği gibi fingolimod, özellikle ilk doz kullanımına bağlı olarak kalp atışında azalma, makula ödemi, enfeksiyon riski gibi durumlar göz önüne alınarak tedavi sırasında hastada gerekli parametrelerin yapılması gerekmektedir (Alaoui, 2017; Altunrende ve diğ., 2017).

1.2.4 Alternatif Tedaviler

Multipl skleroz, merkezi sinir sisteminde (MSS) demiyelinizasyon ve akson kaybı ile karakterize otoimmün hastalık olması nedeniyle ABD’de FDA tarafından onaylanmış birçok ilacın olmasına rağmen henüz kesin bir tedavinin olmaması ile ilaçların yan etkilerin olması MS’li birçok kişinin , hastalıklarını kontrol altına almak ve semptomlarını tedavi etmek için alternatif tıp ve tamamlayıcı tedavilerini denemelerine yol açmıştır(Yadav,2010). Çok çeşitli tamamlayıcı ve alternatif tıp arasında diyet modifikasyonu , omega-3 yağ asitleri , amalgam dolularının, vitaminlerde E, B, D ve en sık olarak C takviyesi, homeopati , selenyum, lipoikasıit , kalsiyum orotate, arı iğneleri, inek kolostrumu, hiperbarik oksijen, prokarin, çelasyon, akupunktur, akubasinç gibi çeşitli tamamlayıcı ve alternatif çözümler belirtilmektedir (Schwarz,2008;Özbülbul,2012). Bütün bunların yanında bitkisel tedaviler de multipl skleroz hastalığı için alternatif bir çözüm yolu olmuştur. MS için kullanılan bazı şifalı bitkiler ve türevleri; Ginkgo biloba, Zingiber officinale, Curcuma longa, Hypericum perforatum, Valeriana officinalis, Vaccinium macrocarpon, Nigella sativa, Piper methysticum, Çiğdem sativus, Panax ginseng, Boswellia papyrifera, Vitis vinifera, Camella, Capparisovata(Kappari) gibi bitkiler MS hastalarında birçok terapötik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir(Mojaverrostami,2018;Özgün-Acar ve diğ.2017). Sonuç olarak birçok hastalık modifiye edici ilaçlar ve bunun yanında tamamlayıcı ve alternatif tedaviler milyonlarca hastaya umut olmuş ve umut verici olmaya da devam etmektedir. MS hastalığında kullanılan tedavi yöntemleri şüana kadar atakların sıklığını azaltıcı yada otoimmüniteye neden olduğu düşünülen bağışıklık hücrelerini engelleyici yönünde olmuştur.Yapılan birçok çalışmada kullanıla tedavi yöntemlerin kesin sonuç vermemesi arayışları devam ettirmektedir.

1.3 Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında; Multipl Skleroz hastalığında kullanılan fingolimod (ticari isimi Gilenya) türevi bir ilaç bileşimini MS hastalığına karşı etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. ST-1505 bileşimi bir tip G-protein aracılı reseptör olan Histamin H3- reseptörü hedeflenerek Düsseldorf Heinrich Heine Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Prof. Dr. Holger STARK tarafından sentezlenmiştir.

Bu bileşik bizim laboratuvarımızda da bir başka G-protein aracılı reseptör olan S1P reseptörlerine olan etkisi SH-SY5Y nöroblastoma ve CCRF-CEM (CCL-119) hücre hatlarında, önceki çalışmalarımızda MS ile ilişkilendirdiğimiz genlerin ifadelerine olan etkileri test edilerek Multipl skleroz için etkinliği araştırılacaktır.

Bu projeye birlikte, antagonist, antitümör, immünsüpresif gibi çoklu hedefler üzerine etkiler gösterebilecek, etkinliği yüksek, yan etkileri mevcut diğer ilaçlara göre az olan fingolimod türevi yeni bir ilaçların literatüre kazandırılması amaçlanmaktadır. Bununla birlikte Alman partnerlerimiz ile ikili iş birliğini geliştirmekte ayrı bir amacımızdır. Ayrıca uzun vadeli hedefler arasında bu fingolimod türevi ilaçların üretimini ticari ölçüğe getirerek ilaç sektörüne sunmak yatmaktadır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kullanılan Cihazlar

Deney süreç aşamalarında kullanılan cihazlar; Soğutmalı/soğutmasız santrifüjler, PZR cihazı, Kuru blok ısıtma termostatu, DNR jel görüntüleme sistemi, Agaroz jel elektroforez sistemi, Thermo Scientific Maestrogen Nanodrop cihazı,Laminar Flow, CO2 Air İnkübatör, Hücre Sayıcı, -85 °C Ultralow Freezer, Bioneer Exi Spin PZR tüp karıştırıcısı, Human Power Scholar-UV saf su sistemi, HVE-50 otoklav, mikroskop , pH metre, Nüve ST 402 su banyosu, Labnet vorteks karıştırıcı, klasik ve hassas tartı kullanılmıştır.

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fosfat Tamponlu Salin (PBS),L-Glutamin , Sığır serum albumin,EasyScript™ Plus cDNA Sentez Kiti, Fetal Sığır Serumu (FBS) Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640) Besiyeri ,Penislin-Streptomisin karışımı, RNeasy Plus Mini Kit , Oligo- DNA , UltraFlux kapaklı PZR tüpleri, KiloGreen 2X qPCR (MasterMix-KS), ABM Easy Script Plus cDNA sentez kiti , Qiagen RNeasy Plus Mini kit, DMSO(Dimetil sülfoksit),Trypan blue,Tripsin, Trizol Reaktif kullanılmıştır.

2.1.3 Hücre Kültürü

Fingolimod türevi orijinal ST-1505 bileşiği için iki farklı insan hücre hattı [nöroblastoma: SHSY-5Y ve T-lenfoblastoma: CCRF-CEM (CCL-119)] kullanılarak Multipl Skleroz hastalığı üzerindeki etkinliği için çalışmalar yapıldı.

Çalışma sırasında kullanılan insan T-lenfolastoma [CCRF-CEM (CCL-119)] hücre hattı için %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin, içeren 500ml Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI) kullanıldı. Hücreler 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde bekletildi. -80 °C olan Freezer'de %10 Dimetil sulfoksit (DMSO) içerisinde saklanan hücreler 37 °C'de oda sıcaklığında eriyene kadar bekletildi. Hücreler eridikten sonra 2500 xg hızda 5 dakika santrifüj yapıldı üst supernatant atıldıktan sonra pelet 1 ml RPMI ile çözüldü. Flasklara ekilen hücrelerin üzerine 5 ml RPMI besi ortamı eklenerek 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 1 gün inkübe edildi. Hücreler flaskı doldurduktan sonra santrifüj edilerek yoğunluğuna göre yeni flasklara edildi.

İnsan nöroblastoma (SHSY-5Y) hücre hattı için %20 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin içeren 500ml Eagle's Minimal Esansiyel (EMEM) besi ortamı içerisinde 37 °C,%5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilerek büyütülmeleri sağlandı. -80 °C'de %10 Dimetil sulfoksit (DMSO) içerisinde saklanan hücreler 37 °C oda sıcaklığında bekletildi. Eridikten sonra hücreler petrilere eşit miktarda ekildi ve üzerine 5 ml EMEM besi ortamı eklenerek 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 1 gün inkübe edildi. Bir sonraki gün DMSO'dan kurtarmak için besiyeri alınarak PBS ile yılandı.Yıkanan hücrelere tekrar yeni 5 ml EMEM eklendi.CO₂ inkübatöründe hücreler deney için yeterli stok sayısına ulaşmıncaya kadar yukarıda belirtilen şartlarda inkübe edildiler. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirilerek takip edildi.Yeterli hücre yoğunluğuna sahip petrilere besiyerleri çekilerek boşaltıldı.Yapışan hücreler olduğu için %0,25'lik tripsin ile muamele edilen petrilere 5 dk inkübe edildi. Petrilere %0,25'lik tripsinin inaktif hale gelmesi için iki katı şeklinde besiyeri eklenildi.Yapıştıkları yerden kalkan hücreler falkona alınarak 2500 xg hızda 5 dakika santrifüj edildi ve yeni petrilere ekildi.

2.1.3.1 Sitotoksisite Çalışmaları

Fingolimod (ticari isimi Gilenya) türevi ST-1505 bileşiği sitotoksisite deneyleri için uygun çözücülerle çözüldükten sonra steril hale gelmesi için 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi. 12 kuyucuklu well'e ekilecek olan CCRF-CEM hücrelerin sayısı endoporfita hazırlanan tripan blue (1:1000) ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı ve hücreler bu sayım işlemine göre hesaplanarak ekildi.

Süspansiyon için flasktan alınan hücreler 15 ml'lik steril falcon tüplere besiyeri içinde olan hücreler alınıp, 2500 xg' de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılıp, dibe çöken hücreler 1 ml besiyeri içinde çözüldü. Hücre sayısı hesaplandıktan sonra her kuyucukta 1×10^3 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu well'e ekildi ve kuyuların üzeri toplamda 1 ml olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. Hücrelerin toparlanması için 24 saat %5'lik CO₂ inkübatöründe, %95 nem ortamında bekletildi. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda ST-1505 bileşiği hücrelere uygulandı. Kontrol grubuna ise sadece besiyeri ve çözücü konuldu. 24 saatin sonunda 12 kuyucuklu welldeki süspansiyon hücreler doğrudan steril falconlara alındı. 2500 xg hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerdeki sitotoksisite testi farklı konsantrasyonlarda test maddesi uygulanmış hücreler tripan blue ile sayıldı. SHSY-5Y hücrelerinde ise 24 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı, sonrasında her kuyucuğa 100 µl yeni besiyeri eklendi. Hücreler üzerine sitotoksisite deneylerinde kullanılan 10 µl WST reaktifi eklenerek hücrelerdeki canlılık oranları ELISA okuyucu ile 450-690 nm'de ölçüldü. Bu ölçümün sonunda kontrol grubu farklı konsantrasyonlardaki ST-1505 ile muamele ettiğimiz gruplar karşılaştırılarak hücrelerdeki canlılık etkisine oranları tespit edildi.

2.1.3.2 Hücreslere Bileşiklerin Uygulaması

Hücre hatlarımızda St-1505 bileşigi için EC5 ve EC10 değeri sitotoksisite deneyi ile sonuç çıkarıldıktan sonra bu dozların hücrelerdeki belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerindeki etkisini test etmek için hücre kültürü ortamında steril (laminar flow) şartlarda hücelere uygulandı. Bunun için 40ml'lik flasklara ve petrilere 10^6 hücre ekildi ve 24 saat inkübasyonun ardından belirlenen dozlar SHSY-5Y ve CCRF-CEM hücelerine uygulandı. Bileşik uygulaması yapılan hüceler, uygulama yapıldıktan 24 saat sonra RNA izolasyonu için toplandı.

2.2 METOT

2.2.1 Çalışmalarda Kullanılan Etken Madde

Proje kapsamında çalışılacak olan fingolimod türevi ST-1505 bileşiği Düsseldorf Heinrich Heine Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Prof. Dr. Holger STARK tarafından sentezlenmiştir.

2.2.2 RNA İzolasyonu

Besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. İsteğe bağlı olarak besiyerinin uzaklaştığından emin olana kadar birkaç defa daha yıkama işlemi yapılabilir. Yıkama işleminin ardından hücre yoğunluğuna göre 350- 600 µl trizol reaktifi eklendi. Bu işlem neticesinde hücreler mukusumsu bir yapı hale geldi. Lizis tamponu hücre kazıyıcı ile iyice hücreler üzerine yayıldı ve toplanıp ependorfa alındı. Süspanse olan hücreler ise steril falkonlara alınarak 2500 xg'de santrifüj edilerek supernatant atıldı ve PBS eklenerek tekrar bir santrifüj işleminde sonra ependorflara alındı. Birkaç kez yavaşça altüst edildi.

Süspansiyona 150 µl soğuk kloroform eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından buz üzerine alınarak beş dakika boyunca bekletildi. +4 C'de 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek ve üst sıvı kısım dikkatli bir şekilde yeni ependorflara alındı. Aynı hacimde ependorflara soğuk izopropanol eklendi. Birkaç kez yavaşça altüst edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve +4 C'de 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan pelet üzerinde 1 ml %70'lik soğuk EtOH eklendi. 7500 rpm'de. +4 C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar süpernatant uzaklaştırıldı, pelet alev çatısında kurumaya bırakıldı. Kurutulan peletin üzerine yoğunluğuna göre 20-45 µl RNaz içermeyen su eklenerek mini santrifüjde 9000 xg'de 1 dakika 15 saniye santrifüj edildi. İzole edilen RNA örneklerinin saflığının kontrolünün belirlenmesi için Nano Drop kullanılarak ölçümü yapıldı. RNA'nın saflığını

değerlendirirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakıldı. A260/A280 oranının yaklaşık olarak 1,9 ve A260/A230 oranının ise 1,8 ile 2,2 arasında olması izole edilen RNA'nın saf olduğunu gösterir. RNA bulunan ependorf etiketlenerek -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi İle RNA Görüntülenmesi

İzole edilen RNA'lar yatay agaroz jel elektroforezinde yürütülmek üzere, %1'lik agaroz jel Tris-Asetik asit-EDTA(TAE) tamponunda hazırlandı. Agaroz mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Tam çözünme sağlandıktan sonra agaroz solüsyonu soğutuldu ve üzerine 0,75 - 1µl Etidyum bromür (EtBr) eklendi. Bu karışım elektroforez tablasına dökülerek katı hale gelmesi için bekletildi. Katılaştıran jel, RNA'nın - kutuptan + kutuba yürüyebilmesi için elektroforezin - kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tank seviyesi 1X TAE tamponuyla dolduruldu. Bu tampon RNA'nın jel üzerinde yürütmesini sağlamaktadır. 3 µl RNA örneği, 5 µl steril su, 2 µl yürütme boyası karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara mikropipet yardımıyla dikkatli şekilde yüklemesi yapıldı. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 volt, 500 mA'de 40 dakika yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde incelenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazıyla görüntüsü alındı.

