

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL MULTIPL SKLEROZ (MS) FARE MODELİNDE
SCHİSANDRİN B VE ALANTOLAKTON'UN
İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Mustafa ÇAKIR

1.Danışman

Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2.Danışman

Doç.Dr. Ahmet EKEN

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TDK-2018-7885 nolu proje ve TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi
Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.**

Doktora Tezi

AĞUSTOS 2020

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunulduğunu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mustafa ÇAKIR

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Deneysel Multipl Skleroz (MS) Fare Modelinde Schisandrin B ve Alantolakton'un İmmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Mustafa ÇAKIR

1.Danışman
Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2.Danışman
Doç.Dr. Ahmet EKEN

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.Hamiyet ALTUNTAŞ

Prof.Dr.Hamiyet ALTUNTAŞ danışmanlığında **Mustafa ÇAKIR** tarafından hazırlanan “**Deneysel Multipl Skleroz (MS) Fare Modelinde Schisandrin B ve Alantolakton'un İmmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.... /... / 2020

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr.Hamiyet ALTUNTAŞ
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof.Dr. A. Gaye Tomatır
(Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof.Dr. Ercan Kurar
(Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof.Dr. Çetin Saatçi
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Doç.Dr. Zuhale Hamurcu
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

Bu Tez Çalışması TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora Tezim sürecinde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ'a ve Sayın Doç.Dr. Ahmet EKEN'e;

Doktora ders ve tez süreci boyunca beni destekleyen, benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarıma;

Doktora Tez çalışmamın yapılmasında maddi katkı sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne, ÖYP Kurum Koordinatörlüğü'ne ve TÜBİTAK'a;

Her zaman olduğu gibi bu süreçte de moral ve motivasyon sağlayan her daim yanımda olan annem ve babama;

Son olarak, her zaman destekleyen hayat arkadaşım Şerife ÇAKIR ve oğlum Kadir Barış ÇAKIR'a sonsuz teşekkür ederim.

DENEYSEL MULTIPL SKLEROZ (MS) FARE MODELİNDE SCHISANDRİN B VE ALANTOLAKTON'UN İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa ÇAKIR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ağustos 2020

1. Danışman: Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2. Danışman: Doç.Dr. Ahmet EKEN

KISA ÖZET

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sistemini etkileyen, kronik inflamatuvar demiyelinizan hastalıdır. Özellikle MS genç erişkinlerde görülen, omurilik beyaz cevherini birçok lokalizasyonda etkileyen bulgularla karakterize olan kronik bir hastalıdır. MS 20-40 yaş arasında başlar ve dünya genelinde yaklaşık 2.5 milyon kişiyi etkilemektedir. MS genç bireylerde neden olduğu fiziksel ve psikolojik hasarlarla yaşam kalitesini düşüren ve hastaya/sağlık sistemine ekonomik külfetler yükleyen bir hastalıdır. MS tedavisinde kullanılan birçok anti-inflamatuvar, immünomodülatör ve immünosüpresif ilaç, relapsları azaltmakta fakat progresif hastalıkta sınırlı etki göstermektedir. Bu anlamda MS'yi tedavi etmek ya da önlemek için akson koruyucu yaklaşım gösterebilecek yeni ajanların keşfedilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE) fare modelinde tedavi amacıyla sırasıyla; *Schisandra chinensis* bitkisinde en bol bulunan Schisandrin B (Sch-B) ve *Inula helenium'dan* izole edilen bir seskiterpen lakton olan Alantolakton (ALT) etken maddeleri kullanılmıştır. Bu etken maddelerin, yapılan çalışmalarda yardımcı T hücrelerini doğrudan ya da indirek yollarla etkilediğini gösterilmiştir. Bu çalışmada, Sch-B ve ALT, EAE klinik skorunu anlamlı düzeyde düşürmüştür. Aynı zamanda bu iki molekül demiyelinizasyonu da azalmıştır. Beyin, spinal kord, dalak ve lenf nodundan alınan hücreler akım sitometri ile analiz edilmiş ve bu iki molekülün CD4⁺ T hücrelerini etkilediği gösterilmiştir. Sonuçlarımızdan elde edilen bilgilerin ışığında, Sch-B ve ALT'nin, MS'in önlenmesinde etkili ilaç adayları olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Alantolakton, EAE, Multipl Skleroz, Schisandrin B, Th1, Th17.

**INVESTIGATION OF IMMUNOMODULATOR EFFECTS OF SCHISANDRIN B
AND ALANTOLACTON IN EXPERIMENTAL MULTIPLE SCLEROSIS (MS)
MOUSE MODEL**

Mustafa ÇAKIR

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
Doctor Thesis, August 2020**

1.Supervisor: Professor Hamiyet ALTUNTAŞ

2.Supervisor Associate Professor Ahmet EKEN

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease that affects the central nervous system. MS is a chronic disease in especially young adults characterized by findings affecting the spinal cord white matter in a multiple localization. It begins between the ages of 20-40 and affects around 2.5 million people worldwide. MS is a disease that reduces the quality of life with physical and psychological damages caused in the young individuals and imposes economic burdens on the patient / health system. Many anti-inflammatory, immunomodulatory and immunosuppressive drugs used in the treatment of MS reduce relapses but show limited effects in progressive disease. In this sense, it is necessary to discover new agents that can show axon-protective approach to treat or prevent MS. In this study, in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model, by the purpose to treatment, respectively; The active substances of the most abundant Schisandrin B (Sch-B) in the *Schisandra chinensis* plant and Alantolactone (ALT) which a sesquiterpene lactone isolated from *Inula helenium*, were used. Studies with these active ingredients have been shown to affect adjuvant T cells either directly or indirectly. In this study, Sch-B and ALT significantly reduced EAE clinical scores. At the same time, these two molecule is also reduced demyelination. Cells from the brain, spinal cord, spleen and lymph node were analyzed by flow cytometry, and these two molecules have been shown to affect CD4⁺ T cells. In the light of the information obtained from our results, Sch-B ve ALT are could thought to be effective drug candidates in the prevention of MS.

Keywords : Alantolactone, EAE, Multiple Sclerosis, Schisandrin B, Th1, Th17.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Multipl Skleroz.....	3
2.1.1. MS Epidemiyolojisi ve Prevalansı	3
2.1.2. Genetik.....	5
2.1.3. Çevresel Faktörler.....	6
2.1.4. Patogenez ve İmmünopatogenez	7
2.1.5. Multipl Skleroz Sınıflandırılması	8
2.1.5.1. Tekrarlayan-Hafifleyen Multipl Skleroz (THMS).....	8
2.1.5.2. İkinci İlerleyici Multipl Skleroz (İİMS).....	9
2.1.5.3. Birincil İlerleyici Multipl Skleroz (BİMS)	9
2.1.5.4. İlerleyici Tekrarlayan Multipl Skleroz (İTMS)	9
2.1.6. MS tedavisi	10
2.1.6.1. Akut Atak Tedavisi	10
2.1.6.2. İmmün Modulator ve İmmünesupresif Tedaviler.....	11
2.1.6.2.1. İnterferon-β (IFN-β-1b ve IFN-β-1a; Avonex, Rebif, Betaseron)	11
2.1.6.2.2. Glatiramer asetat (Copaxone).....	11
2.1.6.2.3. Mitoxantrone (Novantrone).....	12
2.1.6.2.4. Natalizumab (Tysabri).....	12
2.1.6.2.5. Rituximab	12
2.1.6.2.6. Fingolimod (FTY720)	13
2.1.6.3. Semptomatik Tedaviler	13
2.2. İmmün Sistem	13
2.2.1. T hücreleri.....	14
2.2.2. Adaptif İmmünite ve CD4 ⁺ T Hücreleri	15
2.2.2.1. Naif T hücre Aktivasyonu.....	16
2.2.2.2. CD4 ⁺ T hücrelerinde Sitokin sinyalizasyonu.....	17
2.2.2.2.1. IL-12 Sitokin Ailesi.....	18
2.2.2.2.2. IL-6 Sinyalizasyonu	19
2.2.2.2.3. IL-17 Sitokin Ailesi.....	20
2.2.3. Yardımcı T (Th) Alt tipleri (T Helper Subsets).....	20
2.2.3.1. Th2 hücreleri	21
2.2.3.2. Th9 hücreleri	22
2.2.3.3. Th22 hücreleri	22

2.2.3.4.Tr1 hücreleri.....	22
2.2.3.5.iTr35 Hücreleri.....	23
2.2.3.6.Th1 Hücreleri	23
2.2.3.7.Treg Hücreleri	25
2.2.4.EAE'de T düzenleyici hücreler	27
2.2.4.1.Th17 Hücreleri	27
2.2.4.2.Th17 hücreleri ve Treg arasındaki ilişki	29
2.3.Schisandrin B (Sch-B).....	30
2.3.1.Schisandrin B'nin Oksidatif Strese Etkisi	31
2.3.2.Schisandrin B'nin beyin hücrelerine Etkisi	33
2.3.3.Schisandrin B'nin İnflamasyon ile İlişkisi	34
2.3.4. Schisandrin B'nin İnsanlarda Kullanılabilirliği ve Toksisitesi.....	36
2.4.Alantolakton (ALT).....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Gereçler	42
3.1.1. Demirbaş Malzemeler.....	42
3.1.2. Sarf Malzemeler.....	43
3.2. Yöntem	44
3.2.1.Sch-B ve ALT'nin Hazırlanması ve Uygulanması.....	44
3.2.2. Farelerin İmmünizasyonu	45
3.2.3. Farelerin Skorlanması.....	45
3.2.4. Fare Dokularının Elde Edilmesi	46
3.2.4.1. Lenf Nodundan Lenfosit Elde Edilmesi.....	46
3.2.4.2.Dalaktan Lenfosit Elde Edilmesi	46
3.2.4.3. Beyin ve Spinal Kord Elde Edilmesi	47
3.2.4.3.1. Beyin ve Spinal Kord'tan Lenfosit Hücre Elde Edilmesi.....	47
3.2.4.3.1.1. Parçalama solüsyonu hazırlanması.....	47
3.2.4.3.1.2. Gradyan solüsyonu hazırlanması.....	48
3.2.5. Beyin, Spinal Kord, Dalak ve İnguinal Lenf Nodundaki Lenfositlerin Kantifiye Edilmesi.....	48
3.2.5.1. Merkezi sinir sistemi ve periferdeki Th hücrelerinin miktarının belirlenmesi ve çeşitli sitokin üretimi, transkripsiyon faktörleri ve fosforilasyonlarının belirlenmesi.....	48
3.2.5.1.1. Th hücrelerinin miktarının belirlenmesi.....	48
3.2.5.1.2. Th hücrelerinin çeşitli sitokin üretimi	49
3.2.5.1.3. Foxp3 transkripsiyon faktörü	49
3.2.5.1.4. Th hücrelerinin fosforilasyonu	50
3.2.6.Histolojik Yöntemler	50
3.2.6.1.Doku Takibi	50
3.2.6.2.Luxol Fast Blue Myelin Boyama	51
3.2.10. Verilerin İstatistiksel analizi	51
4. BULGULAR.....	52

Bu bölümde MS fare modelinde kullandığımız Sch-B ve ALT'nin sonuçları 4.1 ve 4.2 olmak üzere ayrı ayrı verilmiştir.	52
4.1.Schisandrin B'nin MS'e Etkisi.....	52
4.1.1. Schisandrin B'nin Priminge etkisi.....	52
4.1.1.1. Schisandrin B'nin İnguinal Lenf Noduna Etkisi.....	52
4.1.1.2. Schisandrin B'nin Dalağa Etkisi.....	60
4.1.2. Schisandrin B'nin efektör fazda etkisi.....	67
4.1.2.1. Schisandrin B'nin MS klinik Skorlaması	68
4.1.2.2. Schisandrin B'nin Demiyelinizasyona Etkisi	68
4.1.2.3. Schisandrin B'nin MSS'ne infiltre olan T hücrelerine Etkisi.....	69
4.1.3. Schisandrin B'nin Lenf Noduna etkisi	83
4.1.3. Schisandrin B'nin Dalağa etkisi	93
4.2.Alantolakton'un MS'e Etkisi	101
4.2.1. Alantolakton'un Priminge etkisi.....	101
4.2.1.1. Alantolakton'un İnguinal Lenf Noduna Etkisi.....	101
4.2.1.2. Alantolakton'un Dalağa Etkisi.....	107
4.2.2. Alantolakton'un MSS etkisi	113
4.2.2.1. Alantolakton'un MS klinik Skorlaması	113
4.2.2.2. Alantolakton'un Demiyelinizasyona Etkisi	114
4.2.2.3. Alantolakton'un MSS'e infiltre olan T hücrelerine Etkisi.....	115
4.2.3. Alantolakton'un Lenf Noduna etkisi	124
4.2.3. Alantolakton'un Dalağa etkisi	133
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	141
6.KAYNAKLAR	150
EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	179

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Priming faz için kullanılan fare grupları.....	44
Tablo 3.2. Efektör faz için kullanılan fare grupları.....	44
Tablo 3.3. Farelerin klinik skorlaması.....	45



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. MS global prevalansı	5
Şekil 2.2. Multipl sklerozda 4 klasik hastalık seyri fenotipi	10
Şekil 2.3. T hücrelerinin antijen sunan hücrelerle etkileşimi.....	15
Şekil 2.4. Memelilerde T hücre soyları (Lineages).....	15
Şekil 2.5. T hücre aktivasyonunun üç sinyal modeli	17
Şekil 2.6. IL-12 sitokin ailesinin dört mevcut üyesi ve aşağı doğru sinyal yolları	19
Şekil 2.7. A) Schisandra chinensis, B) Schisandra chinensis kurutulmuş meyveleri, C) Schisandrın B'nin kimyasal formülü	31
Şekil 2.8. Sağlıklı bir yaşam süresinin uzatılmasında Schisandrın B'nin neden olduğu cevap	32
Şekil 2.9. İnsana denk doz hesaplamasında kullanılan formül	36
Şekil 2.10. Alantolakton ve bitkisel kaynakları	38
Şekil 2.11. Alantolakton, Sinyal yolu şeması.....	39
Şekil 2.12. STAT3 sinyal yolunda alantolakton aktivitesinin şematik bir modeli	41
Şekil 4.1. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	53
Şekil 4.2. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi.....	54
Şekil 4.3. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.....	55
Şekil 4.4. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	56
Şekil 4.5. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.....	57
Şekil 4.6. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-Pacific Blue ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi.....	59
Şekil 4.7. LN'dan elde edilen lökositlerin p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.	60
Şekil 4.8. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	61
Şekil 4.9. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi.....	62
Şekil 4.10. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	63
Şekil 4.11 DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.....	64
Şekil 4.12. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-Pacific Blue, p-Smad2/3-PE ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi.....	66
Şekil 4.13. DLK'tan elde edilen lökositlerin p-P38-APC, p-ERK1/2-APC ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.....	67
Şekil 4.14. C57BL6 farelerinin MS klinik skorlaması.....	68

Şekil 4.15. C57BL6 farelerinin Demiyelinizasyon skorlaması.....	69
Şekil 4.16. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	70
Şekil 4.17. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.....	71
Şekil 4.18. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.	72
Şekil 4.19. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.	74
Şekil 4.20. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.	75
Şekil 4.21. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.	77
Şekil 4.22. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	78
Şekil 4.23. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.	79
Şekil 4.24. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.	80
Şekil 4.25. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-Pacific Blue ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi.	82
Şekil 4.27. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	83
Şekil 4.28. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve lökositlerinin analizi.....	84
Şekil 4.29. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi.....	86
Şekil 4.30. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	87
Şekil 4.31. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.	88
Şekil 4.32. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.	89
Şekil 4.33. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC ve Foxp3-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.	91
Şekil 4.34. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-6-PE, p-Smad2/3-PE ve p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi.....	92
Şekil 4.35. LN'dan elde edilen lökositlerin p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-NF κ b-PE ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.	93
Şekil 4.36. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	94
Şekil 4.37. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.	96

Şekil 4.38. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.	97
Şekil 4.39. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, Foxp3-Pacific Blue, IL-6-PE ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.	99
Şekil 4.40. DLK'tan elde edilen lökositlerin p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.	100
Şekil 4.41. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	101
Şekil 4.42. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.	103
Şekil 4.43. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerinin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	104
Şekil 4.44. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, IL-22-PE, Foxp3-Pacific Blue, ve IL-6-PE ile boyanması ve analizi.	105
Şekil 4.45. LN'dan elde edilen lökositlerin p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.	106
Şekil 4.46. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	107
Şekil 4.47. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi.	108
Şekil 4.48. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	109
Şekil 4.49. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, IL-22-PE ve IL-6-PE ile boyanması ve analizi.	110
Şekil 4.50. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-Pacific Blue, p-Smad2/3-PE ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi.	112
Şekil 4.51. C57BL6 farelerinin MS klinik skorlaması. Kontrol (n:16) ve ALT (n:14) gruplarının karşılaştırılması. *** p<0.001; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis, ALT: Alantolakton, D: Gün.	113
Şekil 4.52. C57BL6 farelerinin demiyelinizasyon skorlaması.	114
Şekil 4.53. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	115
Şekil 4.54. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi.	116
Şekil 4.55. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi.	118
Şekil 4.56. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	119
Şekil 4.57. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.	121
Şekil 4.58. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-Pacific Blue ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi.	123

Şekil 4.59. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	124
Şekil 4.60. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.....	125
Şekil 4.61. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi.....	127
Şekil 4.62. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	128
Şekil 4.63. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.....	129
Şekil 4.64. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-6-PE ve Foxp3-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.....	131
Şekil 4.65. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-6-PE, p-Smad2/3-PE ve p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi.....	132
Şekil 4.66. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	133
Şekil 4.67. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.....	134
Şekil 4.68. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.....	136
Şekil 4.69. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi.....	137
Şekil 4.70. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, Foxp3-Pacific Blue, IL-6-PE ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi.....	139
Şekil 4.71. DLK'tan elde edilen lökositlerin p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanması ve analizi.....	140

KISALTMALAR VE SİMGELER

ASCT2	: Alanin, serin, sistein transporter 2 membran taşıma proteini
ATM	: Serin-treonin kinaz
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2 proteini
Ache	: Asetilkolinesteraz
ASH	: Antijen Sunan Hücreler
BBB	: Kan Beyin Bariyeri
B-Heks	: B-Ekzosaminidaz
BSA	: Body Surface Area
CO	: Karbon Monoksit
COX- 2	: Siklooksijenaz-2
CRMA1	: CO Salma Molekülü-A1
CTLA-4	: Sitotoksik T-Lenfositlere Bağlı Protein 4
DH	: Dendritik Hücre
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSS	: Dextran Sülfat Sodyum
EAE	: Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit
ERK	: Extracellular-Signal-Regulated Kinase
GSH	: Glutasyon
GWAS	: Genom Boyu İlişkilendirme Analizleri
HED	: Human Equivalent Dose
HLA	: İnsan Lökosit Antijen
HLA-DR	: İnsan Lökosit Antijen-Antijen D İle İlişkili
HO-1	: Hem Oksijenaz-1
ICOS	: İndüklenebilir T Hücresi Ko-Stimülatörünü
IFN- γ	: İnterferon Gamma
IL-2	: İnterlökin 2
IRF4	: Ifn Düzenleyici Faktör 4
LAG-3	: Lenfosit Aktivasyon Geni 3
LPS	: Lipopolisakkarit
LTC4	: Lökotrien C4
LTI	: Lenfoid Doku İndükleyici

MHCII	: Majör Doku Uyumu Kompleksi II
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NK	: Doğal Öldürücü
NOX4	: NADPH Oksidaz 4
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölüm Proteini 1
PGD2	: Prostaglandin D2
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TCR	: T Hücresi Reseptörü
Th1	: Yardımcı T1 Hücresi
Th17	: Yardımcı T-17 Hücresi
Th2	: Yardımcı T2 Hücresi
TNF- α	: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
Treg	: Düzenleyici T Hücresi

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sistemini etkileyen, kronik inflamatuvar demiyelinizan hastalığıdır. Özellikle MS genç erişkinlerde görülen, omurilik beyaz cevherini çoklu lokalizasyonda etkileyen bulgularla karakterize olan kronik yaygın bir hastalıktır. MS genç bireylerde neden olduğu fiziksel ve psikolojik hasarlarla yaşam kalitesini düşüren ve hastaya/sağlık sistemine ekonomik külfetler yükleyen bir hastalıktır. MS hastalığı genelde relapslar ve remisyonlar şeklinde başlayıp hastaların bir kısmında progresif faza ilerlerken, bir kısmında hastalık başlangıcından itibaren progresiftir. MS tedavisinde kullanılan birçok anti-inflamatuvar, immünomodülatör ve immünosüpresif ilaç, relapsları azaltmakta fakat progresif hastalıkta sınırlı etki göstermektedir. Henüz progresif hastalığı durduracak, yavaşlatacak etkili bir ajan bulunmamaktadır. Bu anlamda MS'i tedavi etmek ya da önlemek için akson koruyucu yaklaşım gösterebilecek yeni ajanların keşfedilmesi gerekmektedir. Tarih boyunca ve günümüzde bitkiler ilaç kaynağı olarak kullanılmış ve kullanılmaktadır. Günümüzde birçok ilacın etken maddesi bitki kökenlidir. Yaptığımız deneysel MS Fare Modelinde de Çin'de alternatif tıpta kullanılan bitki kökenli iki etken madde, Schisandrin B (Sch-B) ve Alantolakton (ALT) molekülleri, kullanılmıştır. *Schisandra chinensis* bitkisinde en bol bulunan aktif madde olan Sch-B'nin, reaktif oksijen türlerini uzaklaştırdığı gösterilmiştir (Chiu ve ark., 2006a; Ip ve Ko, 1996; Zeng ve ark., 2012). Sch-B'nin anti inflammatuvar etkileri tanımlanmış olup, bir çalışmada mürin Th17/Treg dengesini Treg lehine bozduğu, parsiyel olarak bu etkinin Nrf2, HO-1 aracılığı ile gerçekleştiği ortaya konmuştur (Chen ve ark., 2016; Chun ve ark., 2015). Fakat, bugüne değin Sch-B'nin inflamatuvar bağırsak modeli (IBD) modeli haricinde otoimmün hastalık modelleri üzerindeki etkisi çalışılmamıştır. Ayrıca Sch-B 'nin mürin Th17/Treg dengesini Treg lehine değiştirdiği gösterilmesine karşın, insan CD4+ hücrelerinde aynı durumun geçerli olup olmadığı ve diğer CD4+ T hücre subsetlerine etkisi test edilmemiştir. Benzer şekilde Sch-B ile ilgili olarak, insan B hücreleri de hiçbir çalışmaya konu olmamış mikrogliya üzerindeki etkileri ise tek bir çalışmaya konu olmuştur (Zeng ve ark., 2012). 2019 yılındaki bir çalışmada insan dendritik hücrelerince IL-6, IL-

12 üretiminin Sch-B tarafından baskılandığı gösterilmiştir (Kortesoja ve ark., 2019). Bu sonuç, IL-6'nın, Th17 gelişimindeki yeri düşünüldüğünde, Kortesoja ve ark.'nın çalışması da Sch-B'nin insan Th17 üretimi üzerine etkileri olacağına işaret etmektedir. ALT ise, *Inula helenium*'dan izole edilen bir seskiterpen laktondur. Çalışmalarda ALT'nin anti inflamatuvar özelliklerinin, IL-6, STAT3, Nrf gibi Th17/Treg gelişim ve fonksiyonlarını düzenleyen molekülleri ve dolayısıyla potansiyel olarak Th17/Treg hücrelerinin dengesini etkileyebilme kabiliyetinin altını çizmekte ve bu molekülün otoimmün hastalık modellerinde ve hastalıklarında kullanılabilir bir aday olabileceğine işaret etmektedir (Kim ve ark., 2017b). Bugüne değin astım ve dermatit modeli haricinde otoimmünite modellerinde ve özellikle MS modelinde ALT'nin etkileri test edilmemiştir. Klinikte kullanılan ağızdan alınan tek ilaç Fingolimod olmasına rağmen, tedavi boyunca kalp problemleri, görme problemleri ve diğer ciddi komplikasyonlar gibi olası yan etkiler görülebilmektedir. Bu çalışmada kullanılan ALT ve Sch-B'nin uzun dönem çok yüksek dozlarda toksisitesine rastlanmamıştır (Ko ve ark., 2008; Ko ve Lam, 2002; Leong ve Ko, 2016),(Shi ve ark., 2011). Bu da MS tedavisinde kullanılması durumunda herhangi bir olumsuz yan etkinin olmayacağını göstermektedir. Sonuç olarak; bu tezde ilk kez Sch-B ve ALT'in MS hastalığına karşı etkisi çalışılmıştır. Aynı zamanda, Sch-B ve ALT'in merkezi sinir sistemine (MSS) ve drene lenf nodüllerine infiltre olmuş lenfositlerin gen ekspresyonuna ve sinyal yollarına etkisi ekspresyon ve protein düzeyinde ilk defa çalışılmıştır. Çalışma verilerimize göre, Sch-B ve ALT'in MS hastalığı patogenezinde önemli rolü olan Treg/Th17 mekanizması üzerine etkisi araştırıldığında tedavi açısından alternatif bir seçenek sağlayabilir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edeceğimiz veriler ışığında bu etken maddelerin insanların kullanımına sunulabilmesi için yeni projeler hazırlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