2.2.4 cDNA Sentezi

Nanodrop cihazında konsantrasyonlarında ve Agaroz Jel Elektroforezi sonucunda görüntüsünde kaliteli total RNA'lar kullanılarak ABM cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bir PZR tüpü içerisinde 2,5 µg total RNA kit içerisindeki oligo d(T) primerleri (1µl), dNTP çözeltisi (1µl) ve RNAz içermeyen su (bu aşamada son hacim 14,5 µl olacak şekilde eklendi) ile karıştırılarak 65°C'de 5 dakika ısıtıcıda inkübe edildi. Sonrasında yine kit içeriğinde yer alan reaksiyon tamponu (4 µl), RNAz inhibitörü (0,5 µl) ve

'EasyScript RTase' enzimi (1 µl) sırasıyla eklenerek birleştirildi. Elde ettiğimiz son hacim 20 µl oldu ve 50°C'de 50 dakika inkübe edilerek cDNA sentezlenmesi sonunda, enzimin inhibe edilmesi için 85°C'de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar sonrasında RT-PZR yapılmak üzere -20 derecede saklandı. cDNA sentez karışımı prosedürü aşağıdaki tabloda belirtilmektedir.

Tablo 4:cDNA Sentez Karışımı ve Prosedürü

cDNA SENTEZ KİTİ BİLEŞENLERİ	HACİM	SON HACİM
Total RNA or poly(A) + mRNA	Değişken	1 ng - 2 µg/rxn 1 pg - 2 ng/rxn
Gen spesifik primer(Oligo (dt) (10µM)	1 µl	0.5 µM
dNTP Karışımı (her biri 10mM)	1 µl	500 µM
RNAaz içermeyen su	Değişken	-
Karışım 5 dakika 65 C ısıtıcıda inkübe edildi.		
5X RT tampon	4 µl	1X
Ribonükleaz inhibitörü(40U/µl)	0,5 µl	20 U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1 µl	200 U/rxn
TOPLAM HACİM	20 µl	

2.2.5 Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları için ABM Kilogreen qPCR Mastermix kiti kullanılarak içerisinde bulunan prosedüre göre uygulaması yapıldı. Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen sonuçlar Exicycler 3 programında hesaplaması yapıldı ve "house keeping" gen olan beta aktin (ACTB)'e göre normalize edildi. Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bunlara göre elde edilen Ct (threshold) değerleri kullanılarak genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimler incelenerek yapılan uygulamanın sonuçları yorumlandı. Bir PZR için olması gerekenler Tablo 5'de yer almaktadır.

Tablo 5: PZR koşulları

PZR Bileşenleri	Karışım
2X Master Mix	12,5 ml
cDNA	5M (3ml su+2ml cDNA)
F primer	0,9 ml
R primer	0,9 ml
dH ₂ O	5,7 ml

Tablo 6: Sıcaklık ve Zaman Koşulları

	Sıcaklık-Zaman
Ön denatürasyon	94°C - 5 dakika
Denatürasyon	94°C - 25 saniye
Yapışma	45°C - 72°C - 45 saniye
Uzama	72°C - 30 saniye
Döngü sayısı	30 – 35

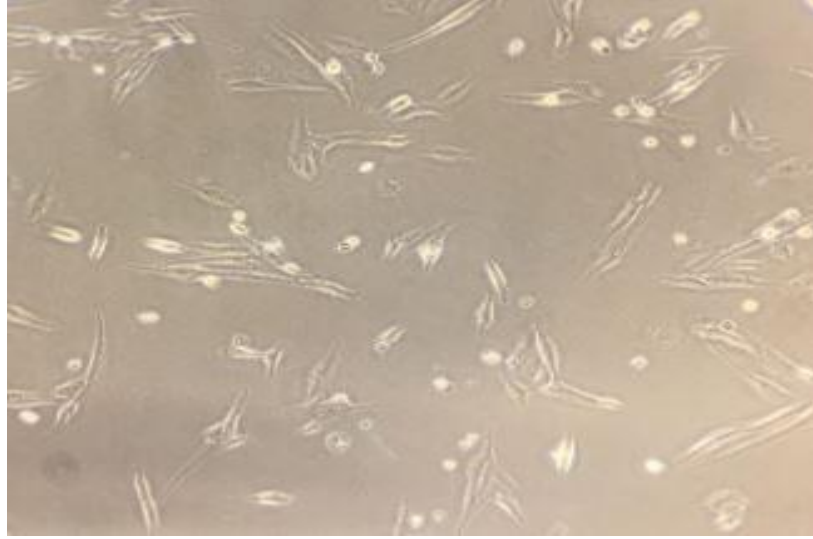
Tablo 7: İnsan T-lenfoblastoma: CCRF-CEM ve SK-N-SH hücre hatlarının çalışmalarında kullanılan primer dizileri.

Gen Adı	İleri Primer (5'→3')	Geri primer (5'→3')
<i>ACTB</i>	<i>GCCGCCAGCTCACCAT</i>	<i>GATGCCTCTCTTGCTCTGGG</i>
<i>APP</i>	<i>GCCCTGCGGAATTGACAAG</i>	<i>CCATCTGCATAGTCTGTGTCTG</i>
<i>C1S</i>	<i>TTTGGCATGGGTTTATGCTGA</i>	<i>GGGTGAAGTAGAGGTGAATCCC</i>
<i>CCL3</i>	<i>CATGGCTCTCTGCAACCAGT</i>	<i>ACTGGCTGCTCGTCTCAAAG</i>
<i>CCL5</i>	<i>CAGTCGTCTTTGTACCCGA</i>	<i>AGAGCAAGCAGAAACAGGCA</i>
<i>CD44</i>	<i>CTGCCGCTTTCAGGTGTA</i>	<i>CATTGTGGGCAAGGTGCTATT</i>
<i>CSF1</i>	<i>ATGCTCCAGCCAAGATGTGG</i>	<i>ACTGCTAGGGATGGCTTTGG</i>
<i>CXCL10</i>	<i>ACCAGAGGGGAGCAAATCG</i>	<i>GGAAGTGATGGGAGAGGCAG</i>
<i>CXCL9</i>	<i>GGCTCTTCTGGCTACTCC</i>	<i>TCCCTGGTCCCTGTAGTGAG</i>
<i>CXCR3</i>	<i>GTCCTTGAGGTGAGTGACCA</i>	<i>CAGCAGAAAGAGGAGGCTGT</i>
<i>FOXP3</i>	<i>GTGGCCCGGATGTGAGAAG</i>	<i>GGAGCCCTTGTCGGATGATG</i>
<i>GFAP</i>	<i>GTGTCAGAAGGCCACCTCAA</i>	<i>TCAGGTCTGGGGAAATGTGC</i>
<i>HLA-DRB1</i>	<i>CCCTGAGTGAGACTTGCCTG</i>	<i>GACACTCCCTCTTAGGCTGC</i>
<i>IL10</i>	<i>TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA</i>	<i>TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA</i>
<i>IL1B</i>	<i>ACCTGTCTGCGTGTTGAAA</i>	<i>AGACGGGCATGTTTTCTGCT</i>
<i>IL6</i>	<i>ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG</i>	<i>CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG</i>
<i>MAG</i>	<i>CCAAGTAGTCCACGAGAGCTT</i>	<i>CAGGTCCCCACGGAAGTAGT</i>
<i>MBP</i>	<i>TCGGCTCACAAGGGATTCAAG</i>	<i>TGATCCAGAGCGACTATCTCTTC</i>
<i>MMP9</i>	<i>GGGACGCAGACATCGTCATC</i>	<i>TCGTCATCGTCGAAATGGGC</i>
<i>NFKB1</i>	<i>TCGCGCTGAGTATAAAAGCC</i>	<i>GGCAAAGTTTCGTGGATGCG</i>
<i>PLP1</i>	<i>GAAAGCCCTTTTCATTGCAGGA</i>	<i>GGCTAGTCTGCTTTGTGGCT</i>
<i>STAT3</i>	<i>AACAGGATGGCCCAATGGAA</i>	<i>GAAGCGGCTATACTGCTGGT</i>
<i>TGFB1</i>	<i>TACCTGAACCCGTGTGCTCTC</i>	<i>GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA</i>
<i>TNF</i>	<i>TGGGATCATTGCCCTGTGAG</i>	<i>GGTGTCTGAAGGAGGGGGTA</i>

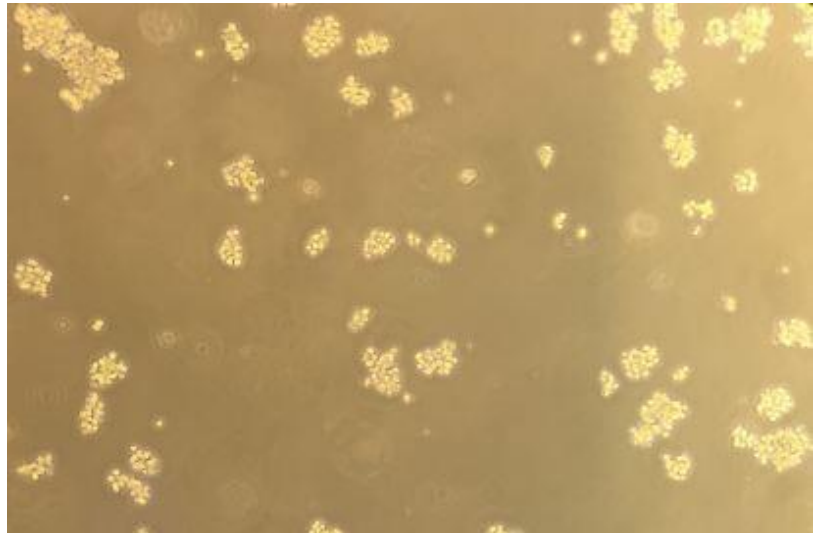
3. BULGULAR

3.1 CCRF-CEM ve SHSY-5Y Hücreleri

Hücrele kültüründe sırasında uygun büyüme ortamında elde ettiğimiz hücreler mikroskopta incelenmesi sonucunda Şekil 9 ve Şekil 10 'de gözlenmektedir.



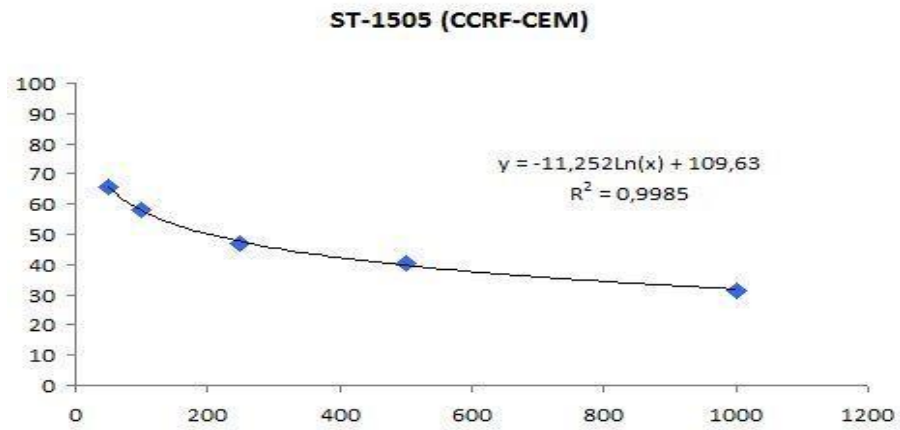
Şekil 9:SHSY-5Y Hücresinin Mikroskobik Görüntüsü



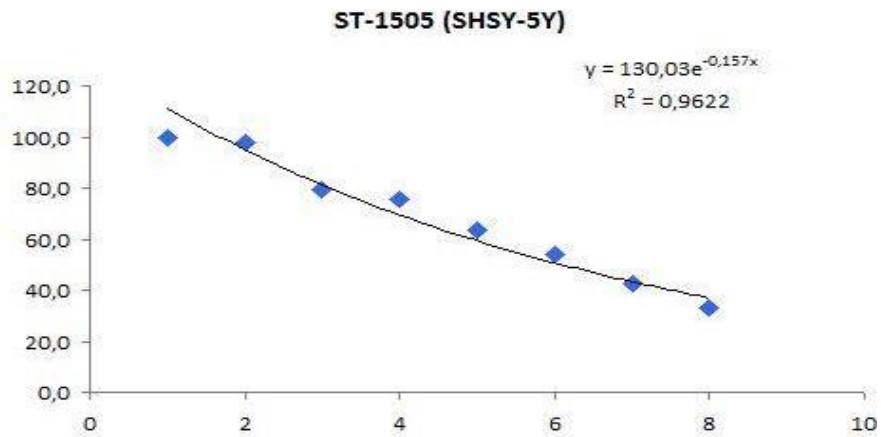
Şekil 10:CCRF-CEM Hücresinin Mikroskobik Görüntü

3.2 ST-1505 Bileşiminin Hücre Canlılığına Etkisi

Hücre canlılığı testi için bileşik 1ml besiyerinde çözülerek 0,2 mikronluk steril filtrelerden geçirildi. Önceden 12 kuyucuklu wellle (1×10^3 kuyucuk) ekilen CCRF-CEM (CCL-119) hücre hattı için hazırlanan bileşik farklı konsantrasyonlarda uygulanarak kontrole göre hücre canlılığı karşılaştırıldı. Daha önce 96'lık plakaya (1×10^3 kuyucuk) ekilen SHSY-5Y hücre hattına hazırlanan bileşik farklı konsantrasyonlarda uygulandı. 24 saat inkübasyonun sonunda bileşimin hücrelerin canlılığına olan etkisi belirlendi (Şekil 11,12).



Şekil 11: ST-1505 bileşiminin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi

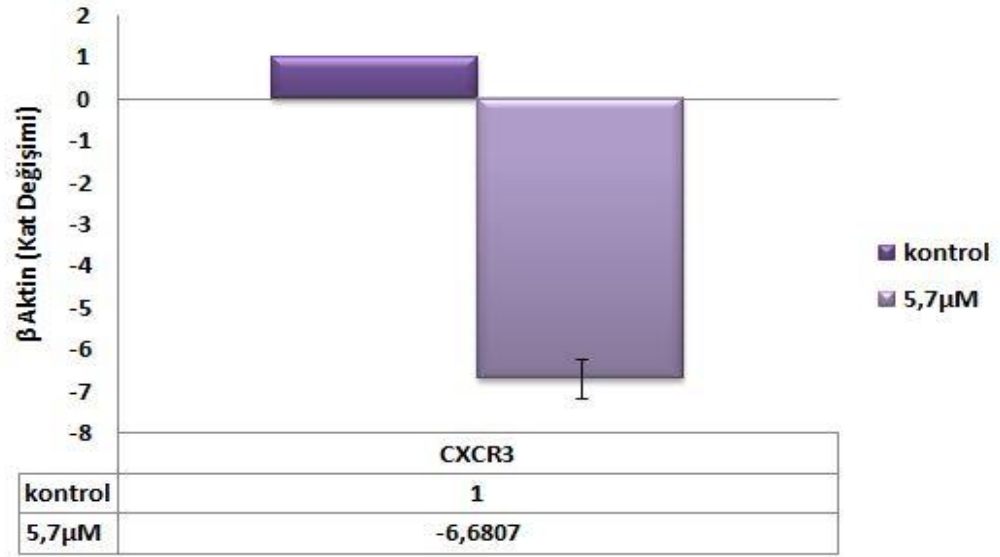


Şekil 12: ST-1505 bileşiminin SHSY-5Y hücre canlılığına etkisi

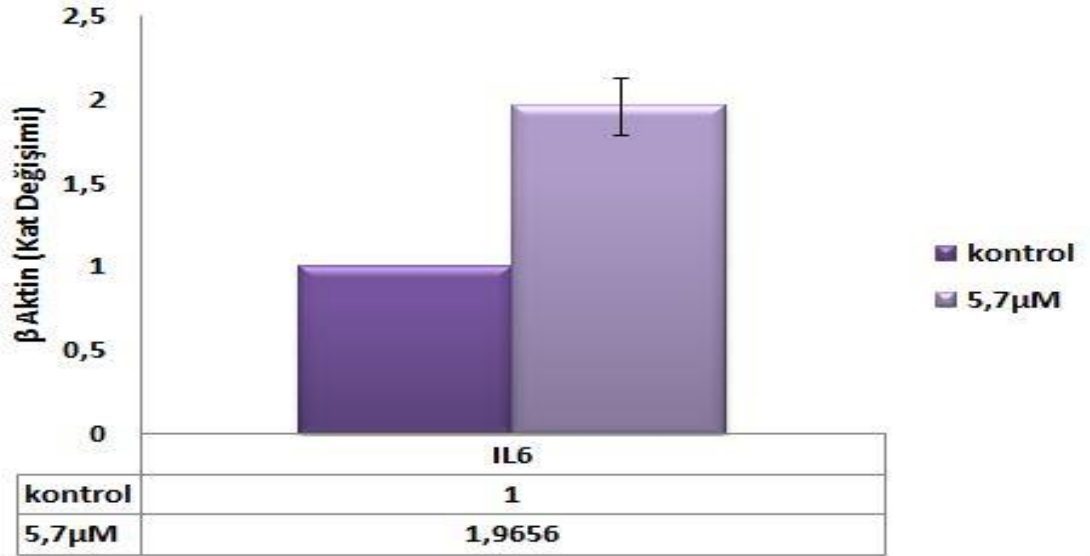
Sitotoksosite testi sonunda $y=ax+b$ denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC10 değeri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda ST-1505 bileşiminin $5,7 \mu\text{M}$ dozunun kullanılmasına karar verildi.

3.3 ST-1505 Bileşiminin CCRF-CEM Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

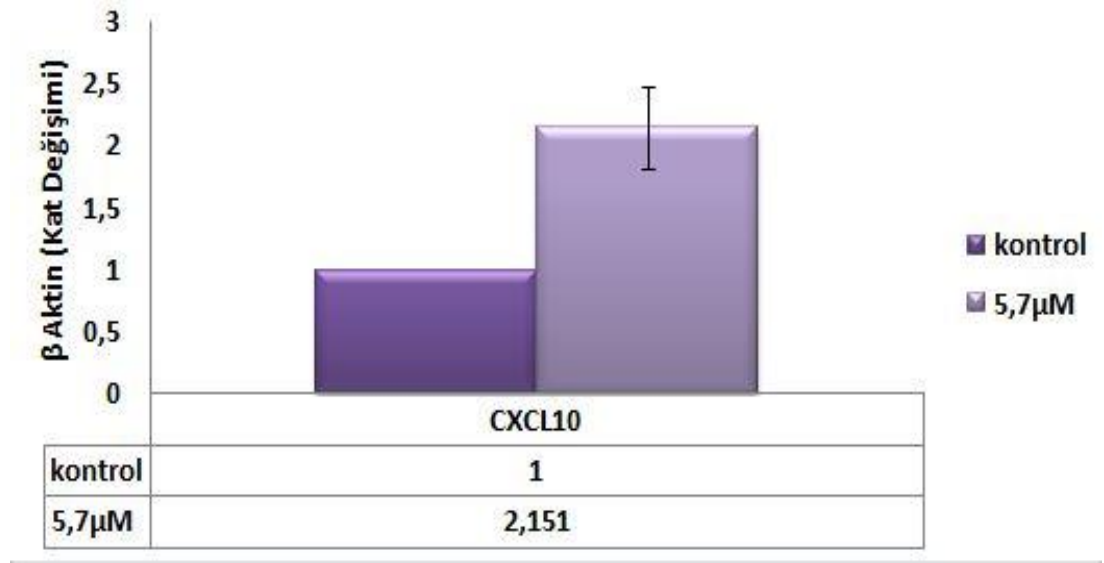
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendi ve hücrelere belirlenen dozda ST-1505 bileşiği uygulandı. 24 saat inkübasyonun sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. CCRF-CEM hücrelerinde ST-1505 ile EC10 dozunda çalışmaya devam edildi. ST-1505 bileşiminin 5,7 μ M doz uygulamasında IL6, CXCL10, CXCR3, TNF, GFAP, CXCL9, HLA-DRB1, STAT3 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimi incelendi. Bu bağlamda CXCR3 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 6,68 kat azalış gözlemlendi (Şekil 13). IL6 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,96 kat artış gözlemlendi (Şekil14). CXCL10 geninin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında 2,15 kat artış gözlemlendi (Şekil 15). GFAP geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,75 kat artış gözlemlendi (Şekil 16). TNF geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,65 kat azalış gözlemlendi (Şekil 17). Aynı şekilde CXCL9 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 8,00 kat azalış gözlemlendi (Şekil 18). HLA-DRB1 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 6,75 kat azalış gözlemlendi(Şekil 19). STAT3 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,42 kat azalış gözlemlendi (Şekil 20).



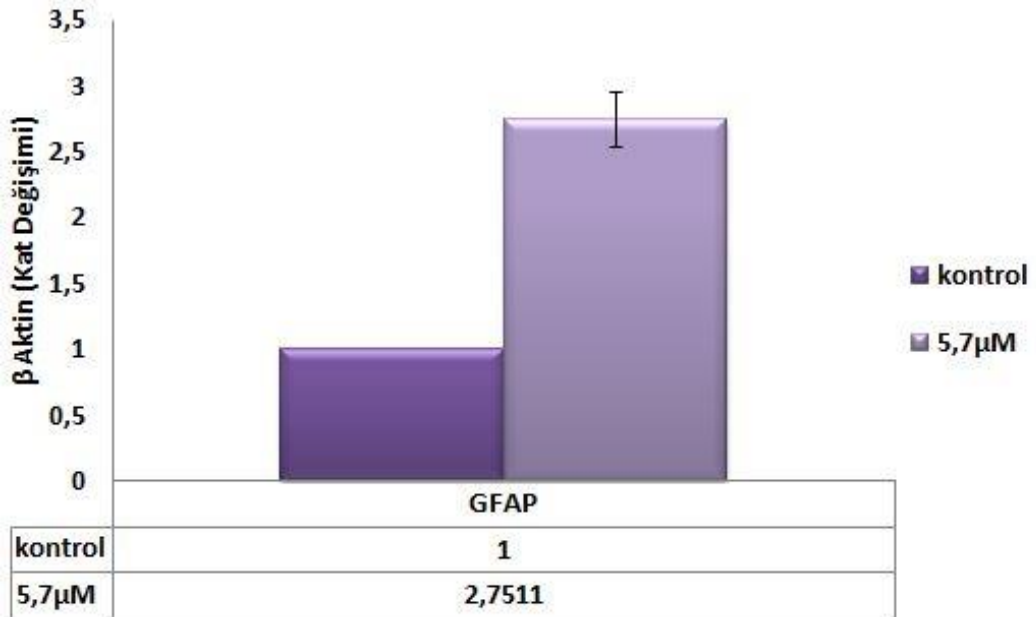
Şekil 13:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında CXCR3 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.



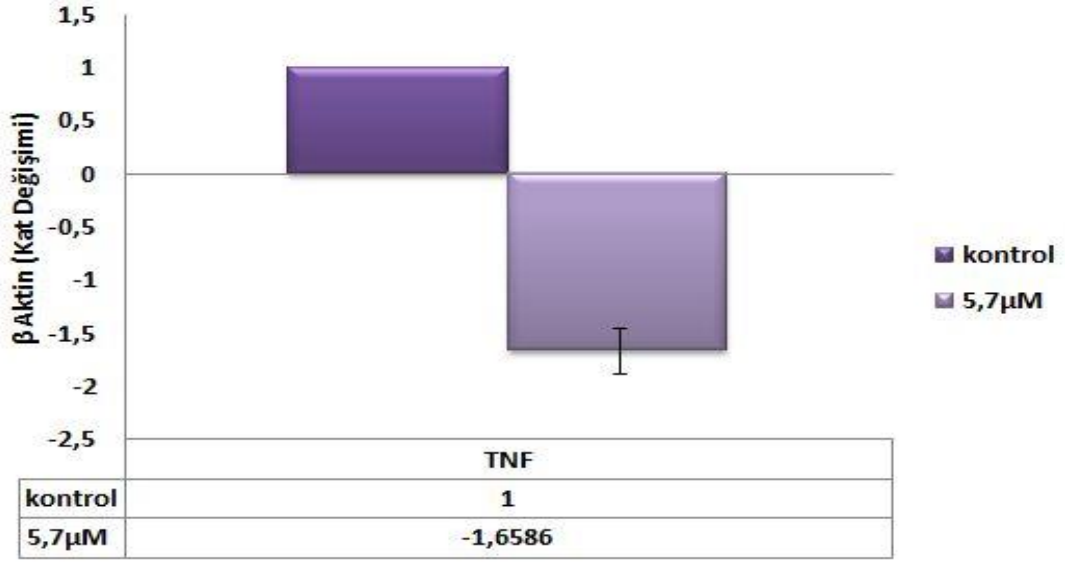
Şekil 14:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 geninin mRNA seviyesine etkisi olan etki



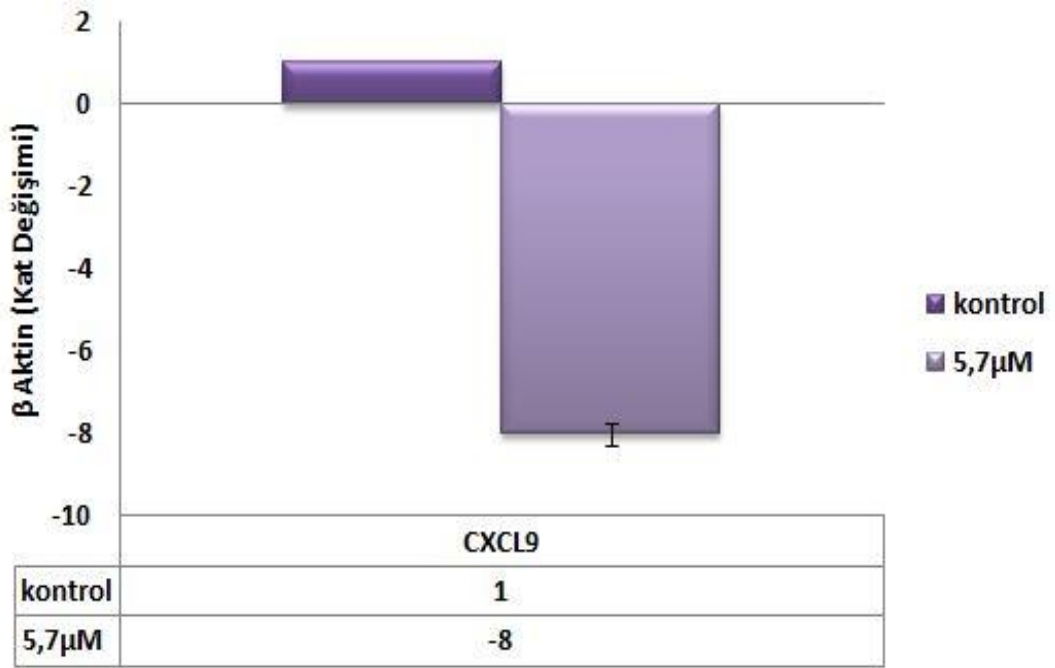
Şekil 15:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 geninin mRNA seviyesine olan etkisi