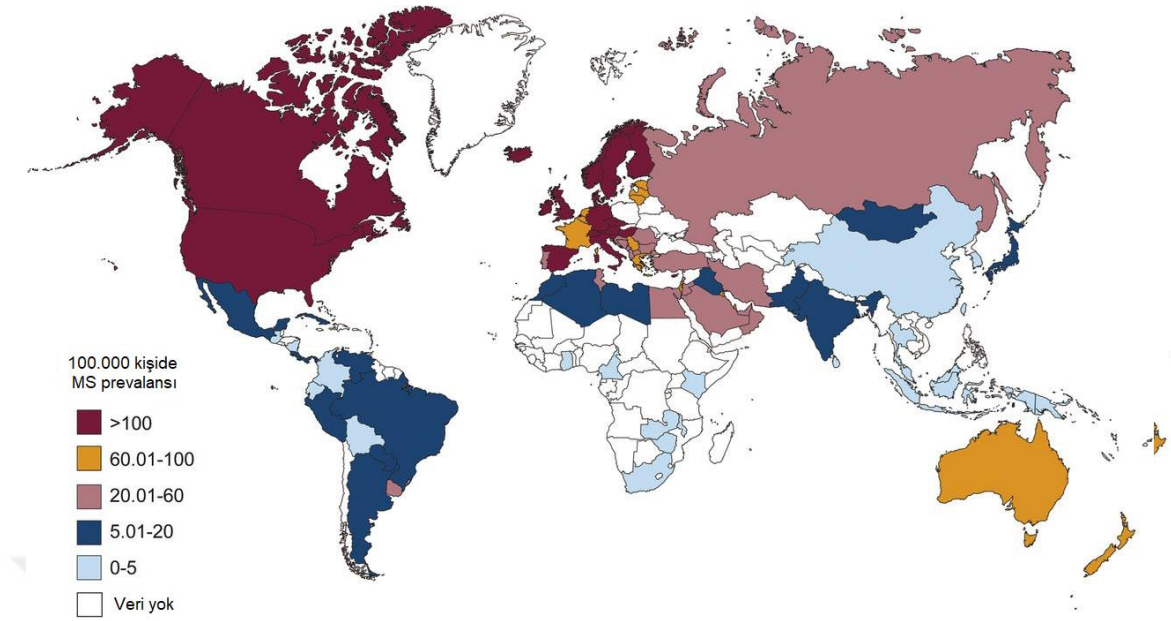
2.1. Multipl Skleroz

Kronik ve öngörülemez bir hastalık olan Multipl Skleroz (MS) ilk olarak 1824'te Charles Prosper Ollivier tarafından tanımlanmıştır (Murray, 2009). MS, merkezi sinir sistemi (MSS) inflamasyonu ve regüle olmayan immün yanıtın kazanılmış ve doğal (doğuştan) elemanlarının aracılık ettiği nörodejenerasyonla ilişkili kronik nörolojik bir hastalıktır (Compston ve Coles, 2008; Hollenbach ve Oksenberg, 2015). MS patolojisi, iyi bilinen inflamatuvar infiltratlar, miyelin kılıflarının parçalanması, mikroglia aktivasyonu, astrositlerin ve gliozisin proliferasyonu ve oksidatif stres ve mitokondriyal hasara bağlı değişken aksonal dejenerasyon dereceleri ile karakterizedir (Lassmann, 2014; Simons ve ark., 2014). Demiyelinize lezyonlar, hem beyaz hem de gri maddeyi içeren MSS yoluyla yayılır. MS, genç erişkinlerde progresif nörolojik hasarların yaygın bir nedenidir, ancak hastalık, kendini hafif bir hastalıktan, hızla değişen bir morfoloji olarak ifade eden heterojen bir yapıda gösterebilir. Bu zayıflatıcı ve öngörülemez hastalığın bireysel ve sosyoekonomik sonuçları çarpıcıdır. Tanıdan 15 yıl sonra hastaların %80'inden fazlası fonksiyonel veya bilişsel kısıtlılıklara sahiptir ve bu hastaların yaklaşık yarısı yardımla yürümektedir (Hauser, 2008). MS için on iki FDA onaylı tedavi şu anda mevcuttur ve bazı faz çalışmaları halen devam etmektedir. Bununla birlikte, bu tedavilerin hastalığın uzun dönem prognozu üzerindeki etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir (Hauser ve ark., 2013). Ayrıca, bu terapiler çeşitli güvenlik ve toksisite profillerine sahiptir ve mevcut seçenekler arasında ne zaman başlanacağını, değiştirileceğini veya hatta nasıl seçileceğini gösteren bir karşılaştırmalı veri bulunmamaktadır. Dahası, MS'in ilerleyen formları için hiçbir tedavi yoktur (Ontaneda ve ark., 2015).

2.1.1. MS Epidemiyolojisi ve Prevalansı

MS Avrupalı genç yetişkinlerde görülen travmatik olmayan nörolojik hastalıkların içinde en yaygın olanıdır. MS genellikle 20–50 yaş aralığını etkilemektedir. Daha çok 30 yaşın başlangıcını etkiler, ancak hastalık çocukluk döneminde ve 60 yaşından sonra gelişebilir ve kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 3 kat daha sık görülür (Milo ve Kahana, 2010; Milo ve Miller, 2014). Dünya genelinde yaklaşık iki buçuk milyon insanı ve ABD'de

400.000'den fazla kişiyi etkilemektedir (Pugliatti ve ark., 2002). MS prevalansı coğrafya ve etnik kökene göre değişmektedir. Gerçekten de, kayda değer istisnalar dışında MS, yüksek enlem bölgelerinde ve Kuzey Avrupa populasyonlarında daha sık görülmektedir (Simpson ve ark., 2011). Kingwell ve arkadaşları (Kingwell ve ark., 2013), 1985 ve 2011 yılları arasında yayımlanan Avrupa populasyonlarında MS prevalansı ve insidansı ile ilgili populasyon temelli çalışmalarla ilgili kapsamlı bir literatür araştırması yapmışlardır ve bölgeler veya ülkeler içinde oldukça heterojen olduğunu belirtmişlerdir. İtalyan yarımadasının yanı sıra, en çok çalışılan İngiliz adalarıdır. Britanya Adalarındaki yaygınlık tahminleri, 100.000'de 96 ile 100.000'de 200'dür, İskoçya ve Kuzey İrlanda'dan gelen tahminler en yüksek olanlardır (Gray ve ark., 2008; McDonnell ve Hawkins, 1999; Sharpe ve ark., 1995). İstanbul'da MS prevalansı (101.3/100.000), Türkiye'nin kuzeyindeki kırsal bölgelerdeki yaygınlığın iki katından daha fazladır: Kandıra (61/100.000), Geyve (41/100.000), Erbaa (53/100.000) ve Kafkasya (68.97/100.000) (Alp ve Boru, 2012; Boru ve ark., 2011; Turk Boru ve ark., 2006). 2003 yılında Edirne'de MS prevalans oranının 33.9/100.000 olduğu bildirilmiştir (Y. Çelik ve ark., 2011). MS sıklığı Karabük'te 95.9/100.000, Akçakoca'da ise 46.1/100.000 bildirilmiştir (Boru ve ark., 2018). Araştırmalardaki zorluklara rağmen, MS, siyah Afrikalılarda ve Amerika ve Okyanusya'nın yerli populasyonlarında neredeyse yoktur. Dikkat çekici bir şekilde, MS'in görülme sıklığı son yüzyılda önemli ölçüde artmış gibi görünmektedir ve bu artışın temel olarak kadınlarda (Koch-Henriksen ve Sorensen, 2010; Orton ve ark., 2006) ve geleneksel olarak Hispanikler, Asyalılar ve Afrikalı Amerikalılar gibi düşük riskli olarak kabul edilen populasyonlarda ortaya çıkmasıdır (Şekil 2.1). MS'in nedeni hala tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, MS'in etiyojisinde genetik, immünolojik ve çevresel faktörler önemli yer tutmaktadır.



Şekil 2.1. MS global prevalansı (Browne ve ark., 2014).

2.1.2.Genetik

MS, karmaşık bir genetik hastalıktır. Bazı genetik çalışmalar MS'de ailesel agregasyonu olduğunu göstermiştir. MS olma riski, MS hasta yakınları ve monozigotik ikizlerde %30'luk bir uyum oranını göstermektedir. Dizigot ikizlerinde diğer kardeşlere benzer bir orana sahiptir, bu da intrauterin faktörlerin katkısı olmaksızın hastalık için önemli bir genetik bileşen olduğunu göstermektedir (Ebers ve ark., 1986; Hauser ve ark., 2013). Kardeşlere %2-%5 yaşam boyu risk verilmiştir ve MS hastalarının ebeveynleri ve çocukları %1 yaşam boyu risk altındadır (Ebers, 1994). Dünyadaki Vikinglerin yerleştiği bölgelerde MS'nin yüksek yaygınlığa sahip olması, bazı ırklarda MS'nin nadir görülmesi ve yüksek risk alanlarındaki düşük yaygınlıkların oluşu (örneğin; Amerika'da Afrikalı-Amerikalılar veya Hintliler, Orta Avrupa'daki çingenerler) da MS için genetik yatkınlığı destekler. En güçlü ilişki, majör doku uyumu kompleksi II (MHCII) bölgesinin İnsan lökosit antijen (HLA)-DRB1 alleli ile eşleşmesi olup, bu ilişki MS için otoimmün bir etiyojiye işaret eder. Genom Boyu İlişkilendirme Analizleri (GWAS) çalışmalarında, çoğunluğu hafif bireysel etkilere sahip olan, bağışıklık sistemi ile ilişkili olan 100'den fazla ek varyant belirlenmiştir (Hauser ve ark., 2013). HLA lokusunun immün yanıtı ve immün gelişmeleri yönlendiren temel bir bileşen olduğu iyi bilindiğinden, MHC'lerin hala MS genetik riskinin yaklaşık yarısını temsil etmesi şaşırtıcı değildir (Howard ve ark., 2016). MS'de ilişkili olduğu düşünülen HLA olmayan genler, T-hücre fonksiyonu ile

ilişkilidir ve bu da MS gelişiminde T hücre immünesinin öncü rolünü göstermektedir. Bağışıklık sisteminin birçok yönü MS'de T hücrelerinin rol oynadığını göstermiştir. Dolaşımdaki T hücreleri, kan beyin bariyeri endoteline bağlanır ve daha sonra parankime geçer. Microglia, geniş bir sitokin yelpazesinin salınmasına yol açan, proliferasyonu uyarır. Bu proliferasyon, T hücrelerinde artışa, B hücrelerinin aktivasyonuna ve toplu olarak miyelin yıkımına sebep olan önemli aktivitelerdendir. BOS'ta yardımcı T1 hücresi (Th1) benzeri sitokin düzeyleri ve diğer T hücresi ile ilişkili sitokinler hastalık progresyonu ile ilişkilidir (Calabresi ve ark., 1998). Beyaz insanlar hastalığın en yüksek insidansına sahiptir. Afrika kökenli Amerikalılarda hastalık daha az yaygın olmasına rağmen, bu popülasyonda daha şiddetli bir seyir eğilimi göstermektedir. Genel olarak, MS, Birleşik Devletlerde travma ve kas-iskelet sistemi hastalıklarını takiben 15 ila 50 yaşlarındaki bireylerde en sık görülen üçüncü ölüm nedenidir (Howard ve ark., 2016).

2.1.3. Çevresel Faktörler

MS patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülen birkaç çevresel faktör vardır. Ayrıca, MS gelişim riski, çocukluk dönemindeki ikamet yeri ile ilişkilendirilmiştir. İnsanlar, çocukluk döneminde yüksek riskli bölgelerden düşük riskli bölgelere göç ettikleri takdirde bu riski azaltmış veya çocuklar ise düşük riskli bölgeden yüksek riskli bölgelere göç ettikleri zaman, doğdukları yerlerindeki nüfusa göre artmış riske sahiplerdir (Dean ve Kurtzke, 1971; Elian ve ark., 1990). Göç çalışmaları, göçmenlerin, özellikle de ergenlikten önce göç ettikleri takdirde, yerli nüfusuna benzer bir yaygınlık oranı geliştirmeye eğilimli olduklarını göstermektedir (Milo ve Miller, 2014). Ekvatordan uzaklaştıkça artmış MS insidansı D vitamini seviyelerine bağlanmıştır. Çocuklukları boyunca güneş ışığı altında açık havada çok fazla zaman geçirenlerin, MS geliştirme riskinin daha düşük olduğu tespit edilmiş ve bu monozigotik ikiz çiftleri arasında da gözlenmiştir (Islam ve ark., 2007; Kampman ve ark., 2007; van der Mei ve ark., 2003). Ayrıca, takviyeler yoluyla D vitamini alımının MS gelişme riskini azalttığı düşünülmektedir (Munger ve ark., 2004). Serum D vitamini düzeylerinin MS hastalarında sağlıklı kontrollerin aksine anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür, ancak bu tüm çalışmalarda gözlenmemiştir (Barnes ve ark., 2007; Correale ve ark., 2009; Kragt ve ark., 2009; Pierrot-Deseilligny ve Souberbielle, 2017; Soilu-Hanninen ve ark., 2005). Çok sayıda çalışma, vitamin D takviyesinin Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit

(Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) patogenezinde koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (Chang ve ark., 2010; Lemire ve Archer, 1991; Pedersen ve ark., 2007). Bu koruyucu etki, D vitamini aracılı IL-10 üretimi ile kemokin aracılı monosit hareketi inhibisyonunu veya pro-inflamatuar yardımcı T-17 hücre (Th17) farklılaşmasının baskılanmasını kapsamaktadır (Chang ve ark., 2010; Pedersen ve ark., 2007). Ayrıca daha sonra, D vitamininin Foxp3⁺ düzenleyici T (Treg)'i teşvik edebilen ve bunların otoimmün tepkilerine aracılık eden tolerojenik dendritik (DH)'leri indüklediği gösterilmiştir (Adorini ve Penna, 2009).

2.1.4. Patogenez ve İmmünopatogenez

MS lezyonlarının başlıca özelliği, aksonu koruyan miyelin kılıflarının hasarlanmasıyla meydana gelen miyelin kaybıdır. Oluşan aksonal bozulma, nörolojik bozukluğun temel sebebidir. Bundan dolayı MS, demiyelinizan, inflamatuvar ve nörodejeneratif bir hastalıktır (Trapp ve Stys, 2009). MS plakları, MSS'de ventriküllerin etrafındaki beyaz cevherde, optik sinirlerde ve kanallarda, korpus kallozum, serebellar pediküller, omurilik ve beyin sapının uzun bölgeleri ve subpial bölgelerinde, aynı zamanda gri maddede de oluşabilmektedir. Bu plaklar, mononükleer inflamatuvar hücrelerin (T-lenfositler, monositler/makrofajlar, B ve plazma hücreleri) perivenüler infiltratlarından, demiyelinize olmuş aksonlardan, azalmış sayıda oligodendrositten, kesilmiş aksonlardan, gliozaya sebep olan astrosit proliferasyonundan dolayı oluşmuştur. MS lezyonları akut, kronik aktif ve kronik sessizliğe bölünebilir. Farklı MS hastaları arasındaki demiyelinizasyon ve oligodendrosit patolojisinin yapısal ve immünopatolojik şekilleri derin heterojenlik gösterirler, bu da MS'in tek bir hastalıktan ziyade nörolojik bir sendrom olduğunu düşündürmektedir (Lucchinetti ve ark., 2000). Geleneksel olarak, MS bir T hücre aracılı otoimmün hastalık olarak kabul edilmiştir. Son zamanlarda, patogenezinin, akut inflamasyonun yanı sıra, yavaş ilerleyen nörodejenerasyonla birlikte kazanılmış ve doğal bağışıklık sisteminin tüm kollarını kapsayan çok daha karmaşık olduğu ortaya çıkmıştır (Frohman ve ark., 2006; McFarland ve Martin, 2007). MS muhtemelen, periferdeki MSS antijenlerine karşı oloreaktif Th1 hücrelerinin aktivasyonu ile başlar. Aktive edilmiş immün hücreler, yüzey hücresi adhezyon molekülleri ve sitokin reseptörlerini upregüle eder ve interlökin 2 (IL-2), interferon gamma (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) yanı sıra kemokinler gibi pro-inflamatuar sitokinleri ve matriks

metalloproteinazları (MMP) salgılar. Endotelial hücrelerde karşılıklı değişimleri teşvik eden MMP'ler, aktive hücrelerin endotele yapışmasını sağlar ve kan-beyin bariyeri boyunca göçlerini kolaylaştırır. MSS, inflamasyon ve hastalık ile ilişkili başka bir T hücre soyu olan Th17 hücrelerinin kritik rolü de yakın zamanda gösterilmiştir. MSS'e girdikten sonra, otoreaktif T-hücreleri mikroglia gibi yerleşik antijen sunan hücreler (ASH) veya lokal MSS'e antijen sunan dendritik hücreler (DH) tarafından yeniden aktive edilebilir. Bu yeniden aktivasyon, iltihaplanma bölgelerine (örn. B hücreleri, miyeloid hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreleri), çeşitli sitokinlerin, kemokinlerin, MMP'ler ve diğer mediyatörlerin salgılanmasını, yerleşik mikroglia aktivasyonunu ve astrositlerin aktivasyonunu sağlar. Ayrıca miyelin proteinlerini tanıyan çok sayıda MHC-II CD8⁺ sitotoksik T-hücresi, hem inflamatuvar lezyon kenarlarında hem de perivasküler bölgelerde mevcut olup, miyelin, oligodendrosit ve akson hasarını antijen bağımlı ya da bağımsız olarak arttırmaktadır (Milo ve Miller, 2014). B-hücreleri inflamatuvar infiltratın sadece küçük bir kısmını oluşturmasına rağmen önemli sitokinleri salgılayarak, T-hücreleri ve antijen sunumunu düzenleyerek inflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynamaktadır. NK hücreler tarafından da destekleyici astrositlerde dolaylı hasar meydana gelebilir (Milo ve Miller, 2014). İmmün cevabın hatalı düzenlenmesi de MS patogenezinde rol oynamaktadır. Treg hücrelerinin birkaç alt kümesinin MS'li hastalarda işlevsiz olduğu ve yıkıcı inflamasyonla mücadelede yetersizliğe neden olduğu gösterilmiştir. Yardımcı T2 hücresi (Th2) fenotipine sahip T hücreleri de iltihaplanma bölgelerine dahil edilir ve anti-inflamatuvar sitokinler üreterek aşağı regüle edilmiş aktif Th1 efektör hücrelerine eklenir. Ayrıca onarım mekanizmalarına ve nöro-korumaya katkıda buldukları düşünülen nispeten yüksek seviyelerde nörotrofik faktörler salgırlar. Ayrıca Th1 veya Th2 hücre tepkilerini ve B-hücrelerinin farklı tepkilerini sürdürebilen fenotipik olarak polarize edilmiş makrofajların (M1 ve M2) varlığına dair kanıtlar vardır (Milo ve Miller, 2014).

2.1.5. Multipl Skleroz Sınıflandırılması

2.1.5.1. Tekrarlayan-Hafifleyen Multipl Skleroz (THMS)

MS'li hastaların yaklaşık %80'inde MS'in en yaygın formu olan tekrarlayan-hafifleyen MS (THMS) gelişir. THMS, hastalık semptomları periyodları, aylarca süren ardından azalması ile karakterize edilir. Azalma dönemi, aylarca sürebilmektedir ve ilerlemenin

görülmediği veya kısmen iyileşmenin görüldüğü periyoddur (Alastair C., 2002; Fisniku ve ark., 2008; Julia S., 2015).

2.1.5.2.İkinci İlerleyici Multipl Skleroz (İİMS)

İİMS, THMS'li hastaların çoğunda gelişir ve herhangi bir azalma periyodu olmadan ilerleyici bir nörolojik hasar meydana gelmektedir (Alastair C., 2002; Fisniku ve ark., 2008). İİMS için en sık görülen hasar akson kaybıdır (Alastair C., 2002). İİMS sınıfına geçiş yaklaşık 10-15 yılı bulmaktadır (RA., 2009).

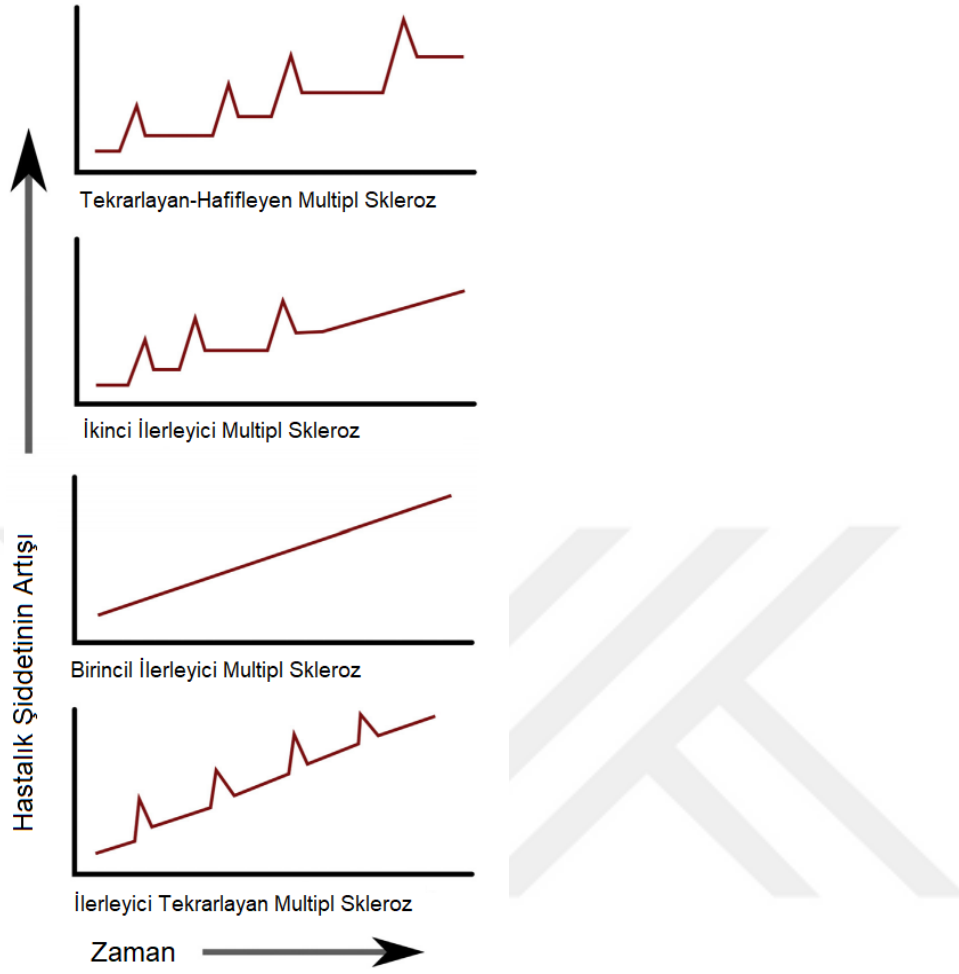
2.1.5.3.Birincil İlerleyici Multipl Skleroz (BİMS)

Birincil ilerleyici MS (BİMS), MS hastalarının yaklaşık %20'sinde görülmektedir. Bazı hastalarda, azalma periyodu olmadan, başlangıçtan itibaren kademeli olarak ilerleyen bir klinik seyir ile karakterize edilir ve erkekler ile kadınlar arasında benzer bir insidansı vardır (Fisniku ve ark., 2008; Shin, 2014).

2.1.5.4.İlerleyici Tekrarlayan Multipl Skleroz (İTMS)

Nadir görülen bir MS alt tipidir. MS hastalarının yaklaşık %5'inde görülür. İTMS, hem ilerlemeli ataklar hem de düzelme evreleri içerir (Lublin ve Reingold, 1996; Terzi ve ark., 2007).

Yukarıda açıklanan klasik dört tip hastalık seyri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Multipl sklerozda 4 klasik hastalık seyri fenotipi (Krieger ve Sumowski, 2018; Lublin ve Reingold, 1996)

2.1.6. MS tedavisi

MS'in kesin bir tedavisi olmamakla birlikte MS'in akut belirtilerini yok eden, atakları engelleyen, atakları sıklık, şiddet ve süre bakımından azaltabilen ve atak sonrası oluşabilecek komplikasyonlara karşı ortaya konulan tedaviler bulunmaktadır.

2.1.6.1. Akut Atak Tedavisi

MS hastalığı temelde ataklarla devam etmektedir. Bir hastalığı olmadan MS ile ilgili bulguların 24 saat ve daha uzun sürmesi, MS belirtilerinin giderek artması, atakların arası bir aydan fazla olması ve bulguların başka bir hastalıkla ilişkilendirilememesi durumu MS atağı olarak değerlendirilir (Cicarelli O., 2006; Polman ve ark., 2011). Atak

tedavisindeki temel amaç; atak şiddetini azaltarak, atak sonrasındaki iyileşme süresini en aza indirmektir. Yapılan çalışmalarda MS'in atak tedavisi için, antiinflamatuvar etkileri nedeniyle intravenöz (iv) olarak yüksek doz steroidler (metilprednizolon), eğer hasta steroid tedavisine yanıtızsız kalırsa plazmaferez ve iv immunglobulin diğer tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Steroid tedavisi, bozulan kan beyin bariyerini düzenler ve T hücre sayısını ve IFN- γ salınımını azaltır ve inflamasyonu durdurur (Aysun Ü, 2009; Hauser SL, 2009; İliçin G, 2012).

2.1.6.2.İmmün Modülatör ve İmmüsupresif Tedaviler

2.1.6.2.1.İnterferon- β (IFN- β -1b ve IFN- β -1a; Avonex, Rebif, Betaseron)

İnterferonlar (IFN); alfa, beta ve gama olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Bunlar, MS hastalığının oluşmasına neden olan IFN- γ seviyesini azaltmaktadır. İnterferon- β , birkaç faz III çalışmasında iyi bir etkinlik sergileyen THMS tedavisinde kullanılan birinci basamak ajanlardan biri olmuştur (Durelli ve ark., 2002; Paty ve ark., 2001). IFN- β ile tedavi, klinik tekrar oranının düşmesine ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile belirlenen yeni hastalık lezyonlarının gelişmesine neden olmuştur. Bilinen etkinliğine rağmen, IFN- β 'nin faydalı etkilerini ortaya çıkardığı tam mekanizma hala tartışmalıdır. Genel olarak pro-inflamatuvar sitokin üretiminin, örneğin Th1 yanıtında, daha anti-inflamatuvar/düzenleyici bir sitokin ortamına doğru kaydırıldığı düşünülmektedir (Ozenci ve ark., 2000a; Ozenci ve ark., 2000b; Zang ve ark., 2003). MS hastalarının sadece üçte ikisi IFN- β tedavisine cevap vermektedir (Arnason, 1999; Chiu ve ark., 2009).