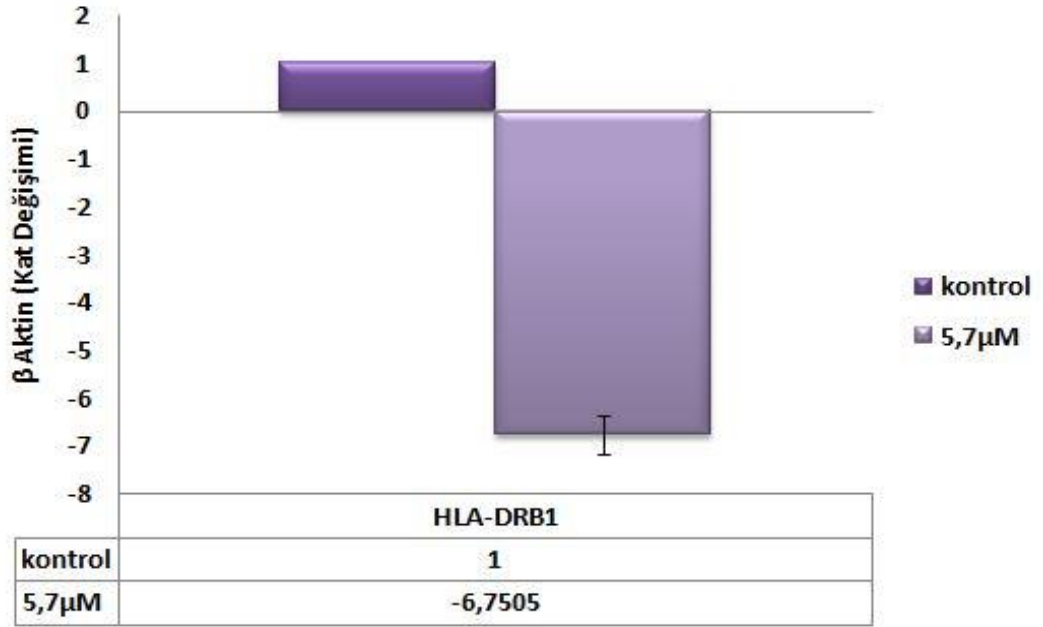
Şekil 16:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında GFAP geninin mRNA seviyesine olan etkisi.



Şekil 17:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında TNF geninin mRNA seviyesine olan etkisi



Şekil 18:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 geninin mRNA seviyesine olan etkisi

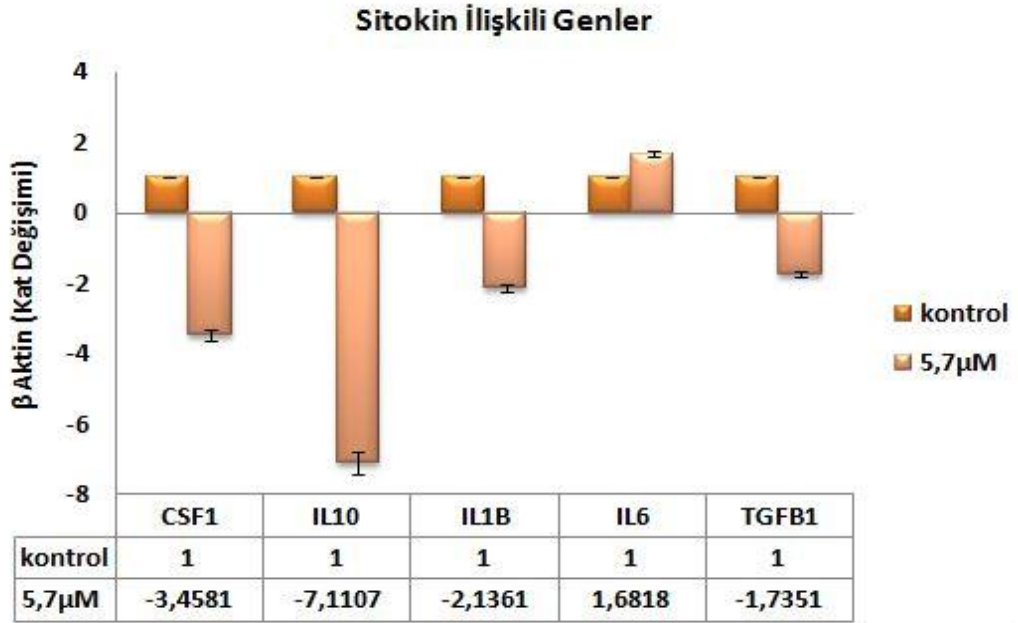


Şekil 19:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında HLA-DRB1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi

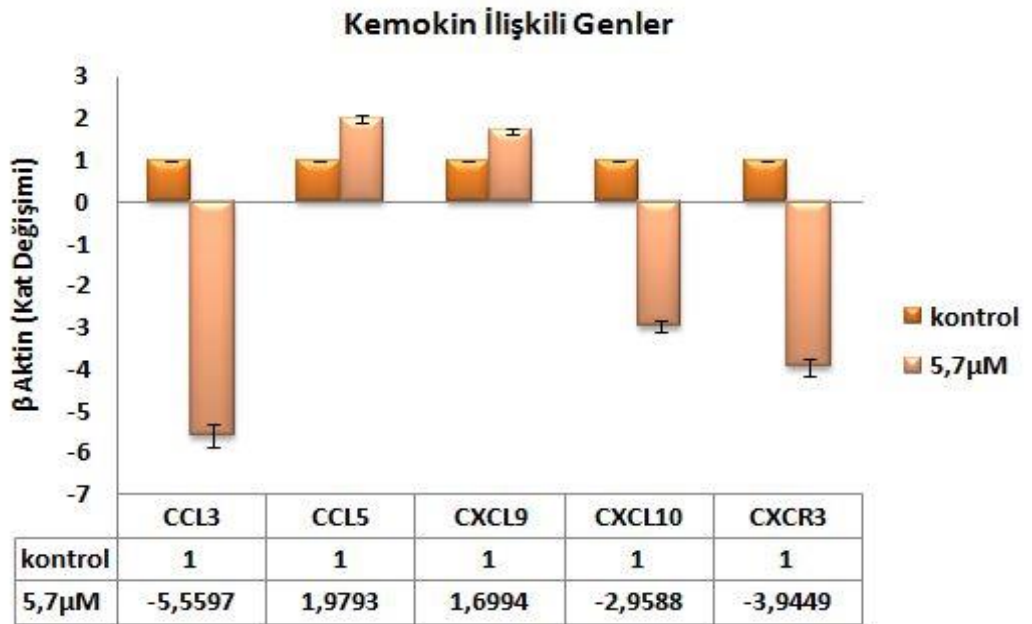


Şekil 20:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin CCRF-CEM hücre hattında STAT3 geninin mRNA seviyesine olan etkisi

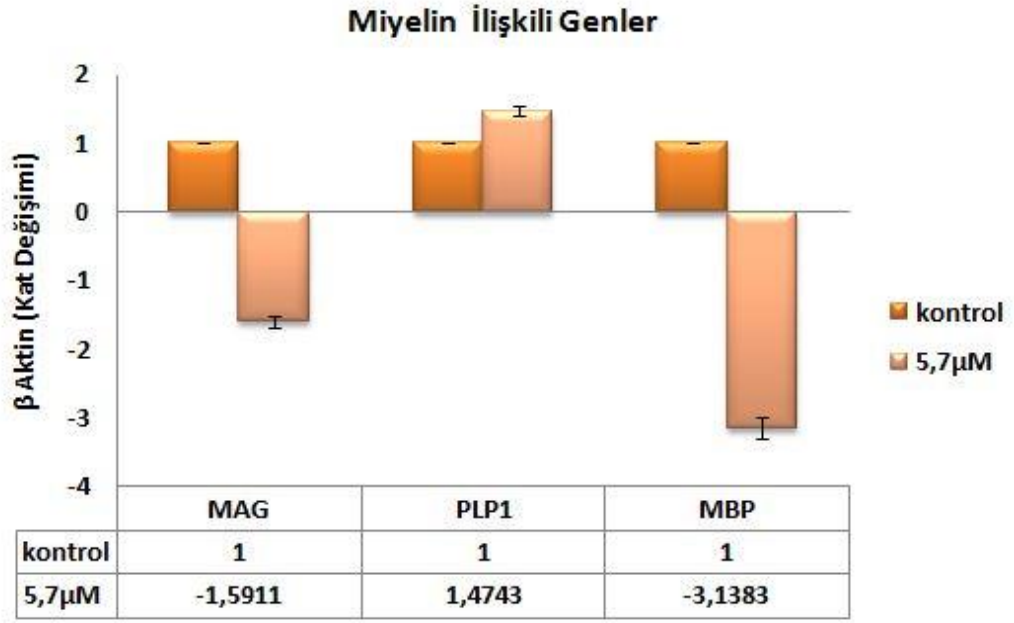
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendi ve hücrelere belirlenen dozda ST-1505 bileşiği uygulandı. 24 saat inkübasyonun sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. SH-SY5Y hücrelerinde ST-1505 ile EC10 dozunda çalışmaya devam edildi. ST-1505 bileşiğinin 5,7 μ M doz uygulamasında genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimi incelendi. Bu bağlamda sitokin ilişkili genler (CSF1, IL10, IL1B, TGF β 1) genlerinin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde sırasıyla 3,45; 7,11; 2,13; 1,73-kat azalış gözlenirken IL-6 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,68 kat artış gözlemlendi (Şekil21). Kemokin ilişkili genlerinden CCL5, CXCL9 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında sırayla 1,97, 1,69 kat artış gözlemlendi. CCL3, CXCL10, CXCR3 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında sırayla 5,55; 2,95; 3,94 kat azalış elde edildi (Şekil22).Miyelin ilişkili MAG, MBP, PLP1 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında sırayla 1,59; 3,13 kat azalış; PLP1 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında 1,47 artış elde edildi (Şekil23). T-hücre aktivasyon ilişkili CD44 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,84 kat azalış gözlemlendi (Şekil24). Kalıtsal bağışıklık (adaptif immünite) ilişkili C1s, HLA-DRB1 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında sırayla 5,54; 1,34 kat azalış elde edildi (Şekil25). Apoptoz ilişkili MMP9 geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 3,44 kat azalış elde edildi (Şekil26). Enflamasyon ilişkili NFKB1, TNF genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında sırayla 1,68; 6,08 kat azalış; STAT3 genin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında 2,15 kat artış gözlemlendi (Şekil27). Hücre Adezyon ilişkili APP geninin 5,7 μ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,43 kat artış elde edildi(Şekil28). Diğer GFAP, FOXP3 genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimindeki 5,7 μ M doz uygulamasında sırayla 3,54; 2,15 kat artış elde edildi (Şekil29).



Şekil 21:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında sitokin ilişkili genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.



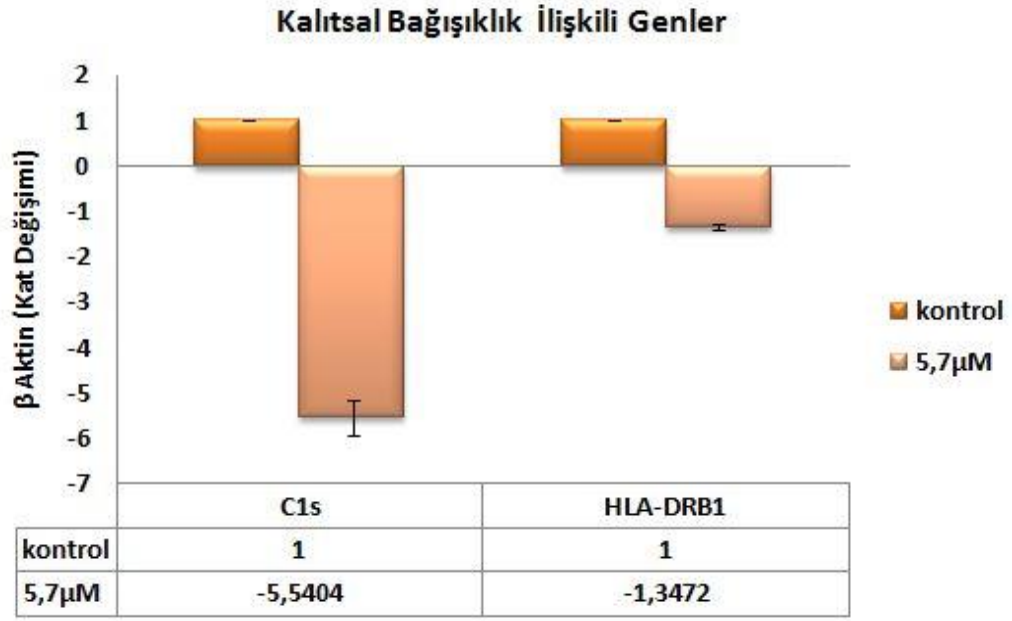
Şekil 22:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında kemokin ilişkili genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.



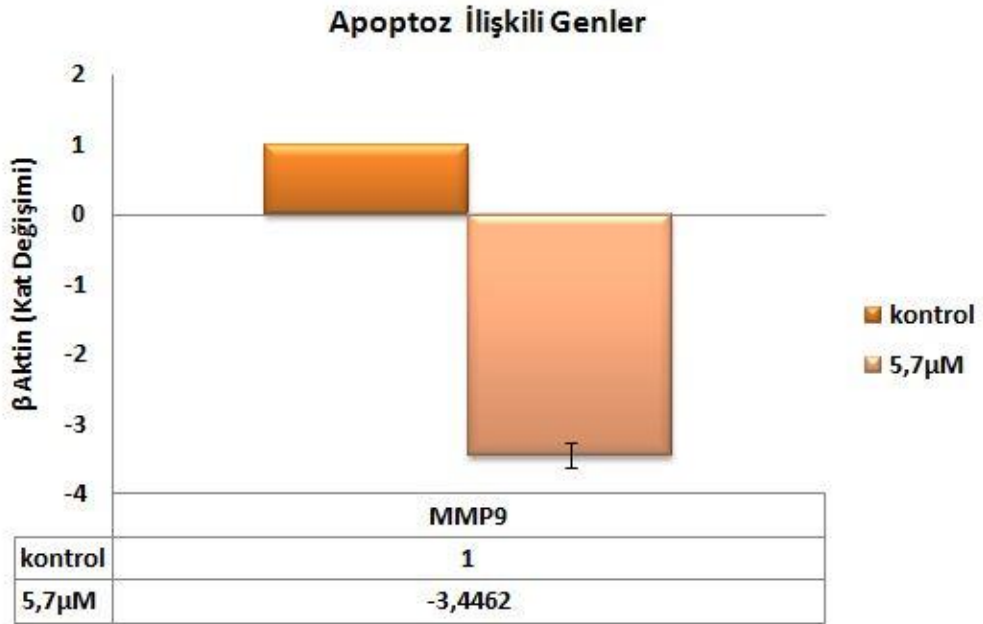
Şekil 23:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında miyelin ilişkili genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.



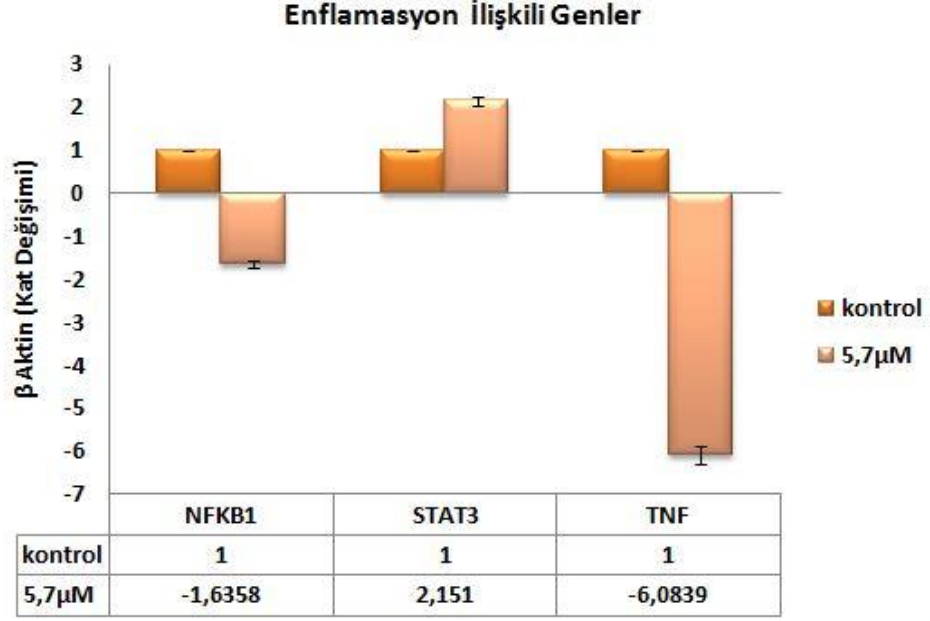
Şekil 24:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında T hücre ilişkili geninin mRNA seviyelerine olan etkisi.



Şekil 25:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında kalıtsal bağışıklık ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.



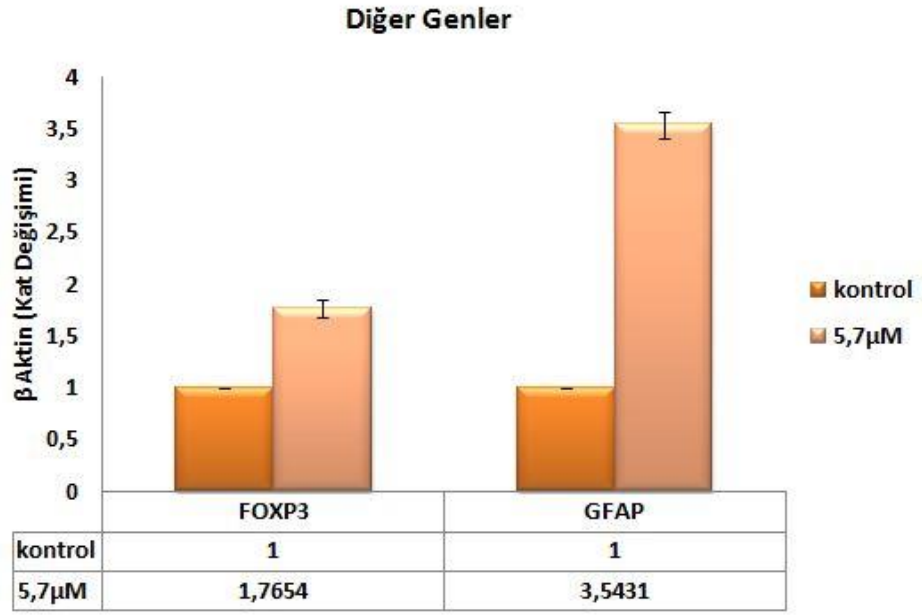
Şekil 26:Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında apoptoz ilişkili geninin mRNA seviyelerine olan etkisi.



Şekil 27: Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında enflamasyon ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.



Şekil 28: Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında adezyon ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.



Şekil 29: Fingolimod türevi ST-1505 bileşiğinin SHSY-5Y hücre hattında diğer genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.

4. TARTIŞMA

Multipl skleroz enflamasyon, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize otoimmün olarak MMS'e etki eden enflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıktır (Ünal ve diğ.,2016). Dünya genelinde 2,1 milyon kişinin MS ve bu hastalarının çoğunun orta yaşlarda olduğu araştırmalarda söz konusudur. MS' in insidans ve prevalansı düşük ve nadir görülen hastalıklar arasında bile sayılabilecek durumda olup hala çeşitli araştırma ve tartışmaların en yoğun biçimde devam ettiği hastalıkların neredeyse başında gelmektedir (Özbülül, 2012). MS etiyoloji hala net olmamakla birlikte çevresel ve genetik etkenlerin her ikisinde hastalığa neden olur. Th hücre aracılı olarak başlayan patogenezi olasılıkla otoreaktif Th17 hücrelerinin periferik kandan lenf nodlarına ve sonrasında beyin omurilik sıvısına (BOS) geçmesiyle birlikte kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olur(Korn ve diğ.,2009). Ortamda oluşan enflamasyonla beraber T hücreleri ve makrofajların yüzeyinde bulunan adhezyon molekülleri sayesinde CD8+ T ve CD4+ T hücrelerinin KBB'ini aşarak merkezi sinir sistemine göçleri başlar(Sevim,2016). Bu göçlerin ardından demiyelinizasyon ve yoğun astrogliosis oluşumu gözlenir. Bu yüzden MS T hücre aracılı otoimmüne bir hastalık olarak kabul edilebilir.

MS tedavisi olarak birçok ilaç kullanılmıştır. Bunlardan biri olarak hastalığı modifiye edici özelliğe sahip olan fingolimod ilk oral ilaç olarak kullanılmıştır. Fingolimod, sfingosin 1- fosfat reseptörü-1'i T hücreleri üzerinde antagonize eder ve lenfositlerin lenf nodlarından göçünü inhibe ederek naif T hücrelerinin ve merkezi bellek T hücrelerinin sayısını azaltır (O'Brien ve diğ., 2010). Bizim çalışmamızda Düsseldorf Heinrich Heine Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Prof. Dr. Holger STARK tarafından sentezlenen Fingolimod (ticari isimi Gilenya) türevi ST-1505 bileşiği kullanıldı. Fingolimod türevi ST- 1505 bileşiğinin SHSY-5Y ve CCRF-CEM hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerine ve farklı yollara ait genlerin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakıldı. Yapılan sitotoksisite deneyi sonucunda ST-1505 bileşiği için EC10 değeri 5,7µM olarak

bulundu. Tez aşamasında SH-SY5Y ve CCRF-CEM hücreler üzerinde kullanılarak 24 gen üzerinde mRNA analiz seviyeleri belirlendi. Tez aşamasında CCRF-CEM ve SH- SY5Y hücre hatları üzerinde çalışmasını belirlediğimiz genlerin mRNA ekspresyonun ST-1505 bileşiğinin uygulamasında ortaya çıkan değişimlerin istatistiksel analizleri yapılarak yorumlanan sonuçlara ait değerler Tablo 8 ve 9’da verilmektedir.

Tablo 8: CCRF-CEM hücre hattında ST-1505 bileşiği uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.

GENLER	EC10 (5,7μM)
IL-6	1,96
CXCR3	-6,68
TNF	-1,65
CXCL10	2,15
CXCL9	-8,00
GFAP	2,75
HLA-DRB1	-6,75
STAT3	-2,42

Tablo 9:SH-SY5Y hücre hattında ST-1505 bileşiği uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.

GENLER	EC10(5,7µM)
IL-6	1,68
IL-1B	-2,13
CXCR3	-3,94
TNF	-6,08
CXCL10	-2,95
CXCL9	1,69
GFAP	2,75
HLA-DRB1	1,34
STAT3	2,15
APP	1.43
C1S	-5.54
CCL3	-5.55
CCL5	1.97
CD44	-1.84
CSF1	-3.45
FOXP3	1.76
IL-10	-7.11
MAG	-1,59
MBP	-3,13
MMP9	-3.44
NFKB1	-1.63
PLP1	1,47
TGFB1	-1,73

Sitokin ilişkili genler (CSF1, IL10, IL1B, IL6, TGFβ1); CSF1 (kemokin olan koloni- uyarıcı faktör 1), Monosit/makrofaj (M) gelişiminin ana düzenleyicisi olarak çok işlevsel hücreyel yanıtla sonuçlanan çok sayıda sinyal yolunu aktive eder(Endele ve diğ., 2017). Bu genin MS üzerindeki çalışmalarından birinde CSF1 reseptörünün seçici bir inhibisyonunun, hastalığın şiddetini azalttığını ve

DAE relaps fazını önlediğini ve bu da MS'te mikroglioz ve enflamasyonda CSF1-CSF1R sinyalininde önemli olmasıyla birlikte, mikrogliya aktivasyonunun oluşumu gerçekleşir(Borjini ve diğ., 2016). Ayrıca, immünsüpresif tümör mikroçevresinin üstesinden gelmek üzere Tümör-ilişkili makrofajların (TAM) işlevini düzenlemede rol oynadığı bilinmektedir (Peyraud ve diğ.,2017).

IL-10, esas olarak bir CD4 lenfosit alt kümesi tarafından üretilen anti-enflamatuvar role sahip önemli bir immünoregülatör sitokin olarak makrofajlar üzerinde, otoimmün hastalıkların ilerlemesini etkileyebilen Th1 ve Th2 sitokinlerinin dengesini düzenlemede ve MHC sınıf II ve ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonunu sağlamaktadır(Soliman ve diğ., 2018). Bir başka fonksiyon olarak B hücre çoğalma ve buna bağlı olarak antikor üretimini up regüle eder. IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokinler, pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF-alfa) sentezini inhibe eder ve koruyucu antikor üretimini uyararak dengeyi geri yükleyebilir(Toker ve diğ.,2018).

İnterlökin 1 sitokin ailesi üyesi olan IL1B geni, hücrelerde mikrobiyal etki ve doku hasarına yanıt olarak miyeloid yüksek seviyelerde eksprese edilir (Pulugulla ve diğ., 2018). Birkaç genetik çalışma, IL1B genetik varyantlarını şizofreni hastalığı ile ilişkilendirmiştir fakat, IL1B gen ifadesi ve beyin yapısı üzerindeki etkisi şizofrenide hala açıklığa kavuşturulmaya devam etmektedir (Mostaid ve diğ, 2018). MS'te IL-1β'nin rolünü destekleyen kanıtlardan biri, beyin omurilik sıvısı (BOS) aktif lezyonlarında ve hastalık şiddeti olan MS hastalarının kanındaki IL-1β düzeylerinin yüksek olmasıyla ilişkilendirilir(Mellergård ve diğ.,2010;Seppi ve vedig.,2014).Son olarak yapılan çalışmalardan birinde IL-1β etkilerinin engellediği durumda ve DAE hastalığının seyrinde iyileşme söz konusu olmuştur (Burger ve diğ.,2009).