2.1.6.2.2.Glatiramer asetat (Copaxone)

Glatiramer asetat tirozin, glutamat, alanin ve lizinden oluşan sentetik bir amino asit polimeridir ve THMS'nin tedavisinde kullanılır. Klinik relaps oranında azalma ve yeni lezyonların gelişiminde hafif bir azalma ile sonuçlanır (Comi ve ark., 2001; Johnson ve ark., 2001). T hücre tepkisini, iltihaplanma karşıtı bir Th1 tepkisinden, anti-inflamatuvar/düzenleyici bir Th2 tepkisine doğru kaydırıldığı düşünülmektedir (Duda ve ark., 2000; Miller ve ark., 1998). EAE'de, glatiramer asetatın Th17 ile ilişkili pro-inflamatuvar sitokinlerin; IL-6, IL-23, TNF- α ve IL-17 seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir

ve bunun MS hastalarında gözlenen hastalığı azaltıcı etki mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülebilir (Begum-Haque ve ark., 2008).

2.1.6.2.3.Mitoxantrone (Novantrone)

Mitoksantron, immünsupresif bir sitotoksik ajandır. DNA ile etkileşime girer ve DNA'nın kırılmasına neden olur ve ayrıca DNA tamirini inhibe eder, böylece makrofajların, B ve T hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder ve inflamatuvar tepkiyi baskılar (Fidler ve ark., 1986a; Fidler ve ark., 1986b; Rosenberg ve ark., 1986). IFN- γ , TNF- α ve IL-2'nin salgılanmasını azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur. Mitoxantrone, THMS'nin tedavisinde etkilidir ve klinik tekrar oranını azaltır ve sakatlık ilerlemesini de geciktirir (Fidler ve ark., 1986a).

2.1.6.2.4.Natalizumab (Tysabri)

Natalizumab, THMS'nin tedavisi için geliştirilen ilk monoklonal antikordur. Natalizumab, başarılı denemelerin gerçekleştirildiği $\alpha 4\beta 1$ integrin'in $\alpha 4$ zincirine karşı monoklonal bir antikordur (Engelhardt ve Kappos, 2008; Miller ve ark., 2003; Tubridy ve ark., 1999). $\alpha 4\beta 1$ tüm lökositlerin yüzeyinde eksprese edilir ve monoklonal antikor lökositlerin MSS'deki vasküler hücre adhezyon molekülü-1'in (VCAM-1) ligandına bağlanmasını önler, böylece kan beyin bariyerinde lenfositlerin girişini önlemektedir (Johnson, 2007; Rice ve ark., 2005). Hem Natalizumab hem de IFN- β -1 α alan hastalarda, ilerleyici multi-fokal ensefalopati (PML) gelişmiş olup, iki hastadan sonra Natalizumab kısa bir süre sonra piyasadan çekilmiş ancak sonradan yeniden kullanıma başlanmıştır.

2.1.6.2.5.Rituximab

Rituximab, B hücreleri üzerine etkili olan monoklonal antikordur. B hücreleri yüzey markırı CD 20 molekülüne karşı reaksiyon göstermektedir. Dolaşımdaki B hücre miktarını azaltmaktadır. Romatolojik ve hematolojik hastalıklarda kullanılan Rituximab, günümüzde MS ve noromiyelitis optikada da kullanılmaya başlanmıştır (Cree ve ark., 2005). Bir çalışmada, THMS hastalarında, hem gadolinyum tutan lezyonlarda, hem de klinik relapslarda azalma gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise, BİMS'te, yalnızca genç

ve inflamasyonu yüksek hasta grubunda etkinlik görülmüştür (Palanichamy ve ark., 2014).

2.1.6.2.6.Fingolimod (FTY720)

FTY720 (fingolimod) *in vivo* sfingozin kinaz ile fosforile olmakta ve S1P reseptörlerine (S1P1, S1P3, S1P4 ve S1P5) yüksek afinite ile bağlanmaktadır. FTY720, hücre canlılığı, hücre iskeletinin düzenlenmesi ve hücre hareketi gibi farklı fonksiyonları düzenlemektedir (Chiba ve ark., 1998; Kappos ve ark., 2010). Fingolimod, S1P reseptörüne bağlanıp hücrelerin lenfoid organlardan çıkıp dokulara infiltre olmasını da engellemektedir. Bu şekilde total lenfosit sayısını azaltmadan işlevsel immün modülasyon yapmaktadır (Kappos ve ark., 2010; Khoshnam ve Freedman, 2012). Fingolimod, organ naklinden sonra organ reddini baskılamakta ve MS'in de yer aldığı bazı otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır. Fingolimod kullanımı sonucu bradikardi, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, lenfopeni ve enfeksiyonlara yatkınlık gibi bazı yan etkiler ortaya çıkmaktadır (Cohen ve ark., 2010; Groves ve ark., 2013; Kim ve ark., 2003).

2.1.6.3.Semptomatik Tedaviler

MS'in seyrinde çok farklı belirti ve bulgular gelişebilmektedir. MS için kullanılan semptomatik tedaviler, hastalığın seyrini yavaşlatır ve özürlülük düzeyini azaltırlar, fakat MS'i ortadan kaldırmamaktadırlar. MS hastalığı süresince, bazı semptomlar da görülmektedir. Hastalık başlangıcında ataklar sırasında gelişen bu sorunlar, hastalığın ilerlemesi ile sekel hale gelir ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkiler. MS'in semptomatik tedavisinde nöroloji, üroloji, psikoloji, psikiyatri, radyoloji ve fizyoterapi gibi farklı disiplinlerin ortaklaşa bir tedavi uygulamaları gerekmektedir (Lassmann, 2008; Nancy J. H., April 2006 ; Z., 2007).

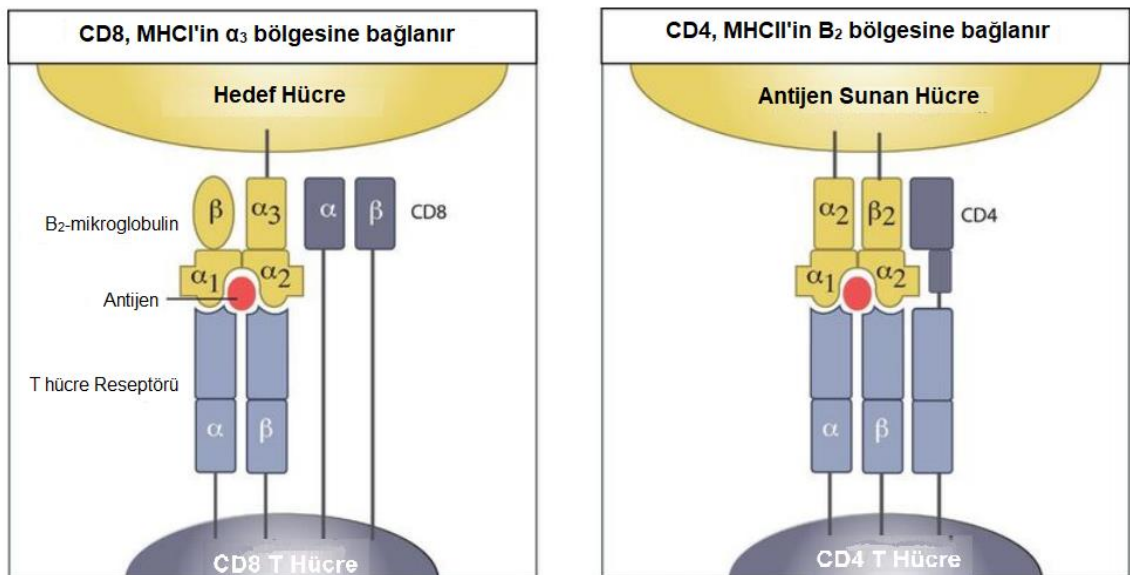
2.2.İmmün Sistem

Doğal bağışıklık sistemi, makrofajlar, DH'ler, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller ve doğal öldürücü (NK) hücreleri içeren istilacı patojenlere karşı ilk savunma hattıdır (Janeway ve Medzhitov, 2002). Adaptif bağışıklık sistemi, sırasıyla B ve T hücrelerini

içeren humoral ve hücre aracılı bağışıklık olarak ikiye ayrılır. B hücreleri istilacı patojenler üzerindeki epitoplara bağlanan ve bunları makrofajlar gibi immün sistemin diğer bileşenleri tarafından yok edilmesi için tanımlayan antikolar salgırlar. T hücrelerinin çoğu, spesifik bir antijenin tanınmasından sonra klonal genişleme ile çoğalan, sadece bir T hücre reseptörünü (TCR) eksprese ederler (Delves ve Roitt, 2000a, b).

2.2.1.T hücreleri

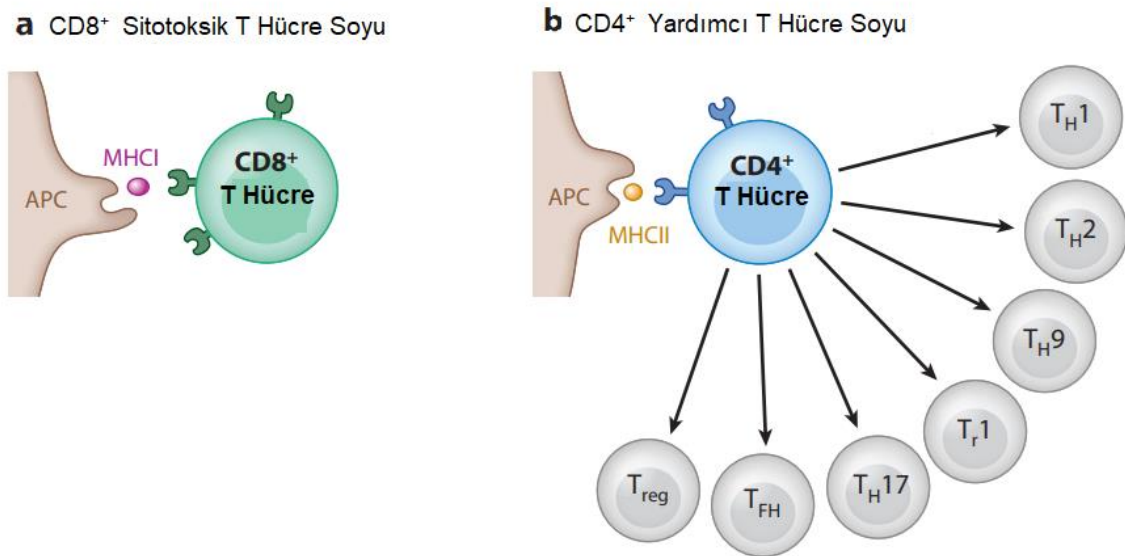
T hücreleri, ko-reseptör moleküllerinin CD4 veya CD8'in varlığı ile her yerde karakterize edilmekle birlikte, insan hücresel bağışıklığını düzenlemektedir. TCR'lerin çoğu, hem sabit hem de değişken alanlar içeren iki alt ünite zincirinden (α ve β) oluşan heterodimer yapıdadır. Potansiyel TCR/antijen etkileşimi çok sayıda benzersiz TCR'ye ihtiyaç duyulduğundan, bağışıklık sistemi çeşitliliği sağlamak için eşsiz bir yol kullanmaktadır. TCR çeşitliliği, timusta T hücre gelişiminin erken aşamalarında meydana gelmektedir. Hücre bölünmesi sırasında, TCR α ve TCR β genlerinde sırasıyla V (değişken) ve J (bağlantı) bölümleri ve V, D (çeşitlilik) ve J bölümleri arasında kapsamlı gen rekombinasyonu oluşmaktadır. Bu işlem V (D) J rekombinasyonu olarak adlandırılmaktadır. V-D ve D-J bağlantılarını kapsayan TCR β bölgesi, tamamlayıcılık belirleme bölgesi 3 (CDR3) olarak bilinir ve her TCR β değişkenine özgüdür (Şekil 2.3). Bu işlemin ardından MHC molekülleri kendi antijenlerini tanıyanlar ile yeterli afiniteye sahip olmayan T hücrelerini elimine etmektedir (2017, 2017).



Şekil 2.3. T hücrelerinin antijen sunan hücrelerle etkileşimi. CD8⁺T hücreleri, antijen sunan hücrelerde T hücresi reseptörleri ve peptid/MHC sınıf I ile etkileşime girer. CD4⁺T hücreleri, peptid/MHC sınıf II bağlanması yoluyla etkileşime girer (P., 2009.).

2.2.2.Adaptif İmmünite ve CD4⁺ T Hücreleri

Omurgalıların evrimsel ortaya çıkışına, adaptif bir bağışıklık sisteminin geliştirilmesi de dahil olmak üzere, büyük morfolojik ve fonksiyonel yenilikler eşlik etmiştir. Omurgalılarda adaptif immünite, lenfositler üzerinde somatik olarak çeşitlenen antijen reseptörlerinin klonal ekspresyonuna dayanmaktadır (Boehm ve Swann, 2014). $\alpha\beta$ TCR'leri eksprese eden T hücreleri iki genel kategoriye ayrılır: 1. Ko-reseptör CD8'i eksprese eden ve MHC sınıf I bağlamında antijenik peptidleri tanıyan CD8⁺ sitotoksik T hücreleri. 2. CD4 ko-reseptörünü eksprese eden, sadece MHC sınıf II tarafından sunulduğunda antijenleri tanıyan yardımcı T hücreleri (Şekil 2.4) (Boehm ve Swann, 2014).

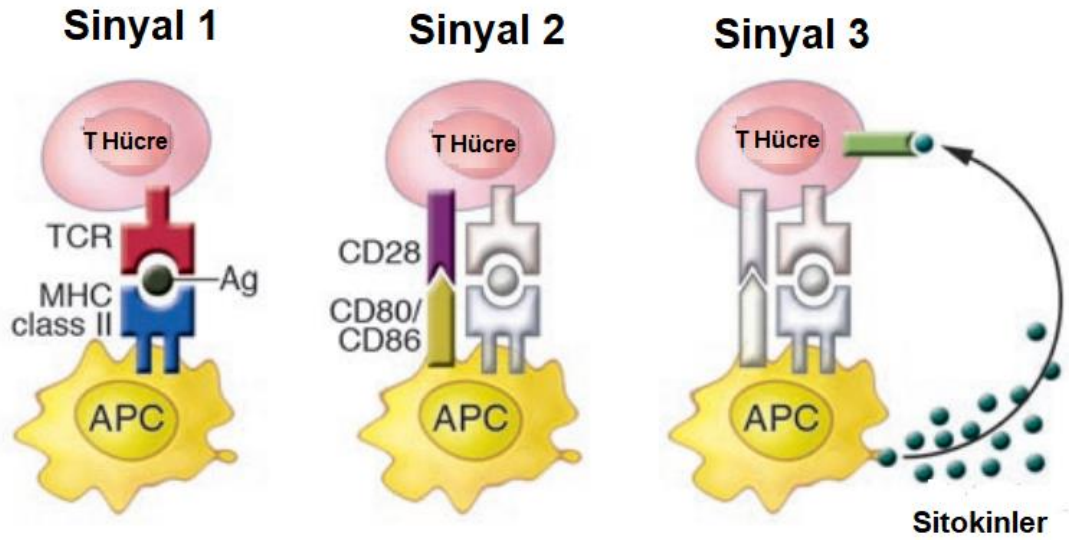


Şekil 2.4. Memelilerde T hücre soyları (Lineages). $\alpha\beta$ TCR eksprese eden T hücreleri iki genel kategoriye ayrılır: a) Koreseptör CD8'i eksprese eden ve MHC I antijenik peptitleri tanıyan CD8⁺ sitotoksik T hücreleri b) CD4 koreseptörünü eksprese eden ve sadece MHC II tarafından sunulduğunda antijenleri tanıyan yardımcı T hücreleri. CD4⁺ T hücre soyları, her biri efektör sitokinlerin ve interlökinlerin benzersiz bir kombinasyonu ile indüklenen ve spesifik transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi ile desteklenen bazı alt soylara polarize olmaktadır (Boehm ve Swann, 2014).

2.2.2.1.Naif T hücre Aktivasyonu

Naif T hücre aktivasyonu, lenf düğümleri ve dalak gibi ikincil lenfoid organlarda gerçekleşmektedir. Burada naif T hücreleri, periferde yutulmuş ve işlenmiş patojenleri içeren DH'ler ile etkileşime girer ve MHC molekülleri ile yüzeylerinde ortaya çıkan antijenleri sunmaktadır. CD8⁺ ve CD4⁺ T hücreleri, sırasıyla MHC sınıf I ve sınıf II moleküllerdeki antijenleri tanımaktadır (Şekil 2.4). Aktivasyon, proliferasyon ve farklılaşma işlemlerinin gerçekleşmesi için, naif bir T hücresi üç sinyal almalıdır; antijen tanıma, birlikte stimülasyon ve sitokin modülasyonu (Şekil 2.5). Üç sinyal tipinin doğası temel olarak mevcut enfeksiyonun tipine bağlıdır. Tüm sinyaller sadece aktivasyon seviyesini belirlemek için değil, aynı zamanda seçilen farklılaşma yolunu da belirlemek için entegre edilmiştir. Efektör hücre popülasyonunun patojeni ortadan kaldırmak için en uygun durumda olmasını sağlar. Priming işleminden sonra, aktive olmuş efektör T hücreleri perifere taşınır ve patojeni doğrudan öldürdükleri veya bağışıklık tepkisinin diğer kollarını güçlendirmek için efektör sitokinleri kullandıkları enfeksiyon bölgesine taşınırlar (Chen ve Flies, 2013; Korn ve ark., 2009; Murphy ve Reiner, 2002; Pennock ve ark., 2013; Weaver ve ark., 2007). Sinyal 1, benzer peptid-MHC komplekslerinin TCR tarafından spesifik olarak tanınmasını ifade etmektedir. Yanıtta özgüllük sağlamanın yanı sıra, TCR sinyal gücü aynı zamanda yanıtın büyüklüğünün ve seçilen farklılaşma yolunun önemli bir belirleyicisidir (DuPage ve Bluestone, 2016; Tripathi ve Lahesmaa, 2014). Sinyal 2, T hücresi ortak uyarıcı (ko-stimülatör) reseptörlerinin DH üzerindeki ortak uyarıcı (ko-stimülatör) ligandlara bağlanmasından oluşmaktadır. Aktivasyon işleminde CD80 ve/veya CD86 ile CD28 ligasyonu esastır (Beyersdorf ve ark., 2015; Howland ve ark., 2000; Pennock ve ark., 2013; Shahinian ve ark., 1993). Bununla birlikte birçok başka uyarıcı reseptörün ligasyonu ayrıca T hücre sinyalleşmesini destekleyebilir, T hücre aktivasyonunu teşvik edebilir ve farklılaşma yolu tercihlerini içerebilir. Bunlar, CD2, CD27 ve indüklenebilir T hücresi ko-stimülatörünü (ICOS) içerir (Chen ve Flies, 2013; Taraban ve ark., 2013). Bunun tersine, bu ortak tepkileri düzenlemek için negatif eş uyarımı mevcuttur. Sitotoksik T-lenfositlere bağlı protein 4 (CTLA-4), programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) veya lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) gibi ko-inhibitör reseptörleri aktivasyon sürecini azaltmaya veya önlemeye çalışır. Bir T hücresinin aktive edilip edilmeyeceği ve zaman içinde bu dengenin nasıl değiştiği ve aktivasyon olayının uzunluğunu ve kalitesini nasıl etkilediği bu pozitif ko-stimülatör ve negatif ko-inhibitör

sinyallerin toplamı ile belirlenir (Chen ve Flies, 2013). Sinyal 3, sitokin ortamı tarafından sağlanır. DH'lerden türetilmiş sitokinler sadece T hücre sağ kalımını ve çoğalmasını teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda farklılaşma sağlamada da aracıdır (Curtsinger ve Mescher, 2010).



Şekil 2.5. T hücre aktivasyonunun üç sinyal modeli (Gutcher ve Becher, 2007)

Yeterli aktivasyon sinyalleri almış olan T hücreleri, geniş bir şekilde çoğalır, öyle ki tek bir klon on binlerce heterojen T hücresi üretebilir (Park ve Kupper, 2015; Tubo ve ark., 2013). Aynı zamanda, T hücreleri fenotiplerinde aktif durumları yansıtan karakteristik değişikliklere uğrarlar. Bu gibi birçok aktivasyon markırı tarif edilmiştir ve en yaygın kullanılanlar arasında CD69, CD25, CD38 ve insan lökosit antijen-antijen D ile ilişkili (HLA-DR) bulunmaktadır (Caruso ve ark., 1997; Reddy ve ark., 2004; Sandoval-Montes ve Santos-Argumedo, 2005).

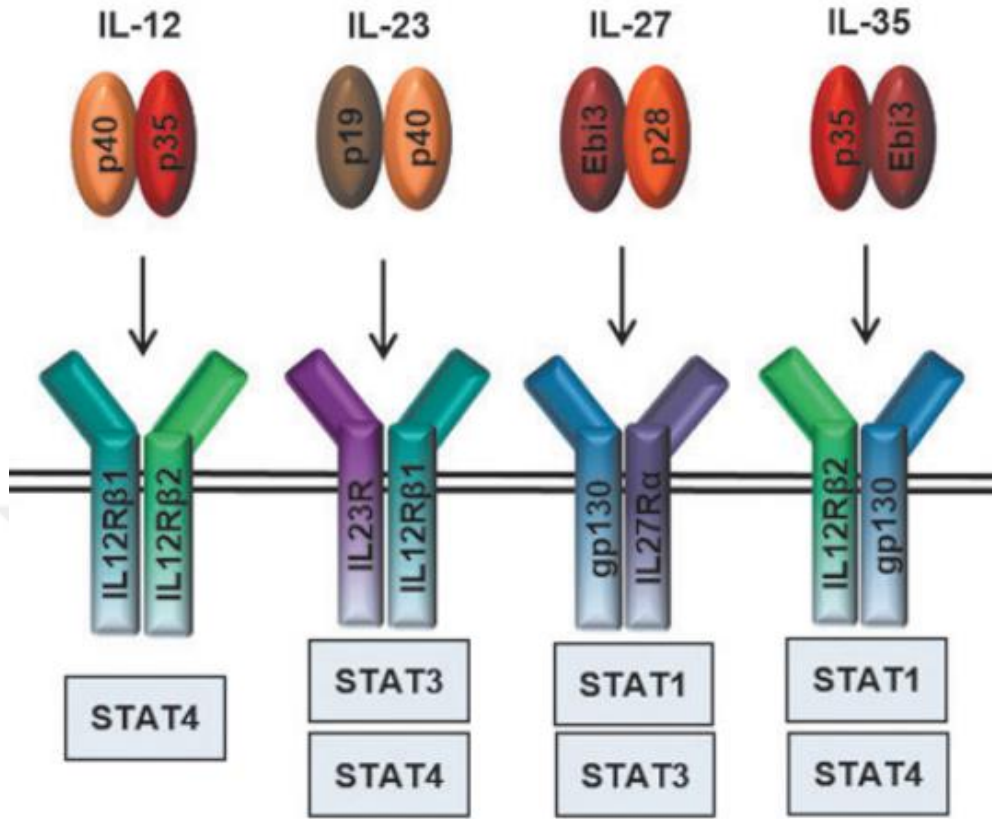
2.2.2.2.CD4⁺ T hücrelerinde Sitokin sinyalizasyonu

Reseptör aracılı sitokin sinyalizasyonunda, gen yukarı regülasyonuna (upregülasyon) veya aşağı regülasyonuna (down regülasyon) yol açan bir dizi aktivasyon olaylarını başlatır. Bu işlem, hücre dışı sitokin sinyalinin, gen transkripsiyonu için çekirdeğe iletilmesine izin verir. Sitokin sinyalizasyonu, hücre içi JAK-STAT sinyal yolunun aktivasyonunu başlatır. JAK'lar, ligandın reseptör yüzeyine bağlanmasından sonra sitokin

reseptörünü fosforile edebilen tirozin kinazlardır. Bu, belirli STAT'ların aktivasyonuna yol açar. STAT'ların aktivasyonu, Th hücre türüne özgü ana regülatör transkripsiyon faktörlerinin T-bet (Th1), GATA3 (Th2), ROR γ t (Th17), Foxp3 (Treg) aşağı doğru ekspresyonunu başlatır (Hebenstreit ve ark., 2005; Zhu ve Paul, 2010). JAK-STAT sinyalizasyonundan sonra üretilen sitokin sinyal durdurucusu (SOCS) protein ailesi (SOCS1-7), JAK-STAT sinyal yolunu inhibe eder. Farklı SOCS proteinleri, STAT sinyalini inhibe etmek için sitokin reseptörünü veya JAK'nın kendisini bağlayabilir. JAK sinyalizasyonu, hem pro-inflamatuar genlerin hem de SOCS proteinlerin transkripsiyonunu indükler ve sitokin sinyalizasyonun bir negatif geri besleme regülasyon seviyesini göstermektedir (Krebs ve Hilton, 2001).

2.2.2.2.1.IL-12 Sitokin Ailesi

Th1 farklılaşmasını destekleyen IL-12, IL-23, IL-27 ve IL-35'i içeren IL-12 sitokin ailesinin bir üyesidir (Hsieh ve ark., 1993). Dört sitokin, bir zinciri p19, p28 veya p35 ve diğer bir zinciri p40 veya Ebi3'den oluşan heterodimer yapıdadır. IL-12, p40 ve p35 alt ünitelerinden oluşur. P40 zinciri, IL-23'ü oluşturmak için p19 ile heterodimerize olmaktadır (Oppmann ve ark., 2000). IL-27, EBV bulaşmış B hücrelerinde tespit edilen zincir, p28 ve zincir Ebi3'ten oluşur (Devergne ve ark., 1996; Pflanz ve ark., 2002). Ailenin en yeni üyesi olan IL-35, IL-12 zinciri p35 ve Ebi3 zincirinden oluşur (Collison ve ark., 2007a). IL-12, IL-23 ve IL-27, temel olarak ASH aktivasyonundan sonra ASH'ler tarafından üretilir (Hibbert ve ark., 2003; Ma ve ark., 1996; Pflanz ve ark., 2002). Tartışmalı olmasına rağmen, Foxp3⁺ Treg, Bregs ve CD8⁺ Treg tarafından biyoaktif formda üretildiği ileri sürülmektedir (Collison ve ark., 2007a; Sawant ve ark., 2015; Shen ve ark., 2014). Bu sitokinler için reseptörler, çeşitli farklı reseptör zincirlerinden oluşur: IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R ve gp130. IL-12 için reseptör, bir IL-12R β 1 ve IL-12R β 2 eşleşmesidir. IL-23 reseptörü, IL-23 ile IL-12R β 1'i paylaşır (Parham ve ark., 2002). IL-27, gp130 ve WSX-1'den (IL-27R) sinyal gönderir ve IL-35 için ise gp130 ve IL-12R β 2 ile heterodimer yapar (Şekil 2.6) (Collison ve ark., 2012; Pflanz ve ark., 2004).



Şekil 2.6. IL-12 sitokin ailesinin dört mevcut üyesi ve aşağı doğru sinyal yolları: IL-12 (p35 / p40) ile IL12Rβ1 ve IL-12Rβ2; IL-23 (p19 / p40) ile IL-23R ve IL-12Rβ1; IL-27 (p28 / Ebi3) ile gp130 ve WSX-1; IL-35 (p35 / Ebi3) ile IL-12Rβ2 ve gp130 (Sawant ve ark., 2015).

2.2.2.2.IL-6 Sinyalizasyonu

IL-6, IL-27'nin de bir üyesi olup gp130 sitokin ailesine aittir. Tüm üyeler dört sarmal bir protein yapısına sahiptir ve sinyal ileten reseptör glikoproteininin gp130'un en az bir alt birimini içeren bir reseptör kompleksi boyunca sinyal verir (Pflanz ve ark., 2004; Taga, 1997; Taga ve Kishimoto, 1997). IL-6'nın iki farklı yoldan sinyal gönderebildiği tespit edilmiştir: klasik yoldan sinyalizasyon, hedef hücrenin yüzeyinde zara bağlı IL-6R yoluyla veya doğal olarak oluşan çözünebilir (soluble) IL-6R yoluyla trans sinyalizasyon. Klasik sinyallerde, IL-6, IL-6R'ye bağlı membrana bağlanır; bu bağlanma, IL-6R'nin dimerizasyonuna ve gp130'un aktivasyonuna yol açar (Rose-John, 2001; Taga ve Kishimoto, 1997). Gp130, tüm hücrelerde eksprese edilirken, IL-6R, nötrofiller, makrofajlar ve bazı lenfositler hariç, yaygın olarak eksprese edilmez, bu nedenle klasik

sinyalizasyon, IL-6R'yi eksprese eden bu hücre tipleriyle sınırlıdır. Trans-sinyalizasyon sırasında IL-6, doğal olarak oluşan çözünebilir IL-6R'ye bağlanır. Bu IL-6/çözünür IL-6R kompleksi daha sonra gp130'u aktive ederek aşağı sinyal iletimi sağlar (Peters ve ark., 1998; Rose-John, 2001). Bu şekilde, IL-6R'yi eksprese etmeyen hücreler, çözüdür IL-6R'nin etkisiyle IL-6 sinyaline yanıt verebilir ve böylece IL-6'nın üzerinde etkili olabileceği hücre tiplerinin spektrumu da artmaktadır (P., 2010).

2.2.2.2.3.IL-17 Sitokin Ailesi

IL-17 sitokin ailesi, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ve IL-17F gibi çeşitli homologlardan oluşur (Gaffen, 2009). IL-17A ve IL-17F, inflamasyon ve oto-immünette belirgin rolleri olan ailenin en iyi karakterize edilmiş üyeleridir (Awasthi ve Kuchroo, 2009; Yang ve ark., 2008b). IL-17F tarafından ortaya çıkan sinyaller, IL-17A'dan gelen sinyallere kıyasla aşağı doğru gen aktivasyonu açısından çok daha zayıftır. Bu iki molekül ayrıca, orta seviyede sinyal veren IL-17A-IL-17F heterodimerlerini oluşturmak için dimerleşebilir (McAllister ve ark., 2005; Wright ve ark., 2007). IL-17 familyasının reseptörleri, IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC ve IL-17RD ayrıca ligandları paylaşır ve her ligand için farklı reseptörler oluşturmak üzere dimerleşebilir. IL-17A-IL-17F arasındaki heterodimerin, IL-17RA/IL-17RC kompleksinden sinyal aldığı bulunmuştur (Wright ve ark., 2008). IL17E, IL-17RA ile eşleşen IL17RB'yi bağlar (Claudio ve ark., 2009). Bu reseptör alt birimlerinin ikisinde de eksik olan farelerin IL-17E'ye cevap veremediği gösterilmiştir (Rickel ve ark., 2008). IL-17B, cilt bağışıklık ve patolojisinde rol oynayan ve henüz tanımlanmayan tüm IL-17 aile üyelerinin belirsizliğini korumaktadır. IL-25 fonksiyonuna tarif edilen antagonizm, özellikle IL-25 ekspresyonu ile cilt atopisi arasındaki ilişki göz önüne alındığında ilginçtir. Bu nedenle IL-17B'nin cilt bağışıklık ve patolojisindeki potansiyel rolü araştırılmalıdır (Monin ve Gaffen, 2018).

2.2.3.Yardımcı T (Th) Alt tipleri (T Helper Supsets)

CD4⁺ Th hücreleri bağışıklık sisteminin işlevinde merkezi bir rol oynar. İlk olarak antikoları üretmek için B hücrelerini desteklemekle kalmaz, aynı zamanda CD8⁺ T hücrelerini ve makrofaj fonksiyonlarını da çok çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı korurlar (Zhu ve ark., 2010). İnsan CD4⁺ Th hücreleri, spesifik transkripsiyon faktörleri,

sitokinler ve hedef reseptörlerin iyi tanımlanmış profillerinin ekspresyonu tarafından desteklenen immünolojik işlevlerine dayanarak soylara bölünmektedir. Bu soylar, patojenlerden korunan efektör hücreleri ve oto-immüniteye karşı olduğu gibi ve bazı durumlarda da ekzojen antijenler gibi konakçı için tehlikeli hale geldiklerinde efektör tepkilerinden koruyan Treg'leri, yanıt olarak içermektedir (Annunziato ve ark., 2010).

2.2.3.1.Th2 hücreleri

Th2 hücreleri, IL-4, IL-5 ve IL-13 temel sitokinlerini ve TNF- α sitokinini üretmektedir (Minty ve ark., 1993; Mosmann ve ark., 1991). Th2 hücreleri, hücre dışı patojenlerin, örneğin helmint solucanı enfeksiyonlarının temizliği için gereklidir ve alerjide zararlı bir role sahiptir. Bunun nedeni, Th2 aktivasyonu ile üretilen sitokinlerin alerjik reaksiyonlar patolojisi katkısında bulunan eosinofil, basofil ve mast hücrelerinin aktive edilmesidir. Ayrıca diğer bir neden de aktivasyondan sonra CD4⁺ Th2 hücrelerine bağımlı B hücrelerinin ürettiği IgE antikor tepkisidir. B hücreleri tarafından, Th2 hücrelerine antijen sunulduktan sonra (IgG1 ve IgE) ve Th2 aktivasyonundan sonra üretilen antikorlar, hücre dışı patojenleri öldürmek ve alerjik reaksiyonlar sırasında ortadan kaldırmak için humoral tepki sağlar (Lindell ve ark., 2008; Maizels ve ark., 2004). Th1 ile ilişkili sitokinler, IFN- γ ve IL-12, naif CD4⁺ T hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasını önler. Başarılı Th2 polarizasyonu elde etmek için, naif CD4⁺ T hücreleri, IL-4 varlığında aktive olur ve bu, STAT6'nın fosforilasyonuna yol açar. Bu da Th2 hücrelerinin anahtar transkripsiyon faktörü olan GATA3'ün indüksiyonuna ve ardından Th2-sitokinlerin IL-4, IL-5 ve IL-13'ün aktivasyonuna yol açar (Zhang ve ark., 1997; Zheng ve Flavell, 1997). GATA3, T hücresi gelişimi için de önemlidir ve naif T hücreleri, onu düşük seviyede eksprese eder. Aktivasyon ve farklılaşma üzerine Th2 hücreleri, GATA3 artışını düzenlerken, Th1 soyuna doğru farklılaşan hücrelerin ekspresyonunu azaltıcı yönde düzenler (Zhang ve ark., 1997). STAT6, Th2 farklılaşması ve IL-4 sinyali için önemlidir (Kaplan ve ark., 1996a). STAT5'in Th2 farklılaşması için de gerekli olduğu bulunmuştur (Zhu ve ark., 2003). Th2 hücrelerinin otoimmün hastalığın indüklenmesinde gerekli olduğu düşünülmemektedir. Miyeline duyarlı Th2 hücreleri, lenfopenik konak farelere aktarılmadıkça, adaptif transferden sonra EAE'yi uyaramamaktadır (Baron ve ark., 1993; Jager ve ark., 2009b; Lafaille ve ark., 1997).

2.2.3.2.Th9 hücreleri

Th altkümesine ait Th9'a ait bilgiler yakın zamanda önerilmiştir. Th9 hücreleri, IL-4 ve TGF- β varlığında indüklenirler. IL-4, Foxp3'ün TGF β -odaklı ekspresyonunu bastırır ve bu IL-9 ve IL-10 üreten bir Foxp3- T efektör hücre ile sonuçlanır (Dardalhon ve ark., 2008; Veldhoen ve ark., 2008). Th9 hücreleri, diğer soylara özgü transkripsiyon faktörlerini, örneğin T-bet, gata3, roryt ve Foxp3'ü eksprese etmezler. Th9 soyuna özgü bir transkripsiyon faktörü henüz tanımlanmamıştır. Th9 hücreleri çok düşük seviyede diğer Th2 sitokinleri üretmekte ve proinflamatuvar rolü olan yüksek miktarda IL-9 üretmektedir (Li ve Rostami, 2010). Th9 hücrelerinin, IL-10 üretimine rağmen, düzenleyici bir fenotip yerine bir T efektör fenotipine sahip oldukları gösterilmiştir. Th9 hücreleri, hem EAE modelinde hem de bir kolit modelinde hastalığın kötü gidişine neden olmuştur (Dardalhon ve ark., 2008; Jager ve ark., 2009a).

2.2.3.3.Th22 hücreleri

IL-22'nin üretimi, farklılaşmış Th17 hücrelerinde tanımlanmıştır (Kreymborg ve ark., 2007). Fakat Th22 hücrelerinin IL-22'yi üretebilen farklı bir altküme olduğu, ancak IL-17 ve IFN- γ üretmedikleri öne sürülmüştür (Duhon ve ark., 2009; Trifari ve ark., 2009). Ayrıca, Th22'nin anahtar transkripsiyon faktörü olarak aril hidrokarbon reseptörü (AHR) bulunmuştur (Baba ve ark., 2012). Th22'nin farklılaşması IL-6 ve TNF- α varlığında gerçekleşir (Duhon ve ark., 2009; Trifari ve ark., 2009). İnsan Th22 hücrelerinin, cilt homeostazı ve inflamatuvar patolojiye neden olan cildin alıcı reseptörleri CCR4 ve CCR10'u da eksprese ettiği gösterilmiştir (Duhon ve ark., 2009; Eyerich ve ark., 2009).

2.2.3.4.Tr1 hücreleri

Tr1 hücreleri, IL-10 ve IFN- γ üreten başka bir CD4⁺ düzenleyici T hücresi alt kümesidir, ancak Tr1 hücreleri, Foxp3⁺ Treg'lere kıyasla Foxp3⁻ hücrelerdir (Vieira ve ark., 2004). Tr1 hücreleri, IL-10 ve IL-27 varlığında indüklenir ve otoimmün hastalıkların düzenlenmesinde, özellikle Th17 yanıtlarının düzenlenmesinde, önemli bir rol oynamaktadır (Awasthi ve ark., 2007; Batten ve ark., 2006; Fitzgerald ve ark., 2008). MS

hastalarında Tr1(CD4⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻) hücreleri fonksiyonunun bozulduğu bulunmuştur (Clerici ve ark., 2001).

2.2.3.5.iTr35 Hücreleri

İndüklenmiş IL-35 T düzenleyici hücre (iTr35) bir başka Treg alt kümesi olarak tanımlanmıştır. iTr35 hücreleri tam olarak anlaşılmayan bir bastırma mekanizmasına sahiptir (Olson ve ark., 2013). IL-35'in Foxp3⁺ Treg supresyonunda ve iTr35'in indüksiyonunda kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir (Collison ve ark., 2010; Collison ve ark., 2007b). IL-35 ile yapılan tedavinin, iTr35 ile birlikte indüksiyonuyla EAE'nin iyileşmesine yol açtığı gösterilmiştir (Collison ve ark., 2010). iTr35'in ayrıca, kolajen kaynaklı artrit ve IBD gibi diğer otoimmün modelleri de iyileştirdiği gösterilmiştir (Choi ve ark., 2015). IL-35, insan Foxp3 Treg'leri tarafından üretilmez, fakat insan T hücreleri üzerinde yapılan ex vivo deneyler, iTr35'i insanlarda benzer bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Bardel ve ark., 2008; Choi ve ark., 2015).

2.2.3.6.Th1 Hücreleri

Th1 hücreleri, lenfotoksin ve TNF- α 'nın yanı sıra, markır sitokinleri olarak IFN- γ 'yı da üretmektedir. Bu pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi, inflamasyon bölgesinde makrofajların aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu gibi Th1 hücreleri, hücre içi patojenlere karşı konakçı savunması için önemlidir, ancak istenmeyen otoimmün inflamasyona neden olabilmektedir. Makrofajların IFN- γ ile aktivasyonu, hücre içi mikroorganizmalara karşı savunma için önemlidir. IL-12 ilavesi ve IL-4'ün nötralizasyonu ile *in vitro* Th1 farklılaşmasının desteklendiği bulunmuştur (Hsieh ve ark., 1993). Transkripsiyon faktörü T-bet'in, Th1 hücrelerinin anahtar transkripsiyon faktörü olduğu keşfedilmiştir (Szabo ve ark., 2000). IFN- γ geninin stabil aktivasyonu ve IFN- γ üretiminin indüklenmesi için, 189-amino asit T-Box DNA-bağlama alanına sahip bir 530-amino asit proteini olan T-bet gereklidir. T-bet'in ektopik ekspresyonu, IFN- γ 'nın indüklenmesine neden olur ve Th2-polarize hücrelerde eksprese edilmesi durumunda ise fenotiplerinin Th1-IFN- γ üretimine doğru değiştiği gözlenmiştir (Szabo ve ark., 2000). Her ne kadar T-bet, IFN- γ 'nın kendisinin üretimini indüklese de, aynı zamanda T-bet ekspresyonunun indüksiyonunu da teşvik ettiği ve böylece IFN- γ 'nın kendi üretimini destekleyen transkripsiyon faktörünü

kontrol edebildiği önemli bir otokrin döngüyü işaret etmektedir (Lighvani ve ark., 2001). IFN- γ 'nın STAT1'i aktive ettiği düşünülmektedir ve bunun da T-bet ekspresyonunu indüklediği görülmektedir (Afkarian ve ark., 2002). T-bet'in, IFN- γ 'yı düzenlediği mekanizma tam olarak açıklanmamıştır. Bununla birlikte, IFN- γ geni ve IL-12R β 2 ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla olduğu, bu nedenle IL-12'ye yanıtı arttırarak IFN- γ üretimini arttırdığı düşünülmektedir (Mullen ve ark., 2001; Mullen ve ark., 2002). Bu, yakın zamanda önerilen iki aşamalı T-bet düzenlemesiyle ilişkilidir (Schulz ve ark., 2009). Matematiksel modelleme yoluyla, IFN- γ 'nın, T hücresi aktivasyonu sırasında ilk T-bet ekspresyonunu indüklediği, buna karşın IL-12R β 2'nin bu aşamada baskılandığı öne sürülmüştür. TCR stimülasyonundan sonra, T-bet, IL-12R β 2 ve IL-12'yi daha sonra yeniden düzenlediği ve T-bet ekspresyonunu korumak için geri bildirimde bulunabildiği görülmüştür (Schulz ve ark., 2009). STAT4, Th1 farklılaşması için de gerekli görünmektedir. STAT4 eksikliği olan fareler, Th2 yanıtlarında bir artış gösterirler. STAT4'ün normal koşullar altında Th2 tepkilerini baskılayabileceği gösterilmiştir (Kaplan ve ark., 1996b; Thierfelder ve ark., 1996). Gerçekten de, Th2 soyunun ana düzenleyicisi olan GATA3'ün, Th1'in T-bet veya IL-12 reseptörüne etki etmekten ziyade, doğrudan STAT4'ün regülasyonu yoluyla Th1 yanıtlarını bastırdığı bulunmuştur (Usui ve ark., 2003). STAT4, Th1 farklılaşmasında kilit bir role sahiptir. Çünkü IFN- γ ve IL-12R β 2 indüklemelerini ve ayrıca farklılaşma işlemi sırasında T-bet uyarılmasını doğrudan etkileyebilir (Usui ve ark., 2003; Usui ve ark., 2006). IL-18, bir Th1 fenotipine doğru farklılaşma ile de ilişkilendirilmiştir. İlk olarak T hücrelerinde ve NK hücrelerinde IFN- γ -indükleyici faktör (IGIF) olarak tanımlanmıştır (Okamura ve ark., 1995). IL-18'in, Th1 IFN- γ üreten bir cevabın indüklenmesi için IL-12 ile sinerjik etkide olduğu bulunmuş olup (Micallef ve ark., 1996; Stoll ve ark., 1998) ve Th1 cevabını da arttırdığı düşünülmektedir (Robinson ve ark., 1997). Th1 hücrelerinin TNF- α 'yı (IFN- γ 'yi değil), CCR4'ü ve CCR7'yi arttırdığı da düşünülmektedir (Ito ve ark., 2003) Th1 hücrelerinin başlangıçta otoimmün hastalıkta anahtar oyuncular olduğu düşünülüyordu. MS hastalarında bulunan otoreaktif T hücrelerinde sitokin üretimi ve kemokin ekspresyonu paterni bir Th1 fenotipine sahiptir (Merrill, 1992; Sorensen ve ark., 1999) ve buna karşı bir mürin EAE'de modeli oluşturulmuştur (Ando ve ark., 1989; Merrill, 1992). Bu da MS ve EAE'nin Th1 aracılı olduğu düşüncesine yol açmıştır. Ek olarak, MS hastaları IFN- γ ile tedavi edildiklerinde, bu durum hastalığın şiddetinin artmasına yol açmıştır (Panitch ve ark., 1987a; Panitch ve ark., 1987b) ve IFN- γ 'nin MS'i daha kötü hale getirebileceğini

göstermektedir. Bu kanıtı daha da destekler bir durum ise T-bet veya STAT4'ün kaybı, EAE'nin bir şekilde durdurulmasına neden olmasıdır (Bettelli ve ark., 2004; Chitnis ve ark., 2001). Bu kanıtların tümü Th1 hücrelerinin otoimmün inflamasyonun indüklenmesinde anahtar patojenik Th alt kümesi olduğunu işaret etmektedir. Öte yanda IFN- γ verildiğinde MS in azalması TH17 hücrelerinin bu sitokin tarafından baskılanmasıyla açıklanmıştır; ayrıca IL-12 nin suunitesi olan p35 KO fareler EAE ye direnc geliştirmeyip ancak p40 subunitrsi KO edildiğinde dirençli hale gelmişler ki p40 p10 ile birleşerek IL-23 ü oluşturur. Benzer şekilde son yapılan çalışmalarda IL-23 sinyal yolağının STAT4 ü de aktive ettiği gösterilmiştir. Dolayısıyla MS/EAE patogenezinde klasik Th1 yolağının değil, IL-23 aracılığıyla aktive olan TH17/Th1 fenotipinde STAT4 sinyal aracılı çalışan IFN- γ ve IL-17 üreten hücrelerin kritik oluşu gösterilmiştir. Özetle, Th1 hücreleri, IFN- γ IL-12 ve IL-18 varlığında gelişir ve TNF- α ve lenfotoksinin yanı sıra, markır sitokinleri olarak IFN- γ 'yı üretirler. Th1 hücreleri, T-bet⁺ hücrelerdir ve farklılaşmaları STAT1 ve STAT4 tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir.

2.2.3.7. Treg Hücreleri

T hücrelerinin bir alt popülasyonunun, periferik toleransın düzenlenmesinde ve korunmasında hayati bir oyuncu olduğu uzun zamandır bilinmektedir (P., 2010). İlk olarak farelerde CD5⁺ popülasyonunun yok edilmesiyle çoklu organ inflamasyonu ortaya çıkmıştır (Sakaguchi ve ark., 1985). Bu “düzenleyici hücrelerin” fenotipi zamanla ortaya çıkarılmaya başlanmış olup bu hücre grubu CD4⁺ CD25⁺ Treg olarak tanımlanmıştır (Sakaguchi ve ark., 1995). Sıçanlarda da benzer deneyler yapılmıştır (Powrie ve ark., 1991). CD25⁻ CD4⁺ hücrelerinin lenfopenik farelere aktarılması, inflamatuvar yanıtın baskılanmamasından dolayı çeşitli şekillerde otoimmün hastalıkların indüklenmesine yani tiroidit, insülit ve poliartrit gibi hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmuştur. CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinin birlikte aktarılması, otoimmün hastalıklara karşı koruma sağlamış ve CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinin kendi kendine toleransı muhafaza etme konusundaki düzenleyici potansiyeli vurgulanmıştır (Sakaguchi ve ark., 1995). Periferik toleransın korunması ve inflamasyonun baskılanması için hayati olan CD4 + doğal T düzenleyici hücrelerin (nTreg) timus içinde de geliştiği gösterilmiştir (Hori ve ark., 2003a). Bu, doğumdan 3 gün sonra neonatal timektominin, periferde CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinin varlığında bloke olmasının gözlenmesinden sonra belirlenmiştir (Sakaguchi ve ark.,

1996). Daha sonra, Forkhead Box P3 proteini (Foxp3) bir Treg markırı olarak tanımlanmış ve Treg'in gelişimi ve baskılayıcı işlevi için gerekli anahtar transkripsiyon faktörü olduğu tespit edilmiştir (Fontenot ve ark., 2003; Hori ve ark., 2003b). Bunu desteklemek için, fonksiyonel Foxp3'den yoksun farelerde, gendeki mutasyona bağlı olarak ciddi lenfoproliferatif hastalıkların ortaya çıktığı gösterilmiştir (Brunkow ve ark., 2001). Benzer şekilde, insan otoimmün sendromu immüno-regülasyon poliendokrinopati enteropatisi X'e bağlı sendrom (IPEX)'da, bağışıklık homeostazının kontrolündeki önemi vurgulanarak Foxp3 geninin insan homologundaki mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (Bennett ve ark., 2001). Daha sonra, Foxp3 ekspresyonunun, in vivo veya in vitro (indüklenmiş Treg; iTreg) olarak, TGF- β varlığında, naif Foxp3-CD4⁺ T hücrelerinde indüklenebileceği belirlenmiştir (Chen ve ark., 2003; Fu ve ark., 2004). Ancak, her ikisi de Foxp3'ü ifade ettikleri için nTreg ve iTreg arasında ayırım yapmak bir miktar mümkündür. Ikaros, neuropilin-1 boyaması ile. Bununla birlikte, Foxp3 lokusunun metilasyon durumu, Treg'de Foxp3 ekspresyon stabilitesinin bir işareti olarak bulunmuştur. Stabil kalan ve Foxp3'ü eksprese etmeye devam eden nTreg, tam bir metilasyon sergilerken, TGF- β 'ya bağlı iTreg, Foxp3'ün yüksek ekspresyonuna rağmen, sadece kısmi demetilasyon sergilemektedir. Bu iTreg fenotiplerinde plastisite gösterir ve TGF- β yokluğunda yeniden stimülasyondan sonra Foxp3 ekspresyonunun yanı sıra bastırıcı işlevini de kaybedebilmektedir (Floess ve ark., 2007). Treg'in aşağıdaki gibi düzenleyici baskılamalar yaptığı gösterilmiştir: 1) Normal durumdaki lenf nodu içinde, DH zayıf stimülasyona yol açar ve inflamatuvar yanıt sırasında efektör yanıtı verilmez. 2) Bir inflamatuvar yanıt sırasında lenf düğümünde ve kendi antijenine maruz kalma sırasında, Treg çoğalır ve bu nedenle bir T efektör tepkisinin gelişimini önleyebilir. 3) Treg'lerin bazıları lenf düğümünü terk eder ve hedef organa göç eder ve inflamasyon tepkisini baskılayarak iltihabın çözülmesini başlatır (O'Connor ve Anderton, 2008; Vignali ve ark., 2008). İlginçtir ki, Th1 aracılı inflamasyonu kontrol etmek için Treg, IFN- γ 'ya yanıt olarak T-bet ekspresyonuna adapte olmaktadır (Koch ve ark., 2009). Treg'deki IFN düzenleyici faktör 4'ün (Irf4) ifadesinin Th2 yanıtının baskılanması için önemli olduğu gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2009). Benzer şekilde, Treg'deki STAT3 ifadesinin bir Th17 yanıtının Treg baskılanmasını kolaylaştırmak için gereken anahtar faktör olduğu bulunmuştur (Chaudhry ve ark., 2009). Bu nedenle, Treg, her bir T efektör alt kümesi ile ilişkili anahtar transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu yoluyla Th1, Th2 ve Th17 aracılı cevapları bastırmaktadır (P., 2010). Treg'in plastisitesi yakın zamanda

sorgulanmış olup IL-17 gibi proinflamatuvar sitokinler üretmeye başlayabilecekleri bildirilmiştir (Lochner ve ark., 2008; Yang ve ark., 2008c).