İnterlökin 6 (IL-6) immün yanıtın, hematopoezin ve enflamasyonun düzenlenmesinde, aynı zamanda çeşitli dokular üzerinde etkisini gösteren bir pleiotropik sitokin özelliği göstermektedir(Akira ve diğ.,1990). IL6, pro-enflamatuvar sitokin olarak birçok işleve sahiptir. B hücrelerinin farklılaşmasında ve Th 17 hücrelerinin üretimi için gereklidir. IL-6, bağışıklık sisteminin hücreleri arasında sinyal iletiminin bir aracı olarak görev alırken aynı zamanda, karaciğerde enflamatuvar proteinlerinin sentezini indükleyerek bağışıklık hücrelerinin

proliferasyonda ve büyümesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir(Kishimoto ve diğerleri, 1992; Ershiler ve diğerleri, 1994). Ayrıca IL-6'nın MSS'i içinde üretilmesiyle nöroimmün tepkilerin koordinasyonu düzenlenmektedir(Gruol ve Nelson,1997).

Transforme edici büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), çok fonksiyonlu bir sitokin ve kanser hücreleri tarafından üretildiğine inanılan TGF $\beta 1$, hem adaptif hem de doğal immün hücrelerin tümör-infiltrasyonunun işlevini ve dolayısıyla kanseri baskılayabildiği varsayımı mevcuttur (Ohtani ve diğ., 2018). İşlevsel olarak aktifleşen TGF- $\beta 1$, TGF-B reseptör tip 1 (TGF $\beta R1$) ve TGF $\beta R2$ 'den oluşan bir tetramerik transmembran kompleksine bağlanarak sinyal iletim yolunu başlatmaktadır (Kotlarz ve diğ, 2018). TGF- $\beta 1$, T hücre proliferasyonunu ve buna bağlı sitokin üretimini güçlü bir şekilde inhibe ederek T yardımcı hücre farklılaşmasını antagonize eder ve düzenleyici T hücrelerinin gelişimini destekler (Cripps ve diğ., 2012).

Çalışmamızda CCRF-CEM hücre hattında IL-6 geninin 5,7 μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,96 kat artış gözlemlendi. Pro-enflamatuvar sitokin olan IL-6'nın enflamasyonda yer alan sitokinlerin salgılanmasını desteklediği bilinsede anlamlı bir artış söz konusu olmamıştır.

SH-SY5Y hücre hattında IL-6 geninin 5,7 μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,68 kat artış elde edilirken, IL-1B geninin 5,7 μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde ise 2,13 kat azalış gözlemlendi. IL-10 geninin 5,7 μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 7,11 kat azalış gözlemlendi. CSF1 geninin 5,7 μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 3,45 kat azalış gözlemlendi. TGF- $\beta 1$ geninin 5,7 μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,73 kat azalış elde edildi. Sitokin ilişkili bu genler MS hastalığında enflamasyon yolağını düzenlediği bilinmektedir. Literatür taramalarında Fingolimod ile yapılan çalışmanın birinde pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyelerini önemli ölçüde azalttığı söz konusu olmaktadır(Pang ve Hou,2017). Bizim çalışmamızda ise pro-inflamatuvar genlerden biri olan IL-6 geninde anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. Dolayısıyla ST-1505 bileşiği pro-

enflamatuvar genlerden IL-6 geni hariç diğer genleri baskılamaktadır.

Normal şartlarda TGF- β 1 immün düzenleyici bir sitokin olarak naif T hücrelerinin Th17 'e farklılaşmasını desteklerken, yaptığımız çalışması sırasında inhibisyonu ile otoimmüneteye neden olan Th17 hücrelerinin oluşumu engellenmesine katkı sağlamış olabilir(Düzgün,2014).

Kemokin ilişkili genler (CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCR3); CC kemokin ligandı (CCL3), indüklenebilir bir proteindir. CCR1, CCR4 ve CCR5' e bağlarak çeşitli pro-inflamatuvar tepkilerde yer alır. Otoimmünite ve transplantasyonda immün yanıtları düzenleyen bir hücresel tedavi olarak kullanılabileceği düşünülen CCL3 Tregler tarafından üretiminin yetersiz kaldığı bilgisi, DAE'nin ilerlemesini engellemektedir (Patterson ve diğ., 2016). Bu da kemokin üretilmesinin hastalık için bir tedavi olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. RANTES olarak da bilinen CC kemokin ligandı 5 (CCL5), insan lenfositlerinin seçici bir kemotaksisi olarak çeşitli bağışıklık hücrelerinin göçünü indüklediği bilinmektedir. CCL5, CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg'lerin tümörlü hücrelere alımında rol oynayarak tümör toleransını destekleyen baskılayıcı bir ortamın oluşmasına katkı sağlamaktadır (Gao ve diğ., 2017). MS patofizyolojisinde yer alan RANTES, MS beyinlerinde glutamat salınımını ve plastisitesini fonksiyonel olarak düzenleyebilen bir pro-enflamatuvar kemokin olarak da işlev görmektedir (Mori ve diğ., 2016).

CXCL9, CXCR3'e bağlanarak aktive hale gelen bu antimikrobiyal gen lenfositler için bir kemoatraktan olduğu düşünülmektedir. CXCL10 (IFN- γ indüklenebilir protein 10), bir CXC kemokini, IFN- γ , TNF gibi bu tür uyarıcı uyaranlara yanıt veren çeşitli bağışıklık hücreleri tarafından kabul edilir ve çeşitli hücre tiplerinin yüzeylerinde bulunan CXCR3'e göre farklı bir şekilde bağlanması, onun p38 MAPK/IKK yollarını aktive etmesini sağlamaktadır. Ve CXCL10/CXCR3 kompleksinin oluşumunda rol oynayan etkileşimlerin, monositlerin sitokin üretme kapasitesine ilişkin olarak değerlendirilmesine katkıda bulunur (Zhao ve diğ.,2017). CXCR3, esas olarak insanlarda aktive T lenfositleri, NK hücreleri ve bazı epitelyal hücrelerde ifade edebilen üç CXCR3 izoformu vardır: CXCR3-A CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'e bağlanırken, CXCR3-B de CXCL4'e bağlanır ve kemokin reseptörü 3-alternatif formu (CXCR3-alt) (Karin ve Razon, 2018). CXCR3 ve ligandları Th1 hücrelerinin

Th1-kaynaklı enflamasyon bölgelerine göçünü düzenlerken birinin eksikliği çok sayıda Th1-odaklı hastalık modelinde infiltrasyonlarını sınırladığı düşüncesine varılmaktadır (Groom ve Luster ,2010).

Kemokinler, çeşitli bağışıklık hücrelerinin işe alımını ve aktivasyonunu teşvik eden yakından ilişkili kemoatraktan sitokinlerin bir ailesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda kemokin ilişkili genlerin (CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCR3) mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. CCRF-CEM hücre hattı için CXCL9 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 8 kat azalış gözlenirken CXCL10 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,15 kat artış elde edildi. CXCR3 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 6,68 kat azalış elde edildi. CXCR3 için ligand olan CXCL9 ve CXCL10 etkileşimleri MS'de lökosit göç faktörü olarak etki ederek ve pro- inflamatuvar reaksiyonlara aracılık ederek demiyelinizasyonun sürecini teşvik edici süreci azalttığı söylenebilir.

SH-SY5Y hücre hattında CCL3 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 5,55 kat azalış elde edilirken CCL5 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1.97 kat artış elde edildi. CXCL9 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1.6994 kat artış gözlenirken CXCL10 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,95 kat azalış gözlemlendi. CXCR3 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 3,94 kat azalış elde edildi. Genel olarak bakıldığında gen mRNA seviyelerindeki azalış kemokinlerin hedefinde lökosit göç faktörünü engelleme yönünde olduğunu söyleyebiliriz. T hücre aracılı birçok hastalık modelinde infiltrasyonlarını sınırladığı düşüncesine ulaşılmaktadır.

Literatür taramalarında,iltihaplı lenf düğümlerinde Th1 hücrelerinin proliferasyonunun engellenmesiyle birlikte hücrelerin CXCR3 reseptörü üretimi ve CXCL10 ve CXCL9'a göçünün engellenmesi söz konusu olmaktadır(Lazzeri ve diğ.,2005;Fulton ve diğ.,2009).

Miyelin ilişkili genler (MAG, PLP1, MBP); Miyelin ile ilişkili glikoprotein (MAG), CNS ve Schwann hücrelerindeki miyelinli oligodendrositlerde eksprese

edilen tip 1 tek geçişli bir transmembran olan bu protein miyelinli aksonların oluşumunu ve korunmasını düzenleyerek sinir sisteminin gelişimi ve işlevinde önemli bir rol oynamaktadır (Pronker ve diğ.,2016). İmmüoglobulin (Ig) süper ailesinin bir üyesi olan MAG, beş hücre dışı Ig benzeri alan içermekle birlikte sadece sitoplazmik etki alanlarına göre farklı iki MAG izoforma sahip sialik asit bağlayıcı olama özelliğinden dolayı Siglec ailesinin bir üyesi olarak kabul görmektedir (Filbin, 2003).

PLP1 (Proteolipid protein 1), X kromozomuna bağlanarak fare ve insan arasında sekans ve topolojide yüksek ölçüde korunmuş olarak bilinen 30 kDa'lık bir myelin proteinini kodlar (Nave ve Werner, 2005). Miyelin baskın transmembran proteini kodlayan bu genin bulunduğu XP22 kromozomundaki bir mutasyon PLP üretimindeki bozulma nedeniyle motor yetenekler ve entellektüel fonksiyonun bozulduğu dejeneratif bir CNS bozukluğu olan Pelizaeus-Merzbacher hastalığına neden olurken MS'nin immün-patogenezinde PLP için doğrudan bir rol henüz belirlenmemiştir (Achiron ve Miron,2007).

Miyelin temel proteini (MBP), tüm nöronların aksonlarını kaplayan özel lipid membran olan miyelinin bileşeni olarak bilinir ve hem plazminojen (Pg) hem de doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA), yüksek afiniteli şekilde MBP'ye bağlanır (Gronow ve diğ., 2017). MS ile ilgili olarak beyinleri çok fazla “yabancı antijen” içeren tüm insanların neden MS geliştirmediklerini, MS hastalarından alınan MBP, yaşlı kontrollerde MBP'den farklı şekilde bozulduğu saptanan MS'ye özgü bu bölgelerde oluşan antijenik yapılar, MS'yi önlemek ve tedavi etmek için ilaçların rasyonel sentezinde bir yol sağlayabilir (Truscott ve Friedrich, 2018). Ayrıca MAG, miyelin kılıfının tahrip edildiği merkezi sinir sistemi hastalıkları için bir biyobelirteç olma özelliği göstermektedir (Zavialova ve diğ., 2017).

Çalışmamızda miyelin ilişkili (MAG, PLP1, MBP) genlerin genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimleri ele alındığında; SH-SY5Y hücre hattı için MAG geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,59 kat azalış gözlenirken, PLP1 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,47 kat artış gözlemlendi. MBP geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 3,13 kat azalış gözlemlendi, T lenfositlerin kan beyin bariyerini geçtikten sonra MSS'de oluşan

miyelin kılıfının tahrip edildiği merkezi sinir sistemi hastalıkları için özellikle MAG geni bir biyobelirteç olarak görülmektedir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamsız olsa da, az düzeyde artışlar myelin sentezini aktive edici şekilde değerlendirilmesi yanlış olmayacaktır. Bu da bileşiğe MS tedavisi için ilave (anti-inflamatuar etki yanısıra) pozitif bir miyelinizan olarak değer katmaktadır.

Bir belirteç olarak görülen MAG gen T hücrelerini hassaslaştırabilen ve sıçanlarda ve farelerde DAE indükleyebilen peptit epitoplari bulundurması miyelinin dejenerasyonu başlamasına katkı sağlayabilir(Quarles,2007). Literatürdeki çalışmalarda bu gibi sonuçların ortaya çıkması bizim çalışmamızı destekler nitelikte olabildiğini gösterebilir.

T-hücre aktivasyonu ilişkili genler (CD44); CD44, glial ve T hücreleri gibi çeşitli hücrelerin büyümesini, hayatta kalmayı ve farklılaşmayı, anjiyogenez, sitokinlerin, kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin ilgili reseptörlere sunulması ve hücre membranındaki proteazların yavaşması gibi çok fonksiyonlu hiyalüronik asit (HA) olarak da ifade edilen hücre yüzey molekülüdür (Ponta ve diğ., 2003). Multipl sklerozun demiyelinizan lezyonlarında CD44 ekspresyonu kronik olarak yükselmesine işaret eden CD44 ekspresyonu, Th2/düzenleyici T hücresi farklılaşmasını indüklerken, CD44'ün delesyonu Th1/Th17 farklılaşmasını inhibe etmesi T hücreleri üzerinde önemli bir rol oynamıştır (Guan ve diğ, 2011). SH-SY5Y hücre hattı içi CD44 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,84 kat azalış gözlermesi T hücrelerinin ekspresyonunu down regule ederken farklılaşmasını da inhibe ettiği bilinmektedir.