2.2.4.EAE'de T düzenleyici hücreler

Treg'in EAE'deki inflamasyonun inhibisyonunda rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir (Kohm ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2004). Transfer edilen poliklonal Treg'in lenf nodu içindeki otoreaktif T hücrelerinin prime edilmesini etkileyerek hastalığın gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kohm ve ark., 2002). Bununla birlikte, MSS içerisinde IL-10 üreten Foxp3⁺ Treg birikimi, EAE sırasında da gözlenmiştir (McGeachy ve ark., 2005a). Önemli olarak, bu MSS türevli Treg'lerin bir IFN- γ cevabını baskıladığı, ancak MSS türevli efektör hücrelerinden kaynaklı IL-17 tepkisini baskılayamadığı görülmüştür (O'Connor ve ark., 2007). MS hastalarında, periferik kandaki CD4⁺ CD25^{hi} Treg hücre yoğunluğunun sağlıklı bireylerdekine benzer olduğu bulunmuş yani MS hastalarında Treg eksikliği görülmemiştir. Sağlıklı kontrollerden izole edilen CD4⁺ CD25^{hi} Treg, CD4⁺ CD25'e cevap veren T hücrelerinin proliferasyonunu baskılamış; ancak MS hastalarından izole edilen Treg, proliferasyonu baskılayamamıştır (Viglietta ve ark., 2004). Bu nedenle, MS hastalarının kanından izole edilen Treg'in, sağlıklı kontrollerde bulunanlarla karşılaştırılabilir düzeyde mevcut olduğu, ancak etkin düzenleme işlevinden yoksun oldukları görülmektedir. Bu, periferde otoreaktif T hücrelerinin kontrolünün eksikliğinden kaynaklanabilir ve bu da hastalığın başlamasına neden olabilir. Miyelin spesifik CD4⁺ CD25⁺ Treg, transgenik farelerinden kronik EAE'li farelere transfer sırasında hastalığı baskılamayı başarmıştır (Stephens ve ark., 2009).

2.2.4.1.Th17 Hücreleri

2003 yılında IL-23 tarafından uyarılan yeni bir CD4⁺ T hücre alt kümesi keşfedilmiştir (Aggarwal ve ark., 2003). Bu yeni Th alt kümesi daha sonra fenotipik olarak Th1 ve Th2 soylarından farklı olan Th17 soy olarak tanımlanmıştır (Bettelli ve ark., 2007; Langrish ve ark., 2005). Genel olarak, Th17 hücreleri, epiteliyal/mukozal bariyerlerdeki patojenlerin ve mantarların temizlenmesi için gereklidir ve ayrıca otoimmün inflamasyonun uyarılmasında rol oynamaktadır (Littman ve Rudensky, 2010). Th17 farklılaşmasının, sırasıyla Th1 ve Th2 hücrelerinin kilit markır sitokinleri olan IFN- γ ve

IL-4 tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Th17 hücrelerinin, STAT1, T-bet, STAT4 ve STAT6'dan bağımsız olarak IL-17A ve IL-17F ürettiği gösterilmiştir (Harrington ve ark., 2006). Transkripsiyon faktörü ROR γ t ilk önce çift-pozitif timositlerde eksprese edilen bir nükleer reseptör olarak keşfedilmiş ve klonal seçim sırasında hayatta kalmak için önemli olduğu bulunmuştur. Lenfoid doku indükleyici (LTi) hücrelerinin ve lenfoid dokuların gelişimi için gerekli olan LTi benzeri hücrelerin gelişimi için Ror γ t de gereklidir (Eberl ve ark., 2004; Sun ve ark., 2000). Daha sonra Ror γ t, Th17 hücrelerinin farklılaşması için gerekli anahtar transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Ror γ t eksikliği olan farelerde, IL-17 üreten T hücrelerinin bulunmadığı, *in vivo*' nun yanı sıra *in vitro* Th17 hücrelerinin farklılaşmasının Ror γ t ekspresyonuna ihtiyaç duyduğu vurgulanmıştır (Ivanov ve ark., 2006). Başka bir ilgili nükleer reseptör ROR α 'nın, Th17 farklılaşması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ror γ t ve Ror α transkripsiyon faktörleri, Th17 farklılaşmasını tek başına ifade edilenden daha fazla teşvik etmek için birlikte çalışırlar. Hem Ror α hem de Ror γ t'deki eksikliklerin IL-17 üretimini veya Th17 üretimini ciddi şekilde bozduğu ve ayrıca EAE'de hastalığın iyileşmesine yol açtığı gösterilmiştir (Yang ve ark., 2008d). Başlangıçta, IL-23'ün, IL-17 üreten pro-inflamatuar T hücrelerinin farklılaşması için gerekli anahtar sitokin olduğu düşünülüyordu (Aggarwal ve ark., 2003; Langrish ve ark., 2005). Bununla birlikte, daha sonra, IL-23'ün, naif T hücrelerinin farklılaşması için gerekli olmadığı, bunun yerine, ilk farklılaşmalarından sonra Th17 fenotipinin korunması için gerekli olduğu ortaya konulmuştur (Stritesky ve ark., 2008). IL-23R, naif CD4⁺ T hücrelerinde ifade edilmez, ancak farklı Th17 hücrelerinde eksprese edilir; bu, IL-23'ün, hücrelerin terminal olarak farklılaştırılmasından sonra Th17 fenotipini koruyabildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu IL-23 sinyalleşmesi, tam bir Th17 yanıtının gelişimi için gereklidir (McGeachy ve ark., 2009). IL-23'ten veya IL-23R'den eksik olan fareler, *in vivo* olarak önemli bir Th17 yanıtı üretme kabiliyetini gösterememektedir (Langrish ve ark., 2005; McGeachy ve ark., 2009). Ayrıca IL-23, örneğin IL-22 gibi diğer efektör sitokinlerin, Th17 hücreleri tarafından üretilmesini sağlama rolüne de sahiptir (Liang ve ark., 2006). IL-6 ve TGF- β 'nın, naif CD4⁺ T hücrelerinin bir Th17 fenotipine farklılaştırılması için gereken anahtar sitokinler olduğu tespit edilmiştir (Bettelli ve ark., 2006a; Korn ve ark., 2008). IL-6'nın Th17 hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* farklılaşması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Korn ve ark., 2008; McGeachy ve ark., 2005b). Buna ek olarak, IL-6-eksikliği olan fareler, muhtemelen başka bir yoldaki roller göz ardı edilememesine rağmen, muhtemelen bir Th17 yanıtının

indüklenmesi yoluyla otoimmün patogeneizde IL-6 sinyalleşmesinin rolünü vurgulayan EAE indüksiyonuna dirençlilik göstermiştir (Okuda ve ark., 1998). İnsan Th17 hücrelerinin farklılaşmasının, mürin hücrelerine göre biraz daha farklı olduğu kanıtlanmıştır. İnsanlarda, IL-1 β 'nın, IL-6, TGF- β ve IL-21 ile kombinasyonunun, Th1 hücrelerini inhibe eden TGF- β ile birlikte bir Th17 fenotipine doğru farklılaşması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Manel ve ark., 2008; Yang ve ark., 2008a). STAT3 eksikliği, IL-17 üreten Th17 hücrelerinin bulunmamasına neden olması, hem fare hem de insan hücrelerinde farklılaşması için gerekli olduğunu göstermektedir (Harris ve ark., 2007; Yang ve ark., 2007). STAT3, IL17 genine ve ayrıca IL21 genine bağlanarak işlev görür ve ayrıca ROR γ t ve IL-23R'nin ekspresyonunu indükler (Chen ve ark., 2006; Nurieva ve ark., 2007; Wei ve ark., 2007). IL-6, STAT3'ü aktive etme rolüne sahiptir ve bu aynı zamanda Foxp3⁺ ekspresyonunu da azaltmaktadır, dolayısıyla Foxp3⁺ Treg'in indüklenmesinin baskılanmasına yol açar ve IL-6'nın, Th17 ve Treg farklılaşması arasındaki dengede önemli rol oynadığını gösterir (Yang ve ark., 2007). Th2 ile ilişkili bir STAT proteini olan STAT5, Th17 hücre farklılaşması üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. STAT5 aktivasyonunu tetikleyen IL-2'nin, Th17 hücre üretimi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceği üzerinde durulmaktadır (Laurence ve ark., 2007). Bununla birlikte, Th17 hücreleri bir kez terminal (uç) olarak farklılaştığında, devamı ve genişlemeleri için STAT5'ten gelen IL-2 sinyalinin gerekli olduğu görülmüştür (Amadi-Obi ve ark., 2007).

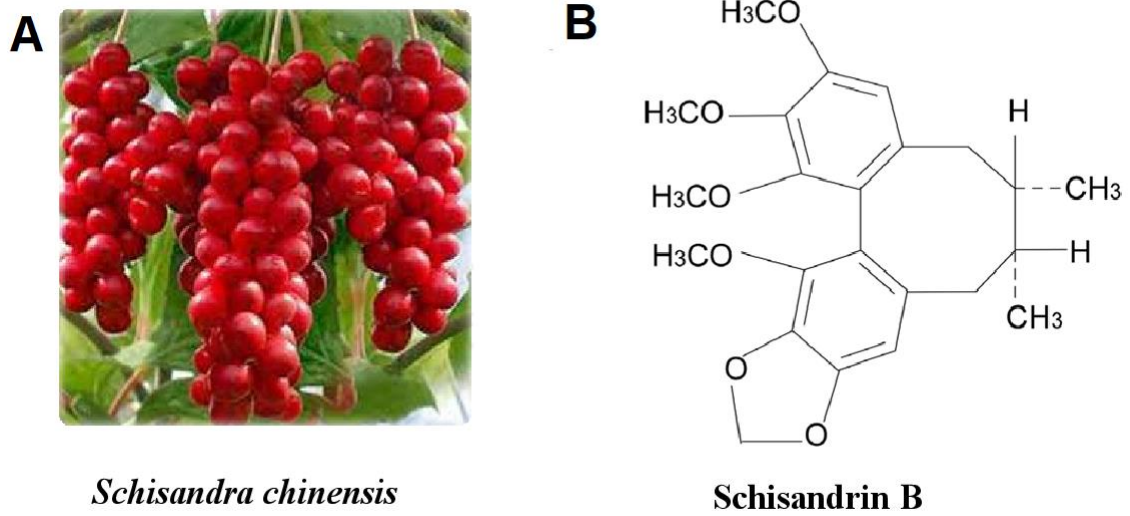
2.2.4.2.Th17 hücreleri ve Treg arasındaki ilişki

Th17 hücreleri ve Treg, yakın bir gelişimsel ilişkiyi paylaşmaktadır. Pro-inflamatuar Th17 hücreleri, periferde bir Treg gibi, farklılaşmaları için anti-inflamatuar TGF- β 'ya ihtiyaç duymaktadır. Sadece TGF- β 'nın varlığı, TCR stimülasyonunu takiben Foxp3⁺ iTreg'in gelişmesine yol açmaktadır. TGF- β proinflamatuar IL-6 ile birlikte bulunduğu anda ise, Th17 hücreleri üretilir ve böylece IL-6, Foxp3⁺ ekspresyonunun baskılanmasında ve aynı zamanda Th17 hücrelerinin gelişiminde önemli rol oynar (Bettelli ve ark., 2006a). TGF- β 'nın, T hücrelerinin iki farklı fenotipini nasıl ayırt edebildiği ilginçtir. Düşük TGF- β konsantrasyonlarının, IL-6 varlığında Th17 farklılaşmasını desteklediği, yüksek TGF- β konsantrasyonlarının ise, IL-23R'nin ekspresyonunu baskılayan iTreg fenotipine göre farklılaşmayı desteklediği düşünülmektedir. İşlevsel olarak, Treg ve Th17 hücreleri ayrıca

karşılıklı bir ilişki sergilerler. Ror γ t, Ror α ve Foxp3⁺ birbirlerine bağlanabilir ve diğerlerinin faaliyetlerini engelleyebilir. Bu nedenle, Ror γ t ve Ror α , Foxp3⁺ü bastırmak için etki eder ve karşılıklı olarak Foxp3⁺, Ror γ t ve Ror α 'yı bastırmak için hareket etmektedir. Bununla birlikte, diğer Th17 ile ilişkili sitokinlerin, örneğin IL-6, IL-21 ve IL-23'ün varlığı, Foxp3⁺ aracılı Ror γ t inhibisyonunun ortadan kaldırılmasına ve bir Th17 fenotipine farklılaşmasına neden olmaktadır (P., 2010; Zhou ve ark., 2008). Bu, çevredeki sitokin ortamının, Treg veya Th17 dengesini belirlemedeki önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, retinoik asit (all-trans retinoik asit, ATRA), Th17 farklılaşmasını inhibe ederken, diğer taraftan Foxp3⁺ ekspresyonunu ve Treg farklılaşmasını da sağlamaktadır (Elias ve ark., 2008).

2.3.Schisandrin B (Sch-B)

Schisandra chinensis, Çin, Japonya ve Kore'de geleneksel tıp tedavisinde kullanılmaktadır ve Magnoliaceae familyasına aittir. Şizandra (Schisandra) meyvesi, bazı nörolojik hastalıkların tedavisinde doğal ürünler olarak ve anti-aging tonik olarak kullanılmıştır. Nöronları glutamat kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruduğu düşünülmektedir (Liu, 1985). Şizandra meyvesinden, 30'dan fazla lignan izole edilmiştir (Sun ve ark., 2014). Lignanların farmakolojik çalışmaları ile bu meyvenin anti-inflamatuar anti-kanser ve anti-HIV etkileri ortaya çıkarılmıştır (Fujihashi ve ark., 1995; Wang ve ark., 1994; Yasukawa ve ark., 1992). Şizandra meyvesi, aktif *dibenzocyclooctadiene* lignanlarını (ağırlıkça yaklaşık %2) içerir; ana bileşenleri Schisandrin (Sch) Sch-A, Sch-B (γ -schisandrin), Sch-C ve gominsin A'dır (Hikino ve ark., 1984).

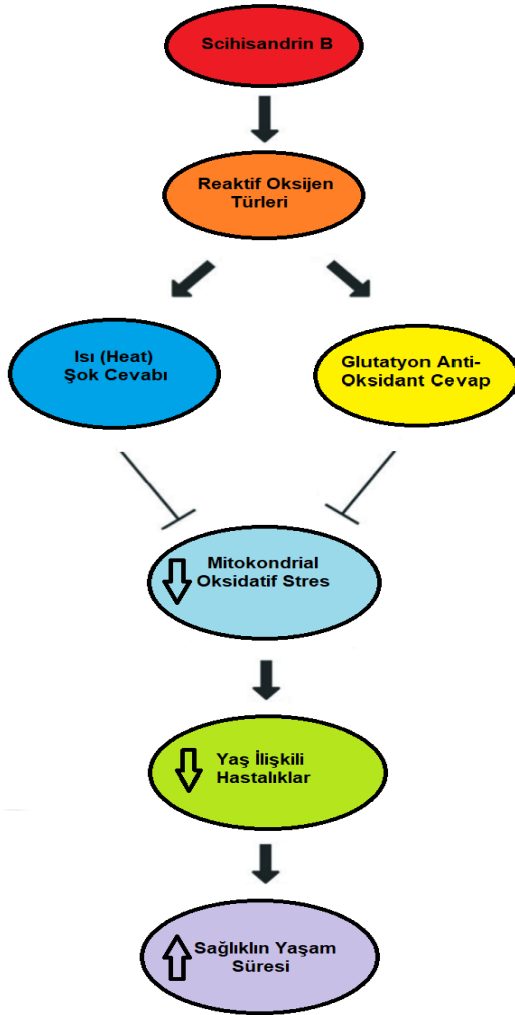


Şekil 2.7. A) *Schisandra chinensis*, B) Schisandrin B'nin kimyasal formülü (Tetsuya ve ark., 2012)

2.3.1. Schisandrin B'nin Oksidatif Strese Etkisi

Sch-B, dokuların oksidatif hasara karşı direncini arttırmada potansiyel olarak faydalı bir ajandır ve Sch-B, hem glutatyon antioksidan hem de redoks duyarlı sinyal yolları ile bir ısı şok cevabını uyarabilmektedir (Şekil 2.8) (Leong ve ark., 2012). Sch-B'nin mitokondriyal antioksidan durumu ve mitokondriyal fonksiyon üzerindeki yararlı etkileri, nörodejenerasyonun önlenmesi ve tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım olabilir, böylece yaşlanan bireylerde beyin sağlığını geliştirebilir (Lam ve Ko, 2012). Sch-B, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivitesinin yanı sıra, nöroinflamatuvar süreçte oksidatif stresi etkili bir şekilde azaltan lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı mikroglia'daki reaktif oksijen türlerinin üretimini önemli ölçüde inhibe etmektedir. Bu bulgular, Sch-B'nin mitokondri ve NADPH oksidasyonunun inhibisyonuna bağlı karaciğer mikrozomlarındaki antioksidan etkisi ile ilgili daha önceki çalışmalarla tutarlıdır (Chiu ve ark., 2006a; Ip ve Ko, 1996; Zeng ve ark., 2012). İskemi-reperfüzyon hasarı rat modelinde Sch-B, Malondialdehid (MDA) seviyesini düşürerek ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırarak oksidatif stresi bastırmıştır (Zhu ve ark., 2017). Sigara dumanına maruz bırakılan farelerde Sch-B tarafından, MDA düzeyi inhibe edilmiş olup SOD ve glutatyon (GSH) seviyeleri ise yükseltilmiştir. Sch-B, sigara dumanı kaynaklı NF-κB aktivasyonunu önemli ölçüde inhibe etmiş ve Nrf2 ve HO-1 ekspresyonunu artırmıştır (Jia ve ark., 2017). Sch-B, pulmoner fibroblastlarda TGF-1'e

cevaben Smad2/3 transkripsiyon faktörü aktivasyonunun NADPH oksidaz 4 (NOX4) esansiyel mediatörüdür (Amara ve ark., 2010). Farelerde bleomisin (BLM) kaynaklı pulmoner fibroziste NOX4'ün aşırı ekspresyonu Sch-B tarafından inhibe edilmiştir. Sch-B, TGF- β 1/Smad 2 sinyal iletimini bloke etmiştir. Sch-B, protein ve mRNA seviyelerinde NOX4 aşırı ekspresyonunu bastırmıştır. Önceki çalışmada Sch-B, LD50'sinin >10g/kg vücut ağırlığı olduğunu gösterilmiştir. Sch-B'nin, ilk defa BLM uygulamasından 2 hafta sonra akciğer kollajen birikimini azalttığı ve α -SMA ve HYP gibi histolojik ve biyokimyasal parametreleri azalttığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2017a).



Şekil 2.8. Sağlıklı bir yaşam süresinin uzatılmasında Schisandrin B'nin neden olduğu cevap (Lee ve ark., 2012; Leong ve ark., 2012).

2.3.2.Schisandrin B'nin beyin hücrelerine Etkisi

Sch-B, skopolamine bağlı demansı etkili bir şekilde önleyebilir ve farelerin davranışsal görevlerde performansını artırabilir. Sch-B, skopolamin kaynaklı asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini önemli ölçüde baskılamaktadır (Giridharan ve ark., 2011). Ayrıca, Sch-B, sıçan kortikal nöron proliferasyonunu iyileştirerek ve Alzheimer hastalığının ilerlemesinde merkezi bir olay olan β -amiloid proteini kaynaklı nöronal hasarı inhibe ederek nöroprotektif bir etki göstermektedir (Wang ve Wang, 2009). Bu sonuçlar, Sch-B'nin hafızayı geliştirebileceğini ve nöronal hücreleri nörodejenerasyona karşı koruyabileceğini göstermektedir. Mikroglia-nöron birlikte kültürlerinin LPS ile indüklenmesi nöron canlılığının azalmasına neden olmasına karşın, Sch-B ile muamele, LPS ile muamele edilmiş kontrol kültürlerine kıyasla, konsantrasyona bağlı bir şekilde nöronal hücre ölümünü önemli ölçüde inhibe etmektedir. Sch-B'nin nöroprotektif etkisi, mikroglial aracılı nörotoksik inflamasyonun inhibisyonundan kaynaklanıyor olabilir (Zeng ve ark., 2012). Proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve IL-6'nın mikroglia içindeki ekspresyonu, LPS ile 6 saat süreyle indüklenen mikroglia hücreleri Sch-B muamelesi sonunda doza bağlı olarak azalmıştır. Bu sonuçlar, Sch-B'nin, LPS kaynaklı inflamatuvar araçların mikroglia tarafından üretilmesini etkili bir şekilde önleyebildiğini göstermektedir. Sch-B'nin, mikroglia'da LPS kaynaklı IKK α/β aktivasyonunu ve I κ b β degradasyonunu önleyebileceğini göstermektedir. IKK α/β -I κ b β -NF- κ b inflamatuvar sinyal yolunun sürekli inhibisyonu, Sch-B'nin mikroglia'daki anti-inflamatuvar etkisinden kaynaklanmaktadır. Sch-B, TLR4'ün antagonizması yoluyla IKK α/β -I κ b β -NF- κ b inflamatuvar sinyal yolunu inhibe etmektedir (Zeng ve ark., 2012). Sch-B, rat MCAo/reperfüzyon inme modelinde ilk travmadan önce uygulandığında kortikal nöronal hasarı önleme yeteneğine sahiptir. 10 ve 30 mg/kg'daki Sch-B tedavisi, oklüzyondan 24 saat sonra yapılan kontrollere kıyasla, enfarktüs hacminde sırasıyla %25.7 ve %53.4 azalma göstermiştir. Bu etkinin TNF- α ve IL1- β 'nin ekspresyonunun azalması ve mikroglia aktivitesinin azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sch-B'in nöron koruması, inflamasyonun azaltılması, mikroglia aktivasyonunun azaltılması ve MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun azaltılması ile gerçekleşir. Sch-B, MCAo uygulamasından sonraki 24 saatte kontrol ile kıyasla nörolojik hemiparezi skorunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Doğal lipofilik küçük bir fenolik bileşik olan Sch-B, hücre zarlarına nüfuz edebilir ve kan beyin bariyeri (BBB)'yi geçebilir (Lee ve ark., 2012). Yapılan çalışmalar

sonucunda, Sch-B'nin beyin hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda beyinde yer alan nöronları iyileştirmekte ve beyinde meydana gelen inflamasyonları azaltmaktadır.