Kalıtsal bağışıklık (adaptif immünite) ilişkili genler (C1s, HLA-DRB1); C1s (Klasik komplementer yolun birinci bileşeni), ortamda bulunan patojenlerin parçalanmasını liziz yoluyla veya doğuştan gelen ve adaptif immün süreçlerin aktive olmasını tetikleyen büyük bir komplekstir (Almitairi ve diğ., 2018). C1q protein içeriğini patojenle karşılaştığında aktive olan C1r ve C1s'den her biri iki kopyadan oluşan tetramer yapı belirlemektedir. Fonksiyonel olarak kemotaksis, fagositoz ve hücre adezyonu gibi anahtar hücrel ve humoral etkileşimleri de uyarımında ve adaptif immünite ile hayati köprüler oluşturmak için B hücresi farklılaşmasını desteklemektedir (Wallis ve diğ, 2010). Normal şartlarda koruyucu özelliğinin yanı sıra komplement aktivasyonunu başlatmak için

prionlara bağlanarak Alzheimer hastalığı gibi birkaç amiloid ilişkili hastalıkların patolojisinde veya eksiklikleri sonucunda ciddi enfeksiyon riskini artırmaktadır (Sim ve diğ., 2007). HLA-DRB1, insan lökosit antijeni (HLA) kompleksi adı verilen insanda major histokompatibilite kompleks (MHC) II gen grubu olarak bilinmektedir. MHC bazı bağışıklık hücrelerin yüzey proteinlerin üretilmesini sağlamaktadır. DRB1*15:01 alleli, artmış DRB1 gen ekspresyonu ve bazı protein yapısal özellikleri ile ilişkilidir. MS için genetik riskin en büyük bileşenini HLA aracılı otoimmün patogenezinde, kendindeki birkaç miyelinden türetilmiş hücresel proteinlerin HLA molekülleri tarafından T hücrelerine sunulmasını ve sonuçta kendiliğinden oluşan antijene karşı bağışıklık tepkisinin ortaya çıkmasını oluşturmaktadır (Misra ve diğ.,2018).

SH-SY5Y hücre hattında C1s geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 5,54 kat azalış elde edildi. HLA-DRB1 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,34 kat azalış bu hücre hattı için geçerli iken, CCRF- CEM hücre hattında da HLA-DRB1 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 6,75 kat azalış elde edildi. Elde ettiğimiz bu verilerden yola çıkarak kalıtsal bağışıklık genlerindeki azalış, birçok otoimmün hastalıkların oluşma sürecine katılan adaptif immün sistemi hücrelerinin (özellikle T hücreleri) kendiliğinden oluşan antijene karşı bağışıklık tepkisini azaldığı düşüncesine varılmaktadır.

Apoptoz ilişkili genler (MMP9); Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi proteinleri, embriyonik gelişme ve doku yenilemesi gibi birçok hayatsal olarak faaliyetlerin yanında metastaz gibi hastalık süreçlerinde ekstrasellüler matriksin parçalanmasıyla birçoğu aktif proprotein hale gelerek katkı sağlayan proteinaz ailesini oluşturmaktadır. MMP-9, trombin ve kan tarafından tetiklenen, kılcak geçirgenliği arttıran, KBB'in yapısını bozan, endotelial hücre yapısını bozarak nörotoksik olarak hareket ederek ödem ve nörolojik arasındaki korelasyonları etki eden bir proteazdır (Sarfo ve diğ., 2018). SH-SY5Y hücre hattında MMP9 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 3,44 kat azalış elde edildi. MMP9 genin yapılan araştırmalarda kan beyin bariyer yapısını bozulmasına neden olan bir protezadır, Gözlemlenen gen ekspresyonundaki azalış MS patolojisinde etkili olan lenfosit göçüne ve hücre

apoptozuna engel olduğu düşüncesini şiddetle desteklemektedir. Miyelin dejenerasyonunda, pro-inflamatuar sitokinlerin salınımında ve aksonal hasarda görev almasından dolayı yaptığımız çalışmada gendeki azalışın olması çıkarmak istediğimiz sonucu desteklemektedir(Waubant ve diğ.,2003; Fainardi ve diğ.,2006).

Hücre adezyonu ilişkili genler (APP); APP (Amiloid öncü proteini), merkezi sinir sistemi ve birçok dokuda bulunmaktadır. Birçok araştırmacılara göre beyinde nöronların göçüne yardımcı olduğu varsayılmaktadır. Özellikle merkezi sinir sistemine ettiği ve bu hastalıklardan biri olan Alzheimer hastalığının nedensel molekülü olarak nöronal hücre gövdelerinde sentezlenir ve daha sonra sinapslara taşınır ve böylece hastalığın patogeneğinde önemli bir rolünü ortaya koymaktadır (Furotani ve diğ., 2018). Hücre adezyon ilişki genin SH-SY5Y hücre hattında APP geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,43 kat artış elde edildi. Amiloid öncü proteinin fonksiyonunu hakkında çok az şey bilinmekle birlikte elde edilen artış anlamlı olmasada beyinde bu proteinin nöron göçünü yönlendirmeye ve diğer proteinlerin üretilmesinde yardımcı olabilme ihtimalini barındırmaktadır. DAE'li APP alan farelerde pro-inflamatuar sitokin (özellikle IL-2) ve kemokin seviyelerinde azalış olmuştur(Hohlfeld ve diğ.,2012).

Enflamasyon ilişkili genler (NFκB1, STAT3, TNF); NF-kappa-B, hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunan bir pleiotropik transkripsiyon faktör özelliği söz konusu olarak enflamasyon, immünite, farklılaşma, hücre büyüme, tümör oluşumu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçle ilgili sinyal iletim yolunun son noktası olduğu bilinmektedir. MSS'ye olan etkisine bağlı olarak yapılan bazı çalışmalarda nöronal NF-κB farelerde sinaptik iletim ve plastisite düzenlediği ve bununla birlikte özellikle nöronlar, astrositler ve mikroglia gibi çoğu hücre tipinde, aktive olur ve hem nörotoksik hem de nöroprotektif etkiler saptanmaktadır (Emmanouil ve diğ., 2009). Ayrıca, NF-κB tarafından ekspresyonu ile elde edilen genler, tümör apoptozunu bastırır, tümör büyümesini indükler ve tümörlere bir enflamatuvar mikro çevre sağlar (Yoon ve diğ., 2012). STAT3 (sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü 3), STAT ailesinin yedi üyesi arasından biri olarak neredeyse tüm insan kanserlerinde yapısal olarak aktive edilerek, STAT3 ile kopyalanan hedef proteinler, proliferasyon, hayatta kalma, invazyon ve anjiyogenez de dahil olmak üzere tümör gelişim

mekanizmasında rol oynamaktadır (Yoon ve diğ., 2012). STAT3'ün işlevlerinden bir tanesi de adaptif immün sistem içerisindeki T hücrelerinin ve B hücrelerinin olgunlaşmasına sinyal göndererek katkı sağlamaktadır. TNF (Tümör nekroz faktör), enflamasyonun önemli bir aracıdır, sıklıkla kronolojik enflamasyon kaskadını başlatır ve nöroenflamatuvar beyin bozukluklarında da rol oynadığı gösterilmektedir (Herrmann ve diğ.,2018). MS'nin sıklığı ve nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte neden-sonuç ilişkisini açıklamaya çalışan bazı hipotezlerden biri, anti-TNF'lerin kan beyin bariyerini geçememesi ve santral sinir sistemindeki T hücrelerinde ve makrofajların otreaktivitesinde olumsuzluğa neden olarak ve bunun sonucunda da immün aracili MS'ye katkı sağladığı düşünülmektedir (Balevi ve diğ., 2016).

Enflamasyon ilişkili (NFκB1, STAT3, TNF) genlerin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılarak değerlendirildiğinde SHSY-5Y hücre hattı için NFκB1 geninin 5,7μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,63 kat azalış elde edilirken, SHSY-5Y hücre hattı için STAT3 geninin 5,7μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,15 kat artış elde edildi. TNF geninin 5,7μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 6,08 kat azalış elde edildi.

CCRF-CEM hücre hattı için STAT3 geninin 5,7μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,42 kat azalış elde edildi. TNF geninin 5,7μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,65 kat azalış elde edildi. T lenfositlerinin olgunlaşmasına katkı sağlayan STAT3 genin CCRF-CEM hücre hattında upregule olurken SHSY-5Y hücre hattında downregule olması, 5,7μM doz uygulamasında CCRF-CEM hücre hattında bir etki göstermezken SHSY-5Y hücre hattında olumlu yönde bir etki göstermektedir. SH-SY5Y geni için yapılan doz uygulaması sonucunda bir azalış göstermekle birlikte nöronlarda immün yanıtı engellediği bilgisi düşülmektedir. Hem CCRF-CEM hem de SH-SY5Y hücre hatlarındaki TNF genindeki azalış, hücrelerde enflamasyon kaskadını durdurucu yönde olduğunu söyleyebiliriz.

Literatür taramasında bulunan fingolimod (FTY720) ile yapılan bir çalışmada STAT3'ün hem ekspresyonunu hem de fosforilasyon seviyesi tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artışı aynı şekilde ST-1505 bileşiğinin

SHSY-5Y hücre hattında da artışın gözlenmesi olumlu sonuç elde edildiğinin göstegesini olabilir (Qin ve diğ.,2017).

Diğerler genler (GFAP, FOXP3); Glial fibriler asidik protein (GFAP) astrositler ve ependimal hücreler tarafından eksprese edilen bir ara filamenttir. Bu filamentler hücrelere desteklik ve güç sağlayan ağlar oluşturmaktadır. Glial fibriler asidik protein (GFAP), çok sayıda çalışma MS için kullanımını tanımladığı ve hastalık şiddeti, nöroenflamasyonun ve nekrotik beyin hücresi tahribatı ve kan-beyin bariyeri (BBB) bozulması nedeniyle hastaların serumunda iyi bilinen bir astrogliozis belirteç olarak kullanılmaktadır (Abdelhak ve diğ., 2018; Sarfo ve diğ., 2018). FOXP3 (çatal uçlu kutu protein 3), transkripsiyon faktörü kanatlı-heliks ailesinin bir üyesi olan genin daha çok CD4+ CD25+ düzenleyici T hücrelerinde (Treg) ifade edildiği ve Treg'lerin farklılaşmasında ve gelişiminde rol oynadığı yapılan araştırmalarda bulunmuştur. FOXP3, bağışıklık süreçlerinin düzenlenmesinde bilinen rolüyle ve bu genin mutasyonlarının X'e bağlı immün sistem düzenleyici olarak otoimmün hastalıkların altta yatan patogenezi anlamak için bir aspiratör görevi üstlenmektedir (Kurylonek ve diğ.,2018). Ayrıca FOXP3'ün, tümör baskılayıcı fonksiyonunu uygulamak için karsinogenezde rol oynayan HER2, MYC ve SKP216, 19 ,20, 21, 22 gibi meme kanseri onkogenlerinin ekspresyonunu düzenleyerek meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe edebildiği bilinmektedir (Li ve diğ.,2018).

SH-SY5Y hücre hattı için FOXP3 geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 1,76 kat artış elde edildi. GFAP geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 3,54 kat artış elde edilirken CCRF-CEM hücre hattında GFAP geninin 5,7µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,75 kat artış elde edildi. FOXP3 geninin SH-SY5Y hücre hattında artış göstermesi T hücre regülasyonunu sağlayan Treg hücrelerinin farklılaşmasında ve gelişiminde olumlu etki gösterdiği söylenebilmektedir. Hücrelere desteklik ve güç sağladığı filamentler olarak bilinen GFAP proteinlerinin CCRF-CEM ve SH-SY5Y hücre hatlarında artışı söz konusu olmuştur. Bu noktada elde edilen değerler pro-inflamatuvar etki olarak gözlemlenmiştir. Bu çelişki sonucunda değerlerin daha da fazla araştırılmaya ihtiyacı vardır ve bileşiğin yan etkisi olarak değerlendirilebilir.

ACTB (Beta-aktin), literatürde sıklıkla referans gen olarak kullanılmaktadır ve hücre hareketliliği, yapısı, bütünlüğü ve hücre içi sinyallemede yer alan yüksek oranda korunmuş proteinler olduğundan dolayı bazı yazarlar tarafından evrensel kabul edilmektedir (Toscano ve diğ., 2018). B-aktin, vücutta bulunan hemen hemen bütün hücrelerde bulunmakla birlikte birçok hücre aktivitesinde bulunur. Bu nedenlerle de çalışmamızda referans gen olarak araştırılabilir genlerin normalize edilmesi için kullanılmıştır.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, MS araştırmaları için uygunluğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiş insan T-lenfolastoma [CCRF-CEM (CCL-119)] ve insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hatları kullanılarak; MS tedavisi için Düsseldorf Heinrich Heine Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Prof. Dr. Holger STARK tarafından sentezlenen Fingolimod (ticari isimi Gilenya) türevi ST-1505 bileşiğin MS ilişkili genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimlerine bakıldı.

SHSY-5Y ve CCRF-CEM hücre hatları üzerindeki genler ST-1505 bileşiğinin uygulanması sonucunda özellikle SHSY-5Y hücre hattındaki gördüğümüz anlamlı azalışlardan dolayı MS hastalığının tedavisine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Mevcut veriler ışığında, ST-1505 bileşiği çok hedefli güçlü bir anti-enflamatuvar etkiye sahip bileşiik olabilme düşüncesi ilerleyen süreçlerde hayvan deneyleriyle desteklenerek daha kesin sonuçlar elde edilebileceğinin bilgisini vermektedir. Ayrıca MS için oldukça potansiyel bir terapötik ajan olma özelliğine sahiptir.

6. KAYNAKLAR

- Acar,Ö.Ö.,ve diğ,”Multipl Skleroz Tedavisinde Alternatif ve Tamamlayıcı Ajan Olarak Kullanılan *Capparisovata*’dan Elde Edilen MSCOV Alt Fraksiyonlarının SH-SY5Y ve LUHMES Hücre Hatları Üzerine Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması”,Doktora,*Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*,Denizli,(2017).
- Aktas,O.,ve diğ,” Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis”, *Brinkmann, v. Br. J. Pharmacol.* 158, 1173–1182,(2009).
- Almitairi, J. O. M.,and other,” Structure of the C1r–C1s interaction of the C1 complex of complement activation”, *PNAS* , 115 ,4 ,768-773,(2018).
- Ali R., and other,” Drugs in development for relapsing multiple sclerosis.” *Drugs* ,73,625–650,(2013).
- Alonso, R., Garcea,O., and Moron, D.G., ”Optical coherence tomography as a biomarker of neurodegeneration in multiple sclerosis”, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 22, 77- 82(2018).
- Altunrende, B., Birday,E., ve Diğerleri, ”Relapsing Remitting Multipl Skleroz Tedavisinde Fingolimod Kullanımı”, *Turk J Neurol*, 23, 176-185, (2017).
- Borjini,N.,and other,” Cytokine and chemokine alterations in tissue, CSF, and plasma in early presymptomatic phase of experimental allergic encephalomyelitis (EAE), in a rat model of multiple sclerosis”, *J Neuroinflammation.*,13,291(2016).
- Burbach, B. J. , Medeiros , R. B.,and other,”T-cell receptor signaling to integrins”,*Immunological Reviews*, 218,65–81,(2007).
- Buchner,M., and Müschen, M.”Targeting the B cell receptor signaling pathway in B lymphoid malignancies”, *Curr Opin Hematol.*, 21(4), 341–349,(2014).
- Chaplin,D.D.” Overview of the Immune Response”, *J Allergy Clin Immunol.*, 125, 3–23, (2010).
- Chen, M., Chen, G.,and other,” IFN- β induces the proliferation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis”, *J Neuroimmunol.*, 242, 1–2, 39-46, (2012).

- Chen, M., Lin, X., and other,” Advances in T follicular helper and T follicular regulatory cells in transplantation immunity”, *Transplant Rev (Orlando)*, 32(4),187-193, (2018).
- Chuan Qin,C. and Fan W.H., “Fingolimod Protects Against Ischemic White Matter Damage by Modulating Microglia Toward M2 Polarization via STAT3 Pathway”,*Stroke.*,48,3336–3346,(2017).
- Cohen, J. A. and other,”Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. “*Lancet* 380, 1819–1828 (2012).
- Cripps,J.G.,and other,” Liver inflammation in a mouse model of Th1 hepatitis despite the absence of invariant NKT cells or the Th1 chemokine receptors CXCR3 and CCR5”, *Laboratory Investigation*,92,1461–1471,(2012).
- Compston,A.,and, Coles,A.,” Multiple sclerosis”,*Seminar*,372(9648),25-31,(2008).
- Cummings,M., Arumanayagam,A.C.S.,and other,” Presenilin1 regulates Th1 and Th17 effector responses but is not required for experimental autoimmune encephalomyelitis“*journals.plos.org*, 13,(8),(2018).
- Cuvertino, S., Stuart, H.M.,and other, “ACTB Loss-of-Function Mutations Result in a Pleiotropic Developmental Disorder.”, *Am J Hum Genet.*, 101(6),1021-1033,(2017).
- Danikowski,K. M., Jayaraman,S., and Prabhakar, B. S.,” Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis“,*J Neuroinflammation*, doi: 10.1186/s12974-017-0892- 8,(2017).
- Dendrou,A.A., Fugger,L.,and, Friese,M.A.,” Immunopathology of multiple sclerosis”, *Nature Reviews Immunology*,15, 545–558, (2015).
- Disanto,G.,and Morahan, J.M.,” The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis”,*Neurology.*, 78(11), 823–832,(2012). Elkama, A., Karahalil, B., “Role of gene polymorphisms in vitamin D metabolism and in multiple sclerosis”, *Arh Hig Rada Toksikol*,69,25-31,(2018).
- Egemen, İ., *Multipl Skleroz Tanı ve Tedavi Kılavuzu* , İstanbul: Galenos Yayınevi,(2016).
- Elkama, A., Karahalil, B., “Role of gene polymorphisms in vitamin D metabolism and in multiple sclerosis”, *Arh Hig Rada Toksikol*,69,25-31,(2018).
- Endele,M.,and other,” CSF-1-induced Src signaling can instruct monocytic lineage choice”, *Blood.*, 129(12),1691-1701,(2017).

- Fainardi E.,and other, “Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis.”, *Mult Scler.*, 12, 294-301(2006).
- Filbin,M.T.” Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS, *Nature Reviews Neuroscience*,4, pages703–713 (2003).
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N.,and Mills, K. H. G.” T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Clinical and Experimental Immunology*, 162,1–11(2010).
- Fulton,A.M.”The chemokine receptors CXCR4 and CXCR3 in cancer”. *Curr Oncol Rep.*, 11,2,125–131, (2009).
- Goldenberg,M.M.” Multiple Sclerosis”, *P&T*, 37(3), 175–184,(2012).
- Gowans, J. L., and E. J. Knight ,”The route of re-circulation of lymphocytes in the rat.” *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 159: 257–282(1964).
- Gronow,M.G.” Myelin basic protein stimulates plasminogen activation via tissue plasminogen activator following binding to independent L-lysine-containing domains”, *Biochem Biophys Res Commun.* , 490, 3, 855-860,(2017).
- Gruol,D.L.,and Nelson T.E., “ Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system”, *Molecular Neurobiology*, 15, 3, 307–339(1997).
- Guan, H.,and other,” CD44 reciprocally regulates the differentiation of encephalitogenic Th1/Th17 and Th2/regulatory T cells through epigenetic modulation involving DNA methylation of cytokine gene promoters, thereby controlling the development of experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Journal of Immunology*,186,12,695-6964,(2011).
- Guo,W., and other, “ Involvement of lncRNA-1700040D17Rik in Th17 cell differentiation and the pathogenesis of EAE”, *International Immunopharmacology*,47,141-149,(2017).
- Høglund,R.A., Maghazachi,A.A., “Multiple sclerosis and the role of immune cells”, *World J Exp Med*, 4(3),27-37,(2014).
- Hohlfeld,R., and Wekerle,H.”β-Amyloid: enemy or remedy?” *Sci Transl Med*, 4,145-24(2012).
- Horn,K.L., Kronsbein,H.C., and Weber,M.S.” Targeting B cells in the treatment of multiple sclerosis: recent advances and remaining challenges”, *Ther Adv Neurol Disord.*,6(3),161– 173,(2013).

- Kavrochorianou, N., Markogiannaki, M., and Haralambous, S., "IFN- β differentially regulates the function of T cell subsets in MS and EAE.", *Cytokine Growth Factor Rev.*, 30,47- 54,(2016).
- Korn, T and other, "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* ,27,485-517(2009).
- Lazzeri, E. and Romagnani P., "CXCR3-binding chemokines: Novel multifunctional therapeutic targets", *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.*, 5,1,109–118, (2005).
- Li, X., Zhao, L., and other, "Carnosol Modulates Th17 Cell Differentiation and Microglial Switch in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", *Front. Immunol.*, doi.org/10.3389/fimmu.2018.01807,(2018).
- Lin, S. X., and other, "The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase" *ASN Neuro.*, 3,2,(2011).
- Luo J., Zhang C., and Deng X., and other, "IL-2 Inhibition of Th17 Generation Rather Than Induction of Treg Cells Is Impaired in Primary Sjögren's Syndrome Patients.", *Front. Immunol*, 9, 1755,(2018).
- Ludwig Kappos, M.D., and other, "Daclizumab HYP versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis", *N Engl J Med* ., 373,1418-1428,(2015).
- Maghazachi, A. A., "Role of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis", (eds: M. C. Béné and A. Tommasini), POB 1103, 0317 Oslo, Norway, 14,(2012).
- Milo, R., and Miller, A., "Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis", *Journal homepage: elsevier*, 13,518–52, (2014).
- Mostaid M.S., and other, "An Interleukin-1 beta (IL1B) haplotype linked with psychosis transition is associated with IL1B gene expression and brain structure.", *Schizophr Res.* 18,5,(2018).
- Ng, A., and other, "IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis", *Scientific Reports*, 8,12050 ,(2018).
- O'Brien, K., Gran, B., and Rostami, A., "T-cell based immunotherapy in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis", *Immunotherapy*, 2(1), 99– 115,(2010).
- Önder, G., "Multipl sklerozda transkranyal manyetik stimülasyon sonuçları ile ekspaned dizabilite status skalası skorları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.", (Uzmanlık tezi), Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği, İstanbul,(2006).

- Özbek,M.,” T Lenfositlerin Gelişimi”, *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, 2(2),104-113,(2014).
- Özbülül,D., “Multiple Skleroz Belirtileri, Tanı ve Tedavisi”, Yüksek Lisans, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,Kayseri,(2012).
- Parkin,J.,and Cohen,B.,” An overview of the immune system”, *The Lancet* ,357, 1777– 89,(2001).
- Peyraud, F.,and other,” CSF-1R Inhibitor Development: Current Clinical Status”, *Curr Oncol Rep.*, 19(11),70,(2017).
- Ponta, H.,and other,” CD44: From adhesion molecules to signalling regulators”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 1, 1, 33-45,(2003).
- Pronker,M.F.,and other, “Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling”, *Nature Communications*,7,13584,(2016).
- Puri, K. D., Paolo, J. A. D.,and Gold, M.R.,” B-Cell Receptor Signaling Inhibitors for Treatment of Autoimmune Inflammatory Diseases and B-Cell Malignancies”, *International Reviews Of Immunology* ,32(4),397-427 (2013).
- Pulugulla, S.H.,and other,” Distinct mechanisms regulate IL1B gene transcription in lymphoid CD4 T cells and monocytes.”, *Cytokine.* , 111,373-381,(2018).
- Sevim , S., “Multipl Skleroz Atakları Üzerine Güncelleme: Tanım, Patofizyoloji, Özellikler, Taklitçiler ve Tedavi”, *Turk J Neurol* , 22,99-108,(2016).
- Slavin, A., Kelly,M. L.,and other,” Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis.”, *Autoimmunity.*,43(7),504-13,(2010).
- Soliman, M.A.,” IL-10 polymorphisms and T-cell subsets could affect the clinical presentation and outcome of childhood immune thrombocytopenia in Egyptian population.”, *APMIS.* , 126(5),380-388,(2018).
- Toker, H.” The effects of IL-10 gene polymorphism on serum, and gingival crevicular fluid levels of IL-6 and IL-10 in chronic periodontitis.” *J Appl Oral Sci.*, 26 , doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0232 (2018).
- Thompson,A.J., Banwell,B.L., and Barkhof,F.” Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria”,*Lancet/ neurology*,17, 162–73,(2018).
- Toscano,J.H.B., Lopes,L.G.,and other,” Identification of appropriate reference genes for local immune-related studies in Morada Nova sheep infected with *Haemonchus contortus*” *Molecular Biology Reports*, 1253–1262,(2018).
- Tuosto,L., “Targeting Inflammatory T Cells in Multiple Sclerosis: Current Therapies and Future Challenges”, *Austin J Mult Scler & Neuroimmunol*, 2(1),(2015).

- Truscott,R.J.W., andFriedrich,M.G.,” Can the Fact That Myelin Proteins Are Old and Break down Explain the Origin of Multiple Sclerosis in Some People?”, *J Clin Med.* , 7,9,82018).
- Tüzün,E.,” Multipl Skleroz Patogenezinde B Hücrelerinin Rolü ve B Hücre Karşıtı Monoklonal Antikor Tedaviler”,Doktora, *İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul*,(2011).
- Voskuhl, R.R., Martin, R.,and other,” T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes.”, *Autoimmunity*.15(2),137-43.(1993).
- Yang,L., Yang,S.,and other,” Role of chemokines and the corresponding receptors in vitiligo: A pilot study”, *J Dermatol.*, 45(1),31-38,(2018).
- Yadav,V.,and other,” Complementary and alternative medicine for the treatment of multiple sclerosis”, *Expert Rev Clin Immunol.*, 6,3,381–395,(2010).
- Yoon,S.,and other,” NF- κ B and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells”, *Oncogene*,31,3467–3481,(2012).
- Warrington,R., Watson,W.,and other,” An introduction to immunology and immunopathology”, *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S1(2011).
- Waubant E.,and other, “IFN-beta lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS.”, *Neurology*.,60,52-57(2003).
- Wekerle,H.,”B cells in multiple sclerosis”, *Autoimmunity*, 50,1, 57-60,(2017).
- Ziemssen,T.,and Schrempf,W.,” Glatiramer Acetate: Mechanisms of Action in Multiple Sclerosis”, *International Review of Neurobiology*,79,537-570,(2007).
- Zou, Y.R., Grimaldi, C.,Diamond, B.,“Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology”, 1, 207-230, (2017).
- Quarles, “R. H., Myelin-associated glycoprotein (MAG): past,present and beyond”, *Journal of Neurochemistry*,100, 1431–1448,(2007)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma SANDAL

Doğum Yeri ve Tarihi : Babadağ/DENİZLİ ,12.02.1991

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversite

Y. Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : fatmasandal@windowslive.com

İletişim Adresi : Mollaahmet mah. No:278 Babadağ/DENİZLİ

Yayın Listesi

- Sandal, F., Kale, E., SEN, A., “Investigation of the Anti-Tumourogenesis Potentialof 5-Aminosalicylic Acid: Lack of Efficacy in Caco-2 Cells” , Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB), Belarus (P484), 2017.
- Sandal, F., Kale, E., Ozgun-Acar, O., Sen, A., “Comparative Evaluation of the Anti-Inflammatory Effect of 5 Aminosalicylic Acid in Caco-2 and HepG2 Cell Lines” 5th International Congress of the Molecular biology association of Turkey (P171), 2017.
- Sandal, F., Celik, G., Kale, E., Zivkovic, A., Stark, H., Sen, A., “Functional Investigation of the Anti-neuroinflammatory Activity of the Novel Ciproxifan-Derivative ST-1505 in SH-SY5Y Cells as Multitarget Agent for Multiple Sclerosis and Cognitive Impairment ” 6th International Congress of the Molecular biology association of Turkey (P75),2018.