2.3.3.Schisandrin B'nin İnflamasyon ile İlişkisi

Sch-B'nin inflamasyon üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma vardır. Sch-B, Con A tarafından indüklenen lenfositlerin proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe etmiştir. Sch-B, *in vitro* doza bağlı bir şekilde INF- γ , IL-17, IL-10, IL-6 ve TGF- β sitokinlerinin salgılanmasını inhibe etmektedir. İlginç şekilde, INF- γ , IL17, IL-6 ve TGF- β seviyelerini düşürmesine rağmen, *ex vivo* deneylerde IL-10 seviyesini belirgin şekilde arttırmıştır. Bunun sebebi; *in vitro* ortamda bulunmayan ve T hücre fonksiyonlarına etki eden DH'ler, makrofajlar ve B hücreleri gibi çeşitli farklı hücrelerin olmamasından kaynaklanabilir (Puga ve ark., 2011), ya da IL-10, Treg hücrelerine ek olarak makrofajlar, B hücreleri ve nötrofiller gibi diğer hücre tipleri tarafından salgılanabilmektedir (Chen ve ark., 2016; Lee ve Kung, 2012; Takamiya ve ark., 2013). Sch-B, Th1 ve Th17 farklılaşmasını bastırırken, Treg çoğalmasında doza bağlı bir şekilde karşılıklı olarak teşvik etmiştir. Sch-B, T-bet ve ROR γ t'nin mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ederken, Foxp3⁺ mRNA ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde arttırmıştır. Hem oksijenaz-1 (HO-1), Th hücre farklılaşmasında bir Sch-B hedefi olabilir. Bir HO-1 inhibitörü olan ZnPP, Sch-B'nin farklı Th altkümüsi farklılaşması üzerindeki etkisini ortadan kaldırmıştır. Bu nedenle Sch-B'nin HO-1 aktivasyonu ile T hücre farklılaşmasını etkilemesi muhtemeldir (Chen ve ark., 2016). Farelere Sch-B (80 mg/kg, ip) enjekte edilmesi, Nrf2, HO-1, TrxR1 ve GCLC'nin mRNA ekspresyonunda kontrole göre önemli bir artışa yol açmıştır. Sch-B tedavisi ayrıca lenfositlerdeki HO-1'in protein seviyesini arttırmıştır. Sch-B, doza bağlı bir şekilde lenfositlerin Con A kaynaklı proliferasyonunu ve IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ sitokinlerinin salgılanmasını inhibe etmiştir. Lenfositlerin Sch-B ile inkübe edilmesi, anti-CD3/D28 mAb'nin neden olduğu lenfosit proliferasyonunu ve sitokin sekresyonunu tamamen inhibe etmiştir. Sch-B'nin hücrelere uygulanması, önemli ölçüde CD28, CD69, CD25, CD54, CD71 ve CD98 ekspresyonunun artışını engellemiştir (Checker ve ark., 2012). Mitojen ile indüklenen erken ve CD69 (erken aktivasyon markörü), CD25 (IL-2 reseptörü-a), CD54 (ICAM-1), CD71 (transfer reseptörü) ve CD98 gibi geç aktivasyon markörlerinin inhibisyonu, açıkça Sch-B'nin, T hücresi aktivasyonu sırasında geç

olayların yanı sıra erken olayları da baskıladığına işaret etmektedir (Checker ve ark., 2012; Komada ve ark., 2006; Lopez-Cabrera ve ark., 1993; Zheng ve ark., 2007b). Con A ile uyarılan lenfosit hücrelerinin kültür süpernatantlarında IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ sitokinlerinin salgılanması ölçülmüştür. Sch-B, lenfositlerde IL-2, IL-6 ve IFN- γ 'nin inhibisyonuna aracılık ettiği, fakat IL-4 sitokin sekresyonunu inhibe edemediği ve lenfositlerin SnPP uygulanmasıyla Sch-B'nin etkisini önemli ölçüde ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, Nrf2 (ATRA) ile ön muamele, IL-2, IL-6 ve IFN- γ 'nin yanı sıra aktiveleştirilmiş lenfositler tarafından IL-4 üretiminin Sch-B aracılı baskılanmasını önemli ölçüde önlemiştir. Stimülasyondan önce lenfositlere Sch-B ile uygulanması, ERK, JNK ve p38 MAP kinazlarının mitojen ile indüklenen fosforilasyonunu ve ayrıca MEK ve c-Raf gibi üst sinyal yolak düzenleyici kinazları önemli ölçüde inhibe etmiştir. Nrf2 (ATRA) ve HO-1 (SnPP) inhibitörlerinin lenfositlere uygulanmasından sonra Sch-B varlığında aktive edilmesi ile, hem ATRA hem de SnPP, Sch-B'nin anti-inflamatuar etkilerini ortadan kaldırarak, Sch-B'nin gözlenen anti-inflamatuar etkilerinde Nrf2/HO-1 yolunun önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Checker ve ark., 2012). HO-1, Treg tarafından salgılanan majör bir anti-inflamatuar sitokin olan anti-inflamatuar molekülü IL-10'nu uyarabilmektedir (Lee ve Chau, 2002). HO-1'in, Th17 üretimini inhibe ettiği ve Treg hücre farklılaşmasını desteklediği, böylece bazı alerjik ve inflammatuar hastalıkları azalttığı gösterilmiştir (Fan ve ark., 2013; Xia ve ark., 2007; Xia ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2014). Karbon monoksit (CO), HO-1 tarafından endojen olarak üretilir ve CO salma molekülü-A1 (CRMA1), Th1/Th17 hücrelerinin *in vitro* inhibisyonu yoluyla anti-inflamatuar bir rol oynamaktadır (Nikolic ve ark., 2014). Sch-B tedavisi (100 mg/kg), dekstran sülfat sodyum (DSS) tarafından indüklenen histolojik değişiklikleri önemli ölçüde iyileştirmiştir. Sch-B'nin verilmesi, DSS'nin neden olduğu fare kolitinde TNF- α , IL-1 β , IFN- γ ve IL-6'nın üretimini doza bağlı bir şekilde azaltmıştır. Sch-B ayrıca, DSS grubuna kıyasla kolon dokusunda TNF- α , IL-1 β , IFN- γ ve IL-6'nın transkripsiyon seviyelerini de belirgin şekilde bastırmıştır. Bu nedenle, Sch-B, bu proinflammatuar sitokinlerin transkripsiyonunu ve üretimini azaltarak DSS kaynaklı fare kolitine karşı koruma sağlayabilmektedir. Sch-B'nin intraperitoneal uygulaması, DSS ile p38, ERK ve JNK'nın artan fosforilasyonunu azaltmaktadır. Sonuç olarak, Sch-B'nin, NF- κ B ve MAPK'lerin DSS kaynaklı fare kolitinde aktive olduğu ve daha da önemlisi, NF- κ B ve MAPK'lerin aktivasyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin pro-inflamatuar sitokinlerin yukarı regülasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir. Bu veriler güçlü bir şekilde Sch-B'nin

güçlü bir anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğunu ve kolit tedavisi için klinik bir ilaç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Liu ve ark., 2015).

LPS ile uyarılmış HUVEC'lerin Sch-B ile ön işleme tabi tutulması, VCAM-1 ve ICAM-1'in konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde inhibe olmasına sebep olmuştur. Sch-B'nin anti-inflamatuar mekanizması, Nrf2 siRNA tarafından susturulmaktadır. Sch-B'nin NF-kB üzerine etkisi sonucu TNF- α ve IL-8 üretimi tersine dönmüştür. Sch-B, Nrf2 ve HO-1'in ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde arttırmıştır. Buna ek olarak, Sch-B'nin anti-inflamatuar etkileri, Nrf2'nin yıkılması durumunda tersine dönmüştür (Lin ve ark., 2017). Schisandrin B'nin anti-inflamatuar bir ajan olduğu görülmektedir. Bu anti-inflamatuar özelliğinin nedenlerinden biri Th1 ve Th17 hücrelerini azaltırken Treg hücrelerini artırarak yaptığı gösterilmiştir. Aynı zamanda inflamasyonla ilişkili sitokinlerinde azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak Sch-B'nin güçlü bir anti-inflamatuar molekül olduğu bildirilmiştir.

VYA'ya göre Doz Dönüşüm Formülü	
İDD (mg/kg) = Hayvan Dozu(mg/kg) X	$\frac{\text{Hayvan Km}}{\text{İnsan Km}}$

Şekil 2.9. İnsana denk dozun hesaplanmasında kullanılan formül (Reagan-Shaw ve ark., 2008). (VYA: Vücut Yüzey Alanı ; İDD: İnsana Denk Dozu)

2.3.4. Schisandrin B'nin İnsanlarda Kullanılabilirliği ve Toksisitesi

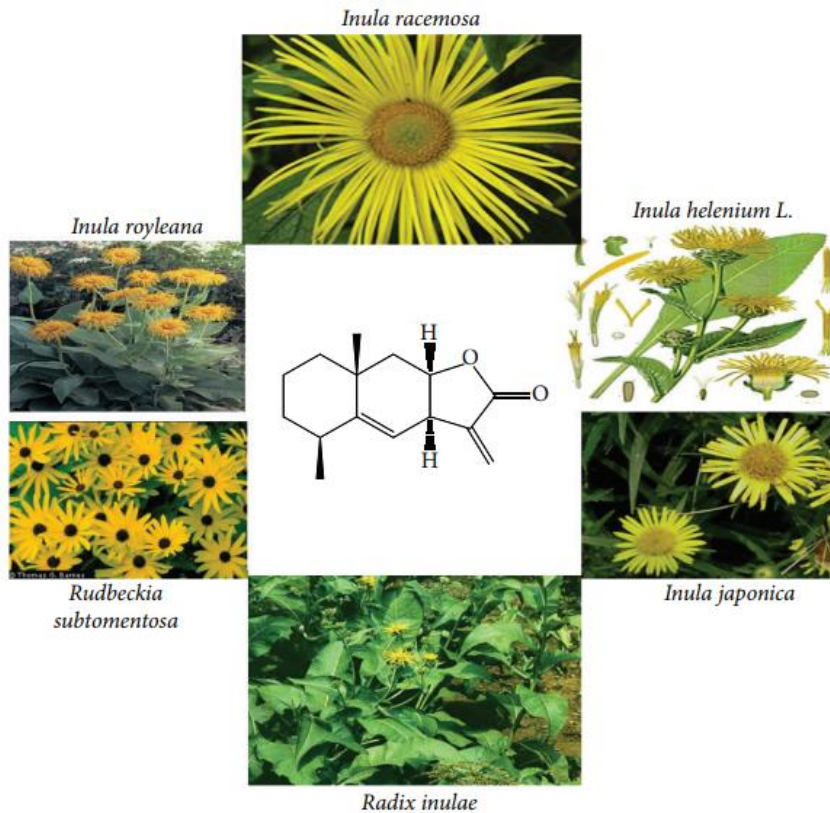
Alkolden bağımsız karaciğer hastalarında Sch-B'nin kullanılabilirliğini araştırmak için, Sch-B'nin insan eşdeğer dozları, hayvanlardan insanlara bir doz dönüşüm denklemine dayanarak hesaplanmıştır (Şekil 2.9). İnsanlarda optimal günlük Sch-B dozu henüz belirlenmemiş olsa da, yetişkin insanlar için önerilen havada kurutulmuş şizandra meyvesi dozu günde iki kez 0.5-1.5 gr (Panossian ve Wikman, 2008), günde sırasıyla 20-60 mg Sch-B'ye eşdeğer olduğu bilinmektedir (Luk ve ark., 2008). Bu bilgiye dayanarak, önerilen hava ile kurutulmuş şizandra meyvesi (insanlarda günde 60 mg Sch-B'nin eşdeğeri) farelerde hiperlipidemiye neden olan dozdan (insanda günde 973 mg Sch-B'ye

eşdeğer) çok daha düşüktür. Sch-B içeren şizandra meyvesi'nin önerilen dozda uygulanmasının güvenli olabileceğini düşündürmektedir (Leong ve Ko, 2016). Sch-B, *in vitro* hücre çalışmalarında bir hormetik ajan gibi davranır, düşük konsantrasyonlarda sitoprotektif etkiye (Chiu ve ark., 2006b) ve yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkiye (Wu ve ark., 2004) sahiptir. Tek bir oral dozun (0.8g/kg), çoklu dozların (200 mg/kg x30 gün) veya farelere diyet (w/w %0,012, 9 ay) ilavesinin ardından Sch-B tedavisinin saptanabilir toksik etkileri gözlenmemiştir (Ko ve ark., 2008; Ko ve Lam, 2002). Sch-B'nin insanda yapılan bir çalışması yoktur, fakat bu etken maddeyi içeren bitki ile klinik çalışmalar bulunmaktadır. Song ve ark. günde 6.7gr kurutulmuş şizandra meyvesine eşdeğer meyve ekstraktını suda çözüp obez kadınlara 12 hafta boyunca verdiklerinde, plasebo grubuyla karşılaştırıldığında bu meyve ekstraktı ile tedavi edilen deneklerin obezite ile ilişkili parametrelerinde (bel ve kalça çevresi, vücut ağırlığı, vücut kitle indeksi ve yağ kütlesi gibi) iyileşme eğilimi gözlenmiştir (Song ve ark., 2015). Bu çalışmada insanlarda kullanılan şizandra meyvesi ekstraktı dozu yaklaşık 270mg Sch-B'ye eşdeğer doz olarak bulunmuştur. Bu çalışmalar sonucunda Sch-B'nin toksik etkisinin az olduğu ve insanlarda dolaylı yollarla yapılan çalışmalarda olumsuz bir etkisinin olmadığı önerilebilir.

2.4.Alantolakton (ALT)

Alantolakton, *Inula helenium* tarafından üretilen bir seskiterpen lakton (eudesmanolide) olup, Compositae familyasına aittir (Şekil 2.10). ALT'nin, anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-inflamatuar ve anti-kanser etkilerini içine alan birçok biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca, bu bileşiğin alerjik hastalarda pozitif yama testleri üretebilen güçlü bir alerjen olduğu gösterilmiş ve duyarlılık uyandırma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür (Mitchell ve ark., 1970). Alantolakton, uygun nükleofilik moleküller ile reaksiyona girebilen bir haptendir. Terpenin, lizin, sistein ve histidin gibi serbest amino asitlerle reaksiyona girebildiği gösterilmiştir (Dupuis ve ark., 1974). Alantolaktonun, Jurkat lösemi T hücrelerinde apoptozu indüklediği, hücre morfolojisi, apoptotik çekirdeklerin ve fosfatidilserinin hücre zarının dış yüzeyine translokasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Dirsch ve ark., 2001). Alantolakton, anti-bakteriyel özellik yanı sıra güçlü antelmintik (anti-parazitik) özelliğe de sahiptir (Cantrell ve ark., 1999). Alantolakton, kinin redüktaz (QR) aktivitesini

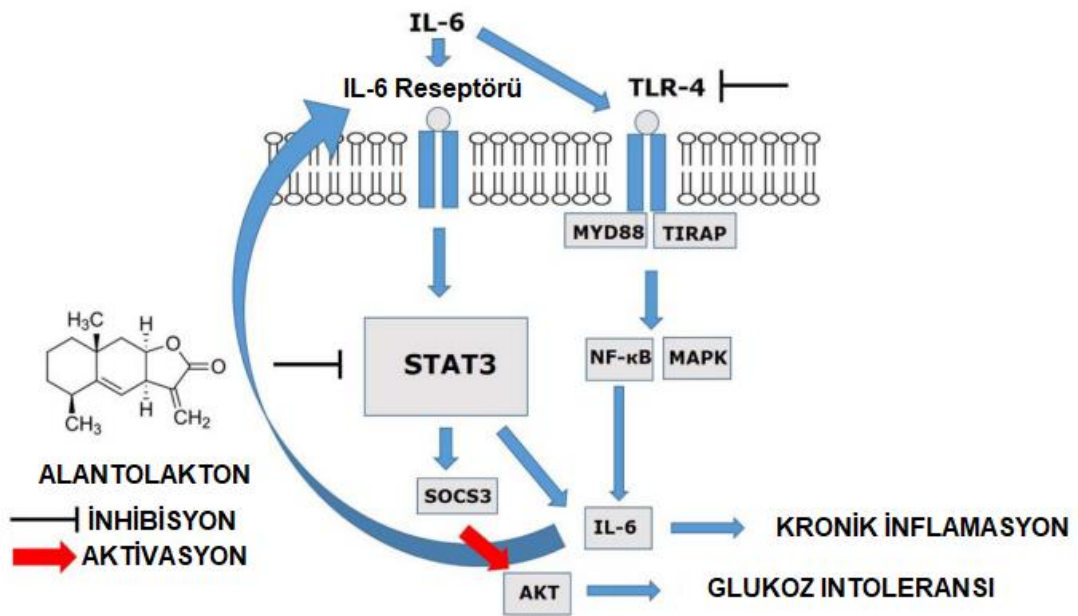
indüklemek için güçlü bir potansiyel etkiye sahip olup (Lim ve ark., 2007), Hepa1c1c7 fare hepatoma hücrelerinde QR, GST, γ -glutamilsistein sentaz, glutatyon redüktaz ve HO-1'i içine alan antioksidan enzimlerin doza bağlı bir indüksiyonuna neden olmuştur (Seo ve ark., 2008). Alantolakton spesifik olmayan alkilleyici bir ajan olarak da tanımlanmıştır (Lawrence ve ark., 2001). Alantolakton, insan kolon adenokarsinomu HCT-8 hücrelerinde aktivin/SMAD3 sinyalini uyarmaktadır. Alantolaktonun, 5 μ g/mL konsantrasyonda normal hücrelere neredeyse hiç toksisitesi olmadığı, ancak tümör hücrelerinde anti-proliferatif fonksiyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, alantolaktonun antiproliferatif fonksiyonunun aktivin/SMAD3'e bağımlı olduğu da gösterilmiştir. Bu sonuçlar, alantolaktonun, aktivin sinyal yolağındaki Cripto-1 ile aktivin reseptörü tip IIA arasındaki etkileşimi keserek antitümör etkisini gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır (Shi ve ark., 2011).



Şekil 2.10. Alantolakton ve bitkisel kaynakları (Rasul ve ark., 2013)

Alantolakton, BALB/c fare BALF'teki eozinofil sayısındaki OVA kaynaklı artışı %58.9 oranında inhibe ederken, lenfosit sayısını da düşürmüştür. Alantolakton tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da inflamasyon skorunu azaltmıştır. Alantolakton, 10 μ M'dan yüksek konsantrasyonlarda degranülasyonu inhibe ederek anti-astım etkinliği göstermiştir. Alantolakton BALF ve akciğerdeki IL-5 ve IL-13 ekspresyon seviyesini

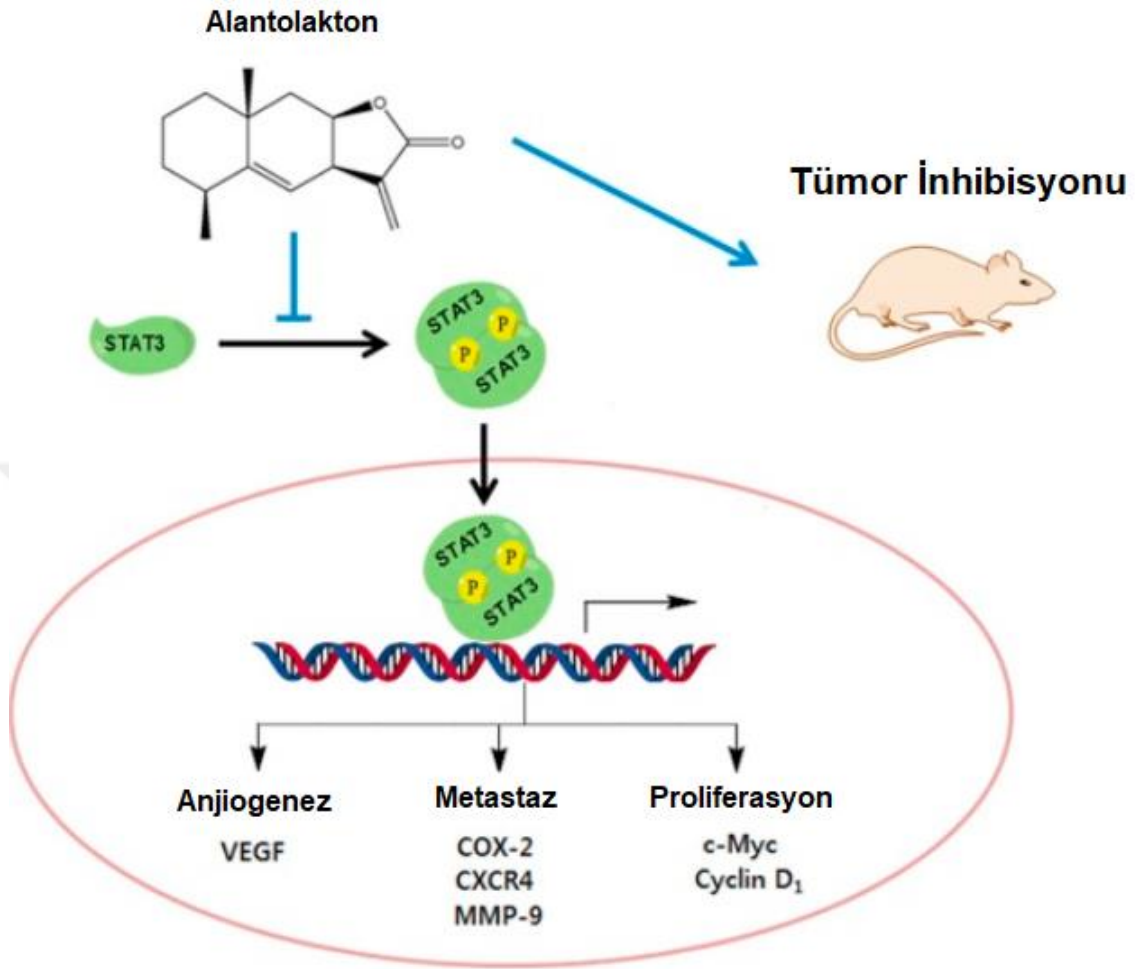
düşürmüştür (Lee ve ark., 2018). Alantolakton, LPS ile aktive edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde MyD88 sinyal yolu yoluyla NF- κ B, MAPK ve AP-1'i aşağı doğru düzenleyerek iNOS ve COX-2 ekspresyonunu inhibe edebilmektedir. Alantolaktonun, primer periton makrofajlarında LPS ile indüklenen NO, PGE2, iNOS ve COX-2 gibi pro-inflamatuar medyatörleri baskıladığı gösterilmiştir. Alantolakton, LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde NO, PGE2 ve TNF- α üretimini önemli ölçüde baskılamıştır (Chun ve ark., 2012). Alantolakton hem adipositlerde hem de adiposit-makrofaj sisteminde inflamasyonla ilişkili IL-6 ve MCP-1 mRNA seviyelerini düşürmüştür. Alantolakton, 3T3-L1 hücrelerinde p-JNK, p-ERK ve TLR4 gen ekspresyonundaki palmitata bağlı artışı doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaltmıştır. Alantolakton, adipositler ve adiposit-makrofaj ko-kültürlerinde TLR4-JNK yolağının inhibisyonu yoluyla proinflamatuvar gen ekspresyonunu düzenlemiştir (Kim ve ark., 2017a).



Şekil 2.11. Alantolakton, Sinyal yolu şeması. Alantolakton, AKT fosforilasyonunu aktive eden STAT3 fosforilasyonu ve SOCS3 ekspresyonu yoluyla IL-6 ile uyarılmış TLR4 ekspresyonunu baskılar (Kim ve ark., 2017b).

Alantolakton, ön-muamelesi SOCS3 ekspresyonunu bastırmıştır. Alantolakton, STAT3 fosforilasyonu ve SOCS3 aktivasyonu ile IL-6 ile uyarılmış TLR4 ekspresyonunu baskılar (Şekil 2.11). Bu nedenle, alantolakton, insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi kronik inflamasyonla ilişkili metabolik bozuklukların tedavisi için büyük bir potansiyele sahip

olabilir (Kim ve ark., 2017b). Alantolakton, HaCaT hücrelerinde STAT1 fosforilasyonunu bloke ederek TNF- α ve IFN- γ 'nın neden olduğu RANTES ve IL-8 üretimini baskılamaktadır. Alantolakton timüs düzenlenmiş ve aktivasyon düzenlenmiş kemokin (TARC) ve makrofaj kaynaklı kemokin (MDC) üretimini bastırmıştır (Lim ve ark., 2015). Alantolakton, üçlü negatif meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinde STAT1'in fosforilasyonunu inhibe ederken STAT5 ve STAT6 fosforilasyonunu kısmi inhibe etmiştir (Chun ve ark., 2015). Alantolakton, akciğer adenokarsinom (A549 ve NCI-H1650) (Maryam ve ark., 2017), karaciğer kanseri (HepG2) (Khan ve ark., 2013), meme kanseri (MDA-MB-231) (Chun ve ark., 2015; Cui ve ark., 2018) hücrelerinde STAT3 aktivitesini inhibe etmiştir (Şekil 2.12). Alantolakton, IL-6 veya EGF ile indüklenen STAT3 fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Alantolakton, STAT3 tirozin fosforilasyonunu seçici olarak inhibe ederken, STAT3 inhibisyonundan bağımsız olarak JNK/AP-1 sinyal yolunu da aktive etmekte ve NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonunu ise inhibe etmektedir. Alantolakton (2.5 mg/kg) uygulaması, insan meme kanseri hücreleri ksenograft tümörlerinin büyümesini önemli ölçüde bastırmıştır (Chun ve ark., 2015).



Şekil 2.12. STAT3 sinyal yolunda alantolakton aktivitesinin şematik bir modeli (Chun ve ark., 2015).

Alantolakton, ratlarda oluşturulan travmatik beyin hasarı (TBH)'nın erken döneminde IL-1 β , IL-6, PGE2 ve TNF- α pro-inflamatuar sitokinlerin seviyelerini ve total p-p65, pI κ B- α ve nükleer p65 ekspresyonunu önemli şekilde azaltmıştır. Alantolakton, NF- κ B yolunun aktivasyonunu inhibe ederek COX-2 ekspresyonunu baskılamıştır. Alantolakton'un ratlara verilmesinin, nörolojik fonksiyonları iyileştirdiği ve TBH sonrası beyin ödemi hafiflettiği gösterilmiştir. Alantolakton, MDA ve GSH seviyesi ve SOD aktivitesi ile temsil edilen TBH'deki indüklenmiş oksidatif stresi inhibe etmiştir. Böylece, alantolakton, TBH'da potansiyel bir nöroprotektif etkiye sahip olabilir (Wang ve ark., 2018). Bu çalışmalar sonucunda ALT'nin özellikle Stat3 ve IL-6 üzerinde inhibe edici etki gösterdiği bulunmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Flow sitometri cihazı (BD FACS Aria III)
2. Real-Time Cihazı (Roche LightCycler 480)
3. İnvirt Mikroskop (Leica)
4. +4°C soğutucu (Siemens)
5. -20° C Soğutucu (Siemens)
6. -80°C Soğutucu (Siemens)
7. Pipet Tabancası (Isolab)
8. Etüv (Heto/ Cell Hause 200)
9. Su banyosu (Thermal)
10. Vorteksler – Heidolph
11. Mikroskop (Nikon Labophot 2 ve Zeiss Primo Star model)
12. Santrifüj (ALC PK 110 ve Nüve NF 815)
13. Hassas terazi (Kern S 2000 ve Ohaus Pioneer)
14. Otomatik pipet
15. Clean Air Laminar Flow
16. ELISA readerlar – Promega ve Robonix
17. Hücre Kültürü İnkübatör –SANYO MCO19AIC
18. BIORAD C10000 PCR cihazı
19. Otoklav
20. Masaüstü Santrifüjler-Hettich
21. Distile su cihazı
22. pH metre
23. Buz makinesi
24. Magnetik karıştırıcı - Heidolph
25. Sıvı Nitrojen Tankı

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. Alkol (%96'lık Tekel)
2. Distile su
3. Tüplük
4. Çeşitli cam malzemeler
5. Enjektör (Hayat)
6. 10-200-1000 µl tip (Biopointe)
7. 96 kuyucuk round bottom plate
8. Falcon tüp (15 ve 50 ml) (Sarstedt)
9. Ependorf tüp (Axygen)
10. Serolojik pipet (İsolab)
11. %37'lik formaldehit solüsyonu (Merk)
12. True-Phos™ Perm Buffer (Biolegend)
13. BD falcon Cell Strainer (BD-100um)
14. anti-mouse PE anti-STAT3 Phospho (Tyr705)(Biolegend)
15. anti-human/mo e fluor 450 pAKT (s473) (eBioscience)
16. PE anti-human IL-17A (Biolegend)
17. anti-mouse pSTAT3 (Y705)-FITC (Biolegend)
18. anti-mouse FOXP3-Pacific blue (Biolegend)
19. anti-human/mo p38-APC (Biolegend)
20. anti-human/mo pERK1/2 (t202/y204) –APC (Biolegend)
21. anti human/mo pAKT s473 -e fluor 450 (Biolegend)
22. anti-mouse GM-CSF-PE (Biolegend)
23. anti-mouse IL-17A-APC (Biolegend)
24. anti-mouse IL-6 –PE (Biolegend)
25. anti-mouse IFN- γ -APC/Cy7 (Biolegend)
26. anti-mouse IL-10-PE/Cy7 (Biolegend)
27. anti-mouse NFkB p65-PE (Biolegend)
28. anti-mouse SMAD2/3-PE (Biolegend)
29. anti-mouse CD4-FITC (Biolegend)
30. PMA (Biotium)
31. FCX True stain (Biolegend)
32. Ionomycin (Sigma)

3.2. YÖNTEM

3.2.1.Sch-B ve ALT'nin Hazırlanması ve Uygulanması

Bu çalışmada kullandığımız Sch-B (Cymit BP1262) ve ALT (Biopurify BP0712) \geq %98 HPLC saflıkta ticari olarak satın alınmıştır. Sch-B ve ALT literatürdeki bilgilere uygun olarak, önce DMSO'da daha sonra 200 μ l zeytin yağı içerisinde çözdürülerek tedavi grubu farelere ve aynı miktarda 200 μ l zeytin yağı+DMSO kontrol grubu farelere i.p. olarak verilmiştir (Chen ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2017b). Sch-B ve ALT farelere MOG₃₅₋₅₅ peptidi ile aktif immünizasyon enjekte edildiği gün başlanarak bir gün arayla belirlediğimiz gruplara sırasıyla, Sch-B 60 mg/kg ve ALT 15 mg/kg olacak şekilde priming faz (7.gün) için 3 defa ve efektör faz (19. gün) için 9 defa verilmiştir. Gruplar ve gruplarda yer alan hayvan sayıları priming faz Tablo 3.1 ve ve efektör faz Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Başlangıç faz (Priming faz) için kullanılan fare grupları

Gruplar	Fareler	Hayvan sayısı	İ.P.Enjeksiyon	Enjeksiyon Sayısı
Kontrol Grubu	C57BL/6	3 adet	Zeytin yağı +DMSO	3
ALT Grubu	C57BL/6	3 adet	Zeytin yağı +DMSO+ALT	3
Sch-B Grubu	C57BL/6	3 adet	Zeytin yağı +DMSO+Sch-B	3

Tablo 3.2 Etkin faz (Efektör faz) için kullanılan fare grupları

Gruplar	Fareler	Hayvan sayısı	İ.P.Enjeksiyon	Enjeksiyon Sayısı
Kontrol Grubu	C57BL/6	16 adet	Zeytin yağı +DMSO	9
ALT Grubu	C57BL/6	14 adet	Zeytin yağı +DMSO+ALT	9
Sch-B Grubu	C57BL/6	11 adet	Zeytin yağı +DMSO+Sch-B	9

3.2.2. Farelerin İmmünizasyonu

İmmünizasyon için 24 adet 8-10 haftalık C57BL/6 erkek fare, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketinden alınmıştır. MOG₃₅₋₅₅ peptidi, C57BL/6 farelerinde, aktif immünizasyon santral inflamasyon, demiyelinizasyon ve aksonal hasar ile karakterize olan kronik MS hastalık tablosu oluşturmaktadır. Peptid, Komple Freund's Adjuvan içine 40 mg/ml inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* ekleyerek hazırlanmıştır. Daha sonra 2mg/ml MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRV VHLYRNGK) peptidi ile 1:1 oranında karıştırılmış ve emülsiyon elde edilmiştir. Emülsiyon oluşturulduktan sonra farelere abdominal flanks hizasından subkutan olacak şekilde enjeksiyon yöntemiyle 150 µl/fare olarak enjeksiyon yapılmıştır. İmmünizasyonun yapıldığı gün ve 2. gün immün sistemi aktive etmek için 200 ng/fare olarak Pertussis Toxin (i.p.) enjekte edilmiştir.

3.2.3. Farelerin Skorlanması (MS Modelinin Oluşturulması)

Farelere immünizasyon yapıldıktan 24 saat sonra klinik skorlama başlatılmıştır. Klinik skordaki değişimler MS gelişen farelerde 2.haftadan itibaren görülmeye başlamıştır. Tablo 3.3'de yer alan komplikasyonlar doğrultusunda farelere klinik skorlama yapılmıştır. Tablo 3.3. Farelerin klinik skorlaması

EAE Skoru	Farede görülen komplikasyonlar
1	Kuyruk tonisitesinin kaybı ya da kuyruk paralizisi
2	Arka bacaklardan birinde güçsüzlük ve ters çevrilen farenin dönme yetisini yitirmesi
2.5	Arka ayaktan birinde felç
3	İki arka ayakta felç
3.5	Ön tek ayakta felç
4	Ön iki ayakta felç
5	Can çekiş ile beraber ve tüm ayaklar felç

3.2.4. Fare Dokularının Elde Edilmesi

Fareler immünizasyondan sonra 7.gün (priming faz) ve 19. gün (efektör faz) servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Farelerin dalak, lenf nodu, beyin ve spinal kordları alınmıştır.

3.2.4.1. Lenf Nodundan Lenfosit Elde Edilmesi

Sakrifiye edilen fareler düz bir zemine sabitlendikten sonra karın bölgesinden kesi açılarak inguinal lenf nodları fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu içeren ependorf tüplere aktarılmıştır. Ependorf tüpler buzda bekletilmiştir. Daha sonra lenf nodları BD falcon Cell Strainer (100 µm) yardımıyla tek hücrelere ayrılmıştır. Bu hücreler thoma lamı yardımıyla sayılmıştır. Daha sonra tüm hücreler 700 µl media içerisinde çözündürülmüştür. Yapılacak boyamalarda bu hücrelerden 100 µl alınarak 96 kuyulu tabağa konulmuş ve yapılacak akım sitometri boyama prosedürü devam ettirilmiştir.

3.2.4.2. Dalaktan Lenfosit Elde Edilmesi

Sakrifiye edilen fareler düz bir zemine sabitlendikten sonra karın bölgesinden kesi açılarak dalak çıkartılıp PBS solüsyonu içeren ependorf tüplere aktarılmıştır. Ependorflar buzda bekletilmiştir. Daha sonra dalaklar hücre parçalayıcı (Cell Strainer-100 µm çapında) yardımıyla tek hücrelere ayrılmıştır. Bu hücreler içinde bulunan kırmızı kan hücrelerinden ayrıştırılması için önce 400 g'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra kırmızı kan hücre liziz (Red Cell Lysis) solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Tekrar 400 g'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantı atılmıştır. Kalan hücrelere 2 ml PBS eklenmiştir. Bu hücreler thoma lamı yardımıyla sayılmıştır. Daha sonra yaklaşık yedi yüzbin hücre 700 µl media içerisinde çözündürülmüştür. Yapılacak boyamalarda bu hücrelerden 100 µl alınarak 96 kuyulu tabağa konuldu ve yapılacak akım sitometri boyama prosedürü devam ettirilmiştir.

3.2.4.3. Beyin ve Spinal Kord Elde Edilmesi

Sakrifiye edilen fareler düz bir zemine sabitlendikten sonra karın bölgesinden kesi açılarak beyin ve spinal kord çıkartılmıştır. Spinal kordun bir kısmı Luxol Fast Blue boyaması için %4'lük formaldehitin içine alındı ve saklanmıştır. Kalan spinal kord ve beyin dokuları PBS içeren 15 ml'lik falkon tüplere toplanmıştır. Falkonlar buzda bekletilmiştir.

3.2.4.3.1. Beyin ve Spinal Kord'tan Lenfosit Hücresi Elde Edilmesi

PBS içindeki beyin ve spinal kord dokuları petri içine alınmıştır. 2.5 mg/ml kollojenaz içeren RPMI 1640 medyumundan 1ml alınıp 10 cm'lik kültür tabağına aktarıldı ve organlar bisturi ile 1 mm'lik parçalara ayrılmıştır. Bu parçalanmış beyin ve spinal kord karışımı parçalama solüsyonu içine alınmıştır. Bu karışım 37 °C'deki 300 rpm hızda 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra bu karışım içindeki dokular hücre parçalayıcı (100 µm) yardımıyla tek hücrelere ayrılmıştır. Hücreler 400 g'de 7 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılmıştır. Bu hücrelerden lenfositleri ayırmak için gradiyan hücre ayırma işlemi yapılmıştır. Gradiyan hücre ayırma işlemi için hücrelerin üzerine 5 ml %36'lık Percoll solüsyonu eklenmiştir. 5 ml %90'lık percoll başka bir falkon tüpe eklenmiştir. %36'lık percoll hücre karışımı yavaşça diğer tüpe aktarılmıştır. Bu karışım 30 dakika 500 g'de santrifüj edilmiştir. Ara faz dikkatli bir şekilde başka bir tüpe alınmıştır. Bu hücrelere 5 ml PBS eklendi ve 400 g'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Lenfositler toplanıp %10 FBS içeren RPMI 1640 içinde çözüldülmüştür. Daha sonra tüm hücreler 700 µl media içerisinde çözdürülmüştür. Yapılacak boyamalarda bu hücrelerden 100 µl alınarak 96 kuyulu tabağa konuldu ve yapılacak akım sitometri boyama prosedürü devam ettirildi.

3.2.4.3.1.1. Parçalama solüsyonu hazırlanması

Hücre kültüründe kullanıma hazır RPMI1640 medyumuna içine 2.5 mg/ml olacak şekilde kollejenaz eklenmiştir. Daha sonra içine 5 ug/ml DNaz eklenmiştir. Bu solüsyon 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.4.3.1.2. Gradiyan solüsyonu hazırlanması

Beyin ve spinal kord dokularından gradiyan santrifüj yöntemiyle lenfosit hücrelerini elde etmek için kullanılan solüsyonlar aşağıda belirtildiği oranlarda hazırlanmıştır.

5 ml %36'lık percoll hazırlamak için: 1.8 ml percoll + 500 µl 10XPBS + 2.7 ml dH₂O

5 ml %90'lık percoll hazırlamak için: 4.5 ml percoll + 500 µl 10XPBS

3.2.5. Beyin, Spinal Kord, Dalak ve İnguinal Lenf Nodundaki Lenfositlerin Kantifiye Edilmesi

Beyin, spinal kord, inguinal lenf nodu ve dalaktan elde edilen lenfositler 96 kuyulu tabaklara ekilmiştir. Hücreler, PMA (50 ng/ml), ionomycin (1 µg/ml) ve golgi stop (1µl/ml) üçlü karışımı ile 37 °C'de 4 saat inkübatörde uyarılmıştır. Ardından hücre içi sitokin boyaması ile T helper hücreleri tipleri FITC-CD4, APC-IL-17A, APC/Cy7-IFN-γ ve PE-GM-CSF fare antikorları ile akım sitometri cihazı kullanılarak inguinal lenf nodu ve dalaktaki lenfositler kantifiye edilmiştir.

3.2.5.1. Merkezi sinir sistemi ve periferdeki Th hücrelerinin miktarının belirlenmesi ve çeşitli sitokin üretimi, transkripsiyon faktörleri ve fosforilasyonlarının belirlenmesi

3.2.5.1.1. Th hücrelerinin miktarının belirlenmesi

Th hücre miktarlarını belirlemek için yukarıda belirtilen şekilde merkezi sinir sistemi ve lenf nodlarından elde edilen hücreler 96-kuyulu tabaklara alınıp %10 FBS ve RPMI 1640 içeren kültür medyumunda PMA üçlü karışımı ile 4 saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde uyarılmıştır. Buz üzerine alınan kültür tabağındaki örnekler 5 dk 1µg/ml anti-mouse CD16/CD32 ile muamele edilip Fc reseptörleri bloke edildi, ardından FITC-CD4 ile 15 dakika buz üzerinde yüzey boyamasına tabi tutuldu. 1500 rpm'de 3 dakika santrifüjden sonra hücreler boyama solüsyonu ile (%2 FBS 1XPBS) iki defa yıkanıp 100 µl Fix/Perm Buffer içinde çözülüp karanlıkta 20 dakika oda sıcaklığında (20°C'de) fikse ve permabilize edildi, ardından 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip 2 kez de Perm Buffer ile yıkanıp santrifüj edilmiştir. Daha sonra 100 µl Perm buffer içinde seyreltilen

IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE antikorları eklenip karanlıkta 30 dakika oda sıcaklığında boyanıp, ardından 2 kez boyama solüsyonu ile yıkanıp akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.2.5.1.2. Th hücrelerinin çeşitli sitokin üretimi

CD4+ T hücrelerinin ürettikleri bazı sitokinlerin miktarlarını belirlemek için yukarıda belirtilen şekilde merkezi sinir sistemi ve lenf nodlarından elde edilen hücreler 96-kuyulu tabaklara alınıp %10 FBS ve RPMI 1640 içeren kültür medyumunda PMA üçlü karışımı ile 4 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde uyarılmıştır. Buz üzerine alınan kültür tabağındaki örnekler 5 dakika 1 μ g/ml anti-mouse CD16/CD32 ile muamele edilip Fc reseptörleri bloke edildi, ardından FITC-CD4 ile 15 dk buz üzerinde yüzey boyamasına tabi tutuldu. 1500rpm de 3 dk santrifüjden sonra hücreler boyama solüsyonu ile (%2 FBS 1X PBS) iki defa yıkanıp 100 μ l Fix/Perm Buffer içinde çözülüp karanlıkta 20 dakika oda sıcaklığında (20°C'de) fikse ve permabilize edildi, ardından 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip, 2 kez de Perm Buffer ile yıkanıp santrifüj edilmiştir. Daha sonra 100 μ l Perm buffer içinde seyreltilen PE-IL-6, PE-IL-22, PE cy7-IL-10 antikorları eklenip karanlıkta 30 dakika oda sıcaklığında boyanıp, ardından 2 kez boyama solüsyonu ile yıkanıp akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.2.5.1.3. Foxp3 transkripsiyon faktörü

CD4+ T hücrelerinin transkripsiyon faktörlerinin ve miktarlarını belirlemek için yukarıda belirtilen şekilde merkezi sinir sistemi ve lenf nodlarından elde edilen hücreler 96-kuyulu tabaklara alınıp %10 FBS ve RPMI 1640 içeren kültür medyumunda PMA üçlü karışımı ile 4 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde uyarılmıştır. Buz üzerine alınan kültür tabağındaki örnekler 5 dakika 1 μ g/ml anti-mouse CD16/CD32 ile muamele edilip Fc reseptörleri bloke edildi, ardından FITC-CD4 ile 15 dk buz üzerinde yüzey boyamasına tabi tutulmuştur. 1500 rpm de 3 dakika santrifüjden sonra hücreler boyama solüsyonu ile (%2 FBS 1X PBS) iki defa yıkanıp 100 μ l True nuclear 1XFix Buffer (Biolegend) içinde çözülüp karanlıkta 60 dakika oda sıcaklığında fikse ve permabilize edildi, ardından 1500 rpm de 3 dk santrifüj edilip 2 kez de 1XPerm/Wash Buffer ile yıkanıp santrifüj edilmiştir. Daha sonra 100 μ l 1X Perm/Wash buffer içinde seyreltilen *Pacific Blue-Foxp3* antikorunu

eklenip 30 dakika oda sıcaklığında boyanıp, ardından 2 kez boyama solüsyonu ile yıkanıp akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.2.5.1.4. Th hücrelerinin fosforilasyonu

Fosforilasyonları ve miktarlarını belirlemek için yukarıda belirtilen şekilde merkezi sinir sistemi ve lenf nodlarından elde edilen hücreler 96-kuyulu tabaklara alınıp %10 FBS ve RPMI 1640 içeren kültür medyumunda %4'lük PFA ile 15 dakika 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde uyarılmıştır. 1500 rpm'de 3 dakika santrifüjden sonra hücreler boyama solüsyonu ile (%2 FBS 1X PBS) iki defa yıkanıp 100 µL true-phos perm solüsyonu (Biolegend) içinde çözülüp karanlıkta 60 dakika -20 °C'de bekletilip, ardından 1000g de 5 dakika santrifüj edilip 2 kez de boyama solüsyonu ile yıkanıp santrifüj edilmiştir. Daha sonra 100 µl boyama solüsyonu içinde seyreltilen p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p- Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* antikorları eklenip 30 dakika oda sıcaklığında boyanıp, ardından 2 kez boyama solüsyonu ile yıkanıp akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.2.6.Histolojik Yöntemler

3.2.6.1.Doku Takibi

Farelerden alınan dokular, %4 fosfat tamponlu paraformaldehit (PFA) (pH 7.4) içerisinde 24 saat bekletilerek tespit edilmiştir. Tespit aşaması bittikten sonra dokular bir gece boyunca PBS içerisinde yıkama yapılarak tespit solusyonu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra rutin histolojik takip işlemleri uygulanmıştır. Rutin doku takibinde öncelikle yükselen derecelerdeki alkol serisi %60 alkolden başlanarak, kontrollü olarak, ortalama 1 saat süreyle ve sırasıyla %70, %80, %96, %100 (I), %100 (II) ve %100 (III) şeklinde uygulanmıştır. Bu aşamayı takiben şeffaflandırma işlemi yapılmıştır. Ksilol I, ksilol II ve ksilol III'de 15'er dk bekletilmiştir. Daha sonra, doku örnekleri 30 dk parafinde bekletilip erimiş parafin blokların içerisine gömülmüştür. Parafin bloklardan, mikrotomda 5µm kalınlığında kesitler poly-L-lysin'li lamlara alınmıştır.

3.2.6.2.Luxol Fast Blue Myelin Boyama

Fikse edilmiş dokularda ise miyelinin durumu luxol fast blue ile gösterilir. Bu boya normal miyeline kuvvetle bağlanır, miyelin yıkımı olan alanlar ise boya almazlar. Luxol fast blue, alkolde çözünebilen ve miyelin kılıfının lipoproteinlerine bağlanma özelliği gösteren bir bakır ftalosiyenin boyasıdır. Luxol fast blue boyamada miyelin lifleri mavi, sinir hücreleri mor görünür. Sakrifiye edilen farelerden alınan spinal kordlar parafine gömülmüştür ve daha sonra 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Spinal kord kesitleri deparafinize edilmiştir. Daha sonra dokular etil alkol serisinden (%99-%95-%70) geçirilmiştir. Kesitler Luxol fast blue solüsyonu içinde 56 °C'de bir gece bekletilmiştir. %95'lik etil alkol içinde çalkalandıktan sonra distile suda yıkama işlemi yapılmıştır. Lityum karbonat solüsyonu içinde 30 saniye differansiye edilmiştir. Differansiye işlemine %70'lik etil alkolde 30 saniye devam edilmiştir. Daha sonra diferansiasyon aşamasını durdurmak için kesitler distile suda bekletilmiştir. Bu aşamada substantia grisea ve substantia alba kısımlarının ayırımı görülmüştür. Kesitler Cresyl violet solüsyonunda 30 saniye bekletilmiştir. Distile su içerisinde yıkama işlemi yapılmıştır. %95'lik etil alkolde 2 defa çalkalanmıştır. %100 etil alkolden geçirilmiştir. Kesitler ksilolden geçirilmiştir. Kesitler entellan kullanılarak lamelle kapatıldıktan sonra mikroskopik incelemeler yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi: Miyelin kısımlar mavi renkte, nöronlar ve nisl cisimcikleri mor renkte boyanmasına göre yapılmıştır.

3.2.10. Verilerin İstatistiksel analizi

Elde edilen sonuçlar, unpaired t testi yapılarak anlamlılıkları değerlendirilmiştir. C57BL/6 fareleri ile yapılan skorlama çalışmalarında istatistik analiz yöntemi olarak unpaired t testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ değerinden küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Akım sitometri sonuçları Flowjo ve Graphpad programı yardımıyla değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu bölümde MS fare modelinde kullandığımız Sch-B ve ALT'nin sonuçları 4.1 ve 4.2 olmak üzere ayrı ayrı verilmiştir.

4.1.Schisandrin B'nin MS'e Etkisi

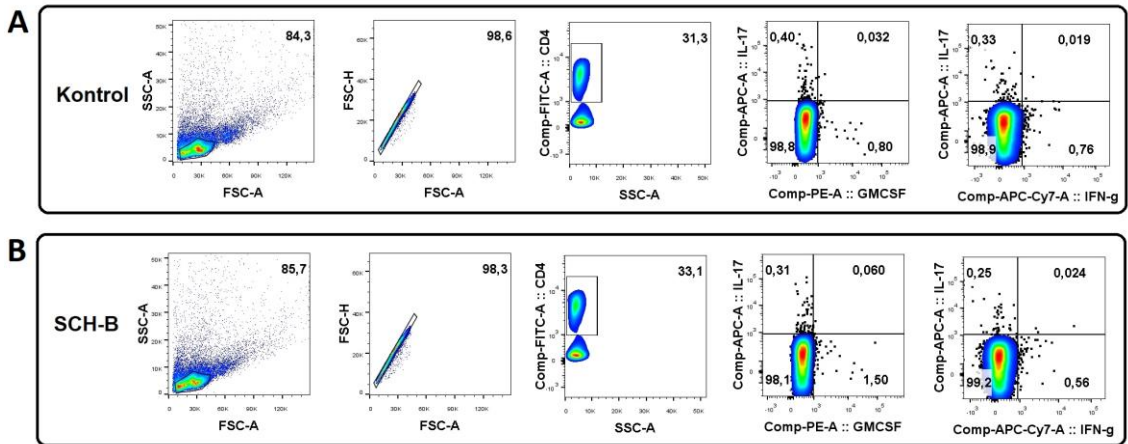
MS hastalığının sebebi olan otoreaktif T hücrelerinin neden oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Otoreaktif T hücrelerinin aktive olup drene lenf nodlarına gelip buradan MSS'e gitmektedir. MSS'e infiltre olan T hücreleri, MS oluşmasına sebep olmaktadır.

4.1.1. Schisandrin B'nin Priminge etkisi

Bu çalışmada drene lenf noduna toplanan T hücrelerine Sch-B'nin etkisinin olup olmadığı test edilmiştir. Aynı zamanda bu dönemde dalaktaki T hücrelerine etkisi de test edildi. İmmünizasyonun 7. günü 3 doz ve 60 mg/kg Sch-B'nin i.p. olarak verilen gruplardan 3'er adet fare servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Farelerin inguinal lenf nodları (LN) ve dalakları (DLK) toplandı ve daha sonra akım sitometri ile analiz edilmiştir.

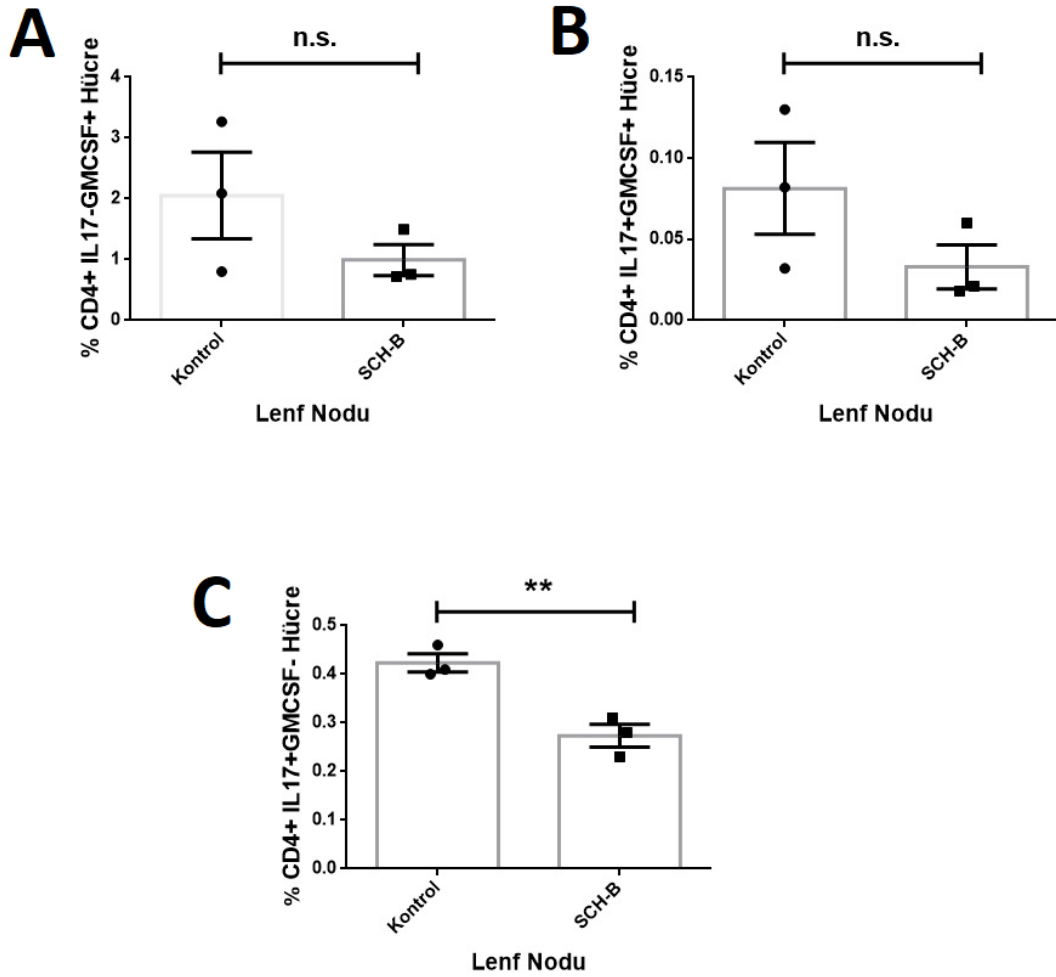
4.1.1.1. Schisandrin B'nin İnguinal Lenf Noduna Etkisi

LN'dan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.1'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.1. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

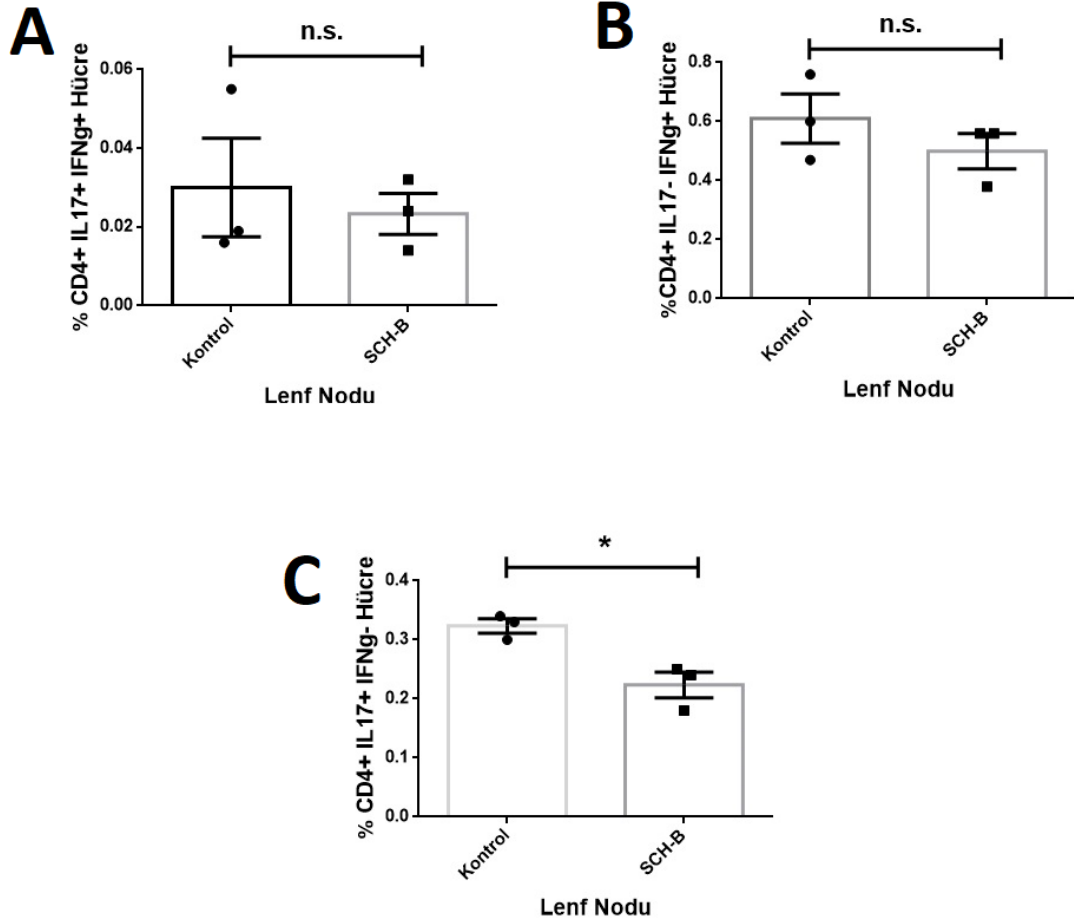
LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Şekil 4.2.A'da CD4+IL-17-GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %2,06 ve Sch-B grubunun ise %0,99 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.2.B'de CD4+IL-17+GM-CSF- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,082 ve Sch-B grubunun ise %0,033 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.2.C'de CD4+IL-17+GM-CSF- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,43 ve Sch-B grubunun ise %0,27'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.007$).



Şekil 4.2. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17-GM-CSF+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17+GM-CSF+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+GM-CSF- hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ** $p < 0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

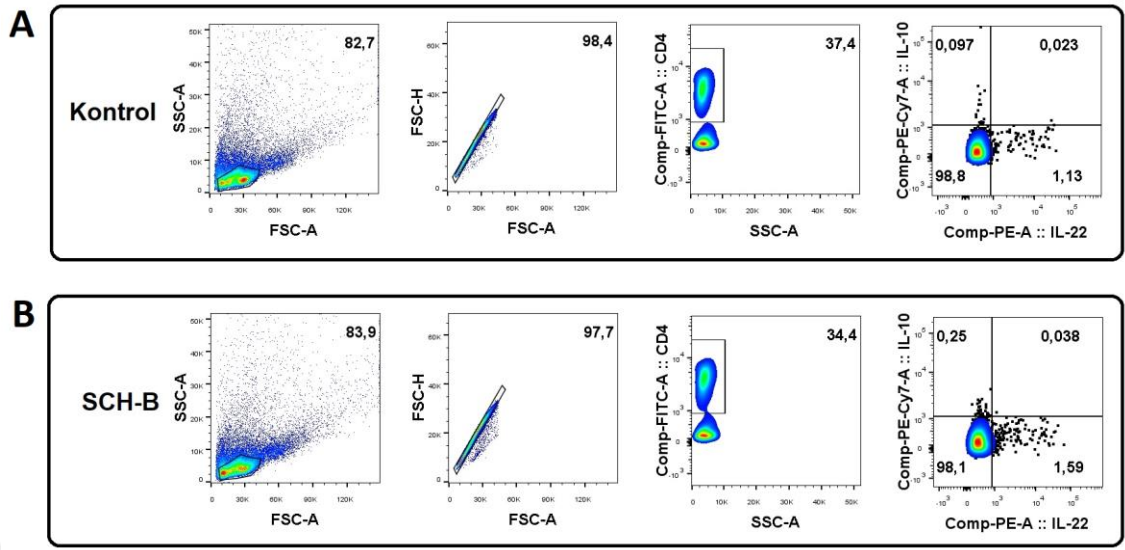
LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Şekil 4.3.A'da CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,62 ve Sch-B grubunun ise %0,5 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.3.B'de CD4+IL-17+IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,031 ve Sch-B grubunun ise %0,023 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.3.C’de CD4+IL-17+ IFN- γ - hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,33 ve Sch-B grubunun ise %0,22’dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.016$).



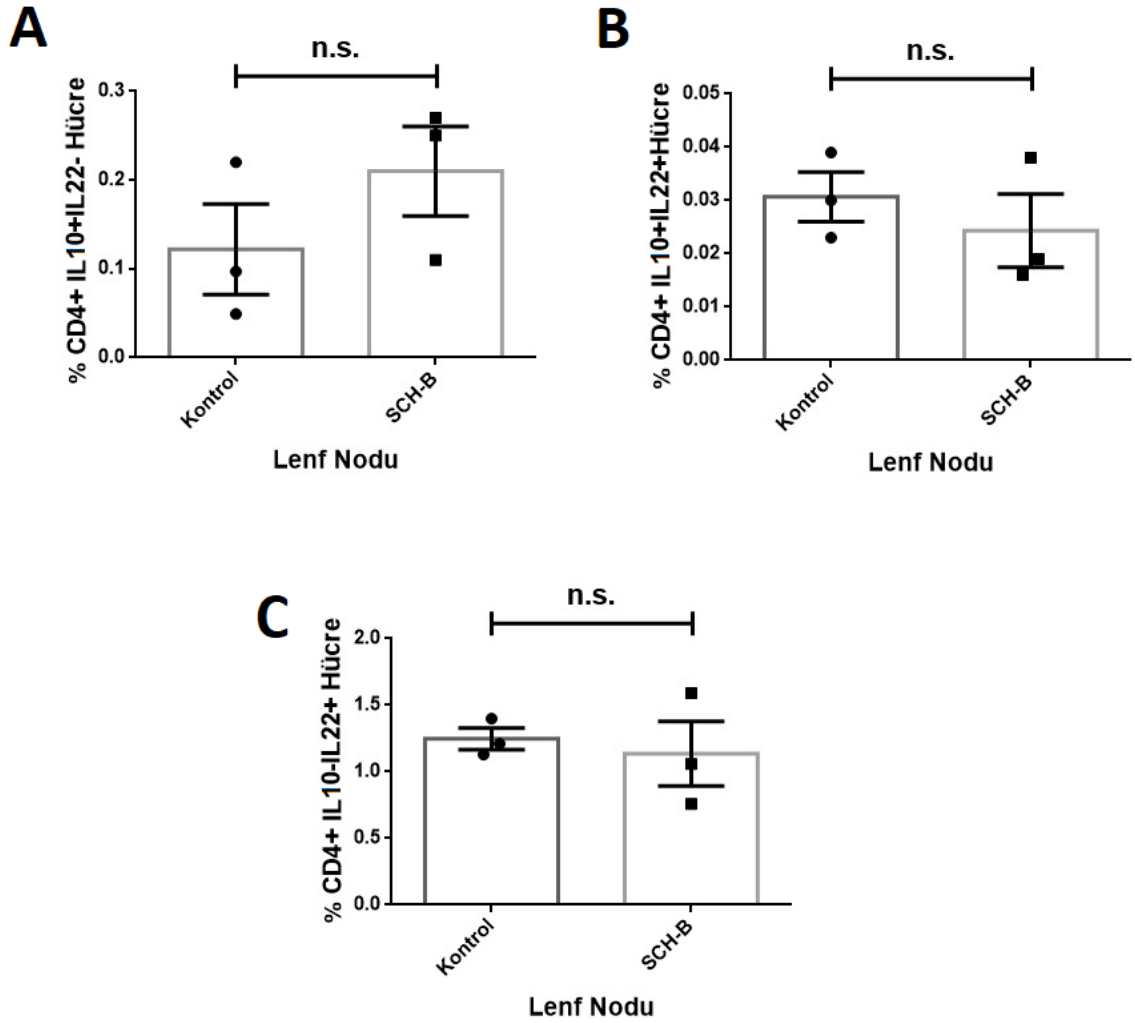
Şekil 4.3. LN’den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p<0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN’den elde edilen lökositler, CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.4. A ve B’de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.4. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

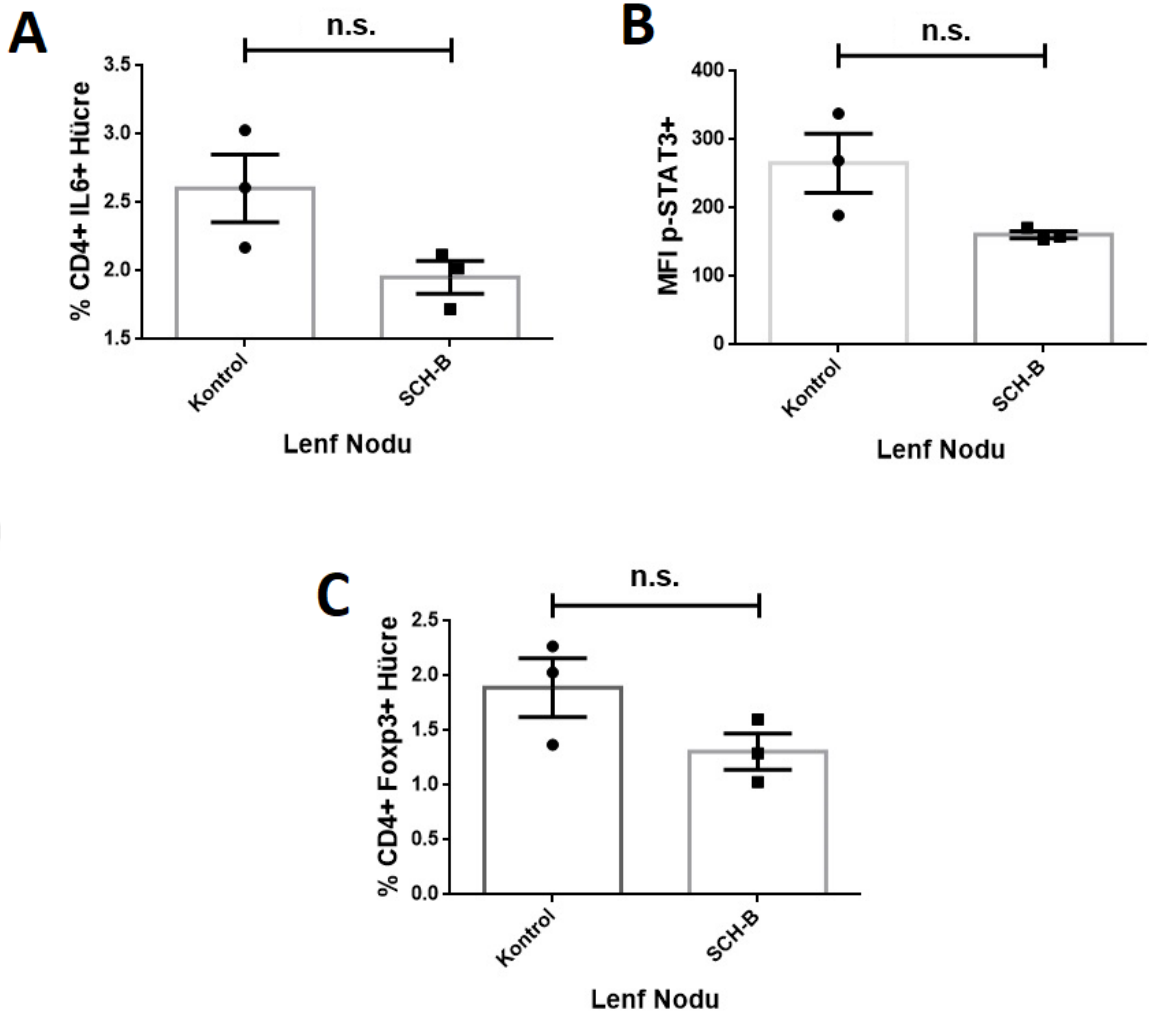
LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Şekil 4.5.A'da CD4+IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,12 ve Sch-B grubunun ise %0,21 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.5.B'de CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,030 ve Sch-B grubunun ise %0,025 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.5.C'de CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,24 ve Sch-B grubunun ise %1,14 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



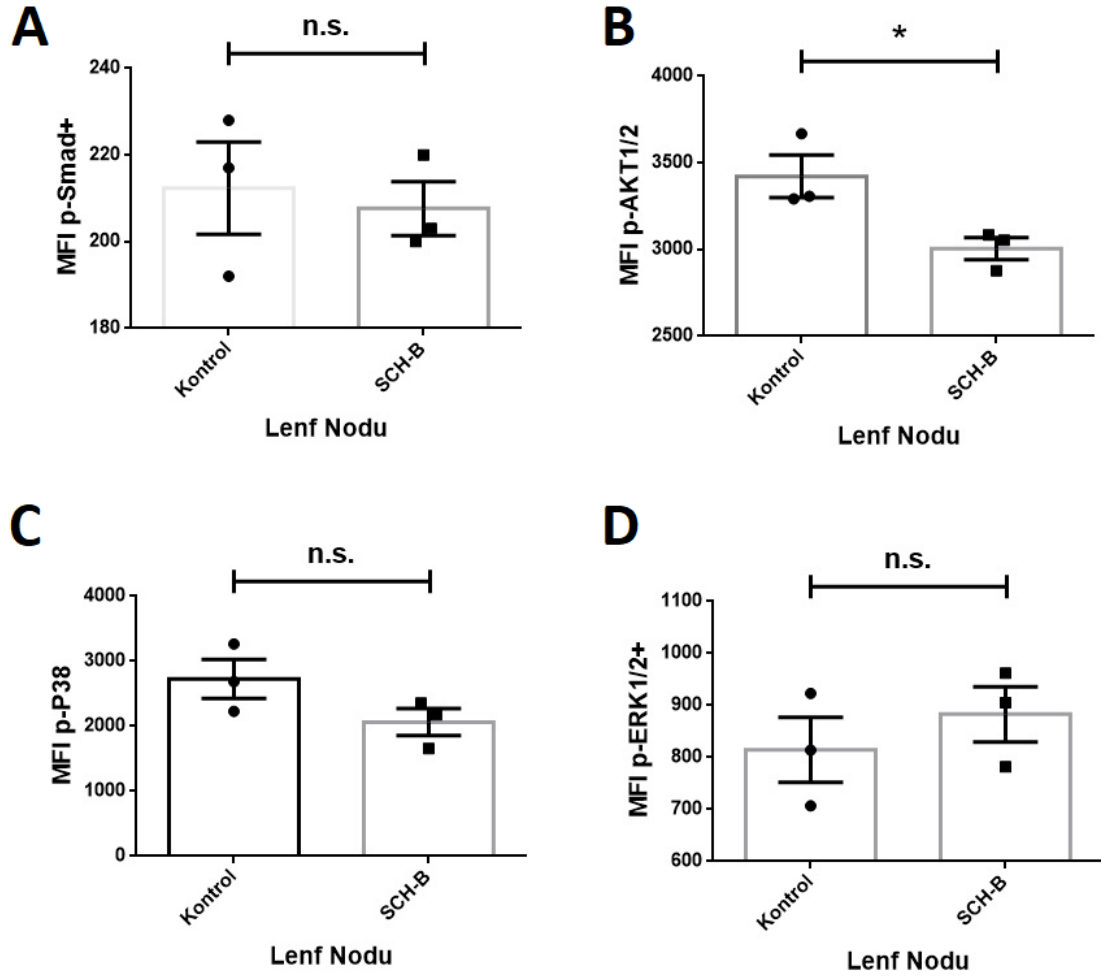
Şekil 4.5. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerinin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'daki lökositler CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE, p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Şekil 4.6.A'da CD4+IL-6+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %2,61 ve Sch-B grubunun ise %1,95 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.6.B'de hücrelerin fosfo-STAT3'ün ortalama flöresan yoğunluğu (MFI-Mean Fluorescence Intensity) kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 266 ve Sch-B grubunun

ise 161 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.6.C’de CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,89 ve Sch-B grubunun ise %1,31 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.7.A’da hücrelerin p-Smad2/3’ün ortalama flöresan yoğunluğu, kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 212 ve Sch-B grubunun ise 208 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.7.B’de hücrelerin p-Akt1/2’in ortalama flöresan yoğunluğu, kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 3422 ve Sch-B grubunun ise 3005’tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.039$). Şekil 4.7.C’de hücrelerin p-P38’in ortalama flöresan yoğunluğu, kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 2727 ve Sch-B grubunun ise 2062 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.7.D’de hücrelerin p-ERK1/2’in ortalama flöresan yoğunluğu, kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 814 ve Sch-B grubunun ise 883 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



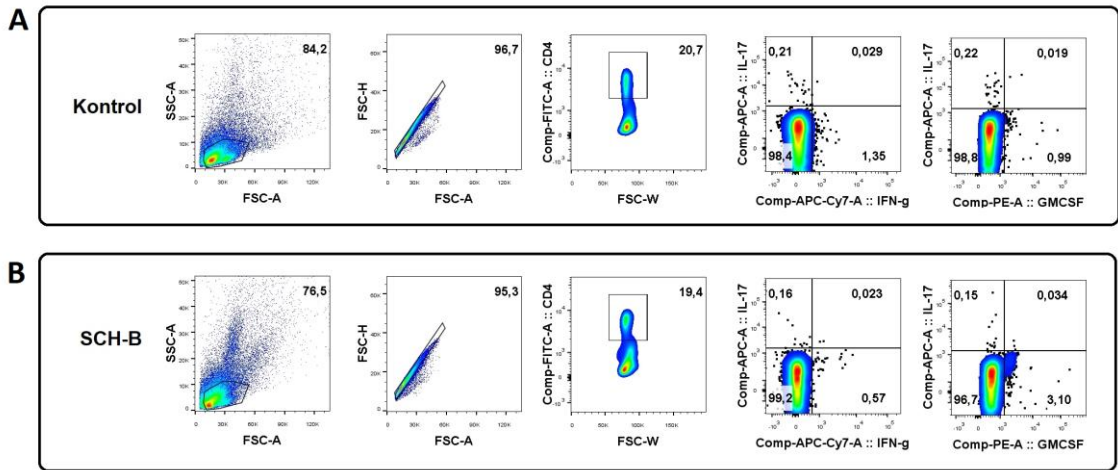
Şekil 4.6. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue* ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-6+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



Şekil 4.7. LN'dan elde edilen lökositlerin p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-Smad ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.1.1.2. Schisandrin B'nin Dalağa Etkisi

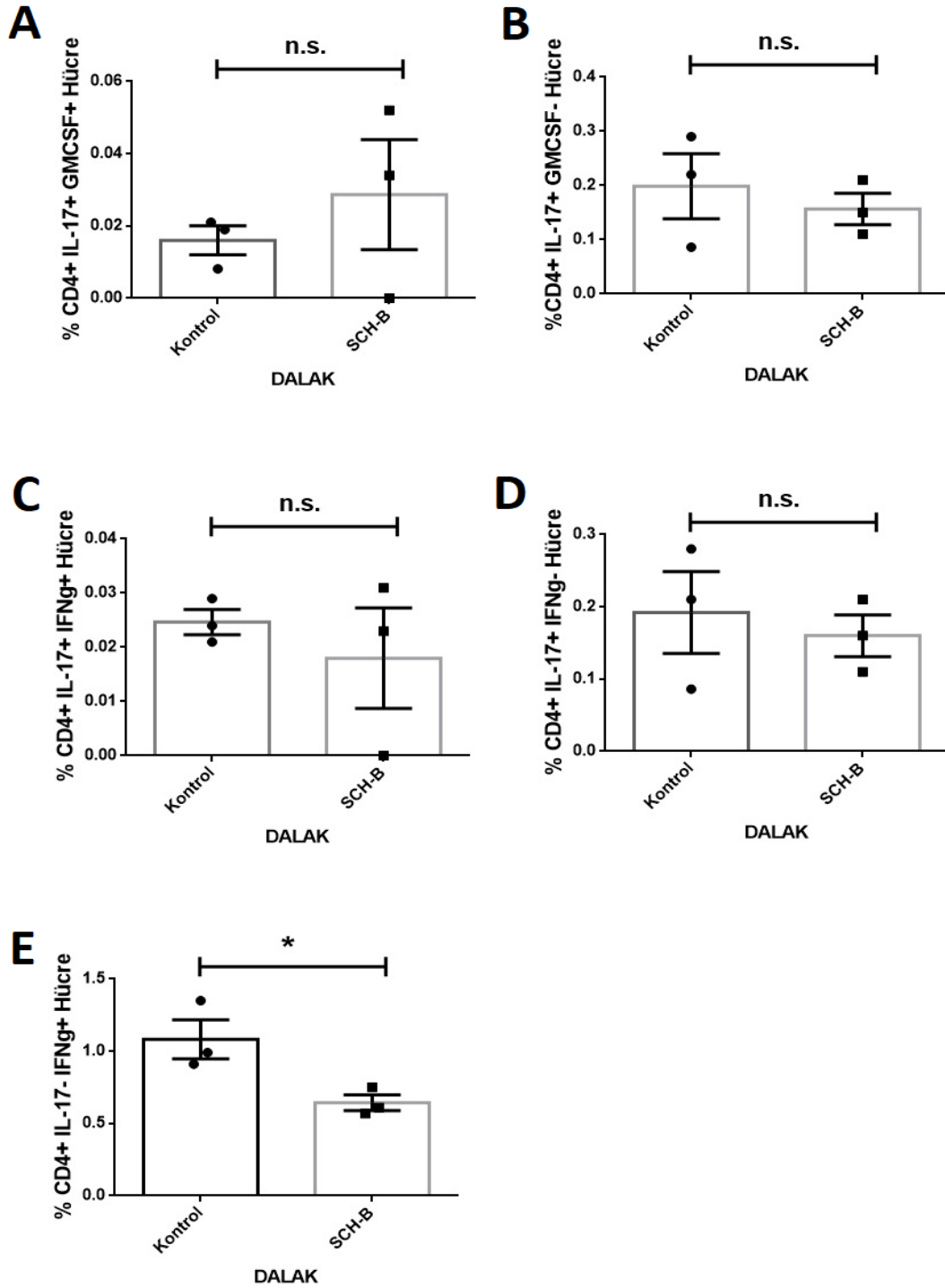
DLK'tan elde edilen lökositler, CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.8'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.8. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Şekil 4.9.A'da CD4+IL-17+GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,017 ve Sch-B grubunun ise %0,028 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.9.B'de CD4+IL-17+GM-CSF- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,20 ve Sch-B grubunun ise %0,15 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.9.C'de CD4+IL-17+ IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,025 ve Sch-B grubunun ise %0,018 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.9.D'de CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,19 ve Sch-B grubunun ise %0,16 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.9.E'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması % 1,09 ve Sch-B grubunun ise % 0,64'tür ve iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur

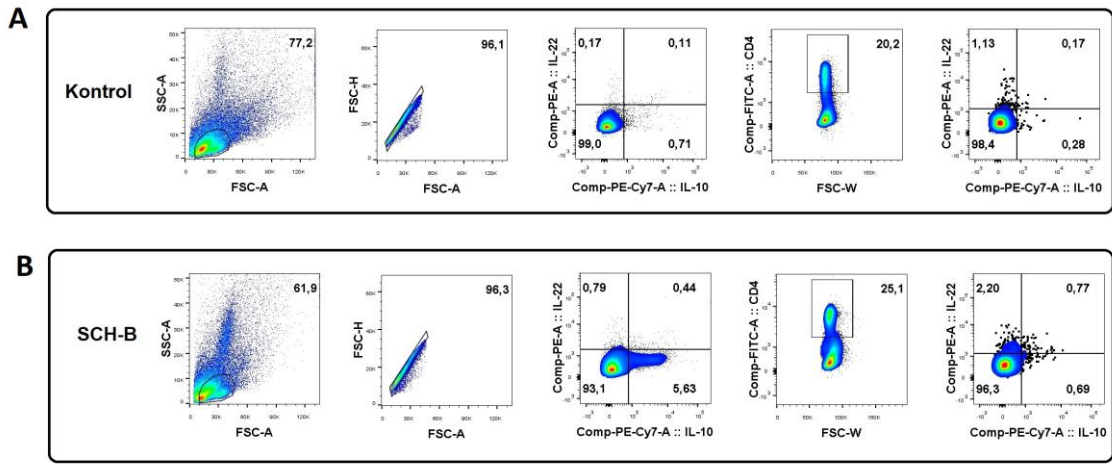
(p=0.039).



Şekil 4.9. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+GM-CSF+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17+GM-CSF- hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C)

CD4+IL-17+IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, E) CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p<0.05$; ns; İstatistiksel olarak anlamlı değil.

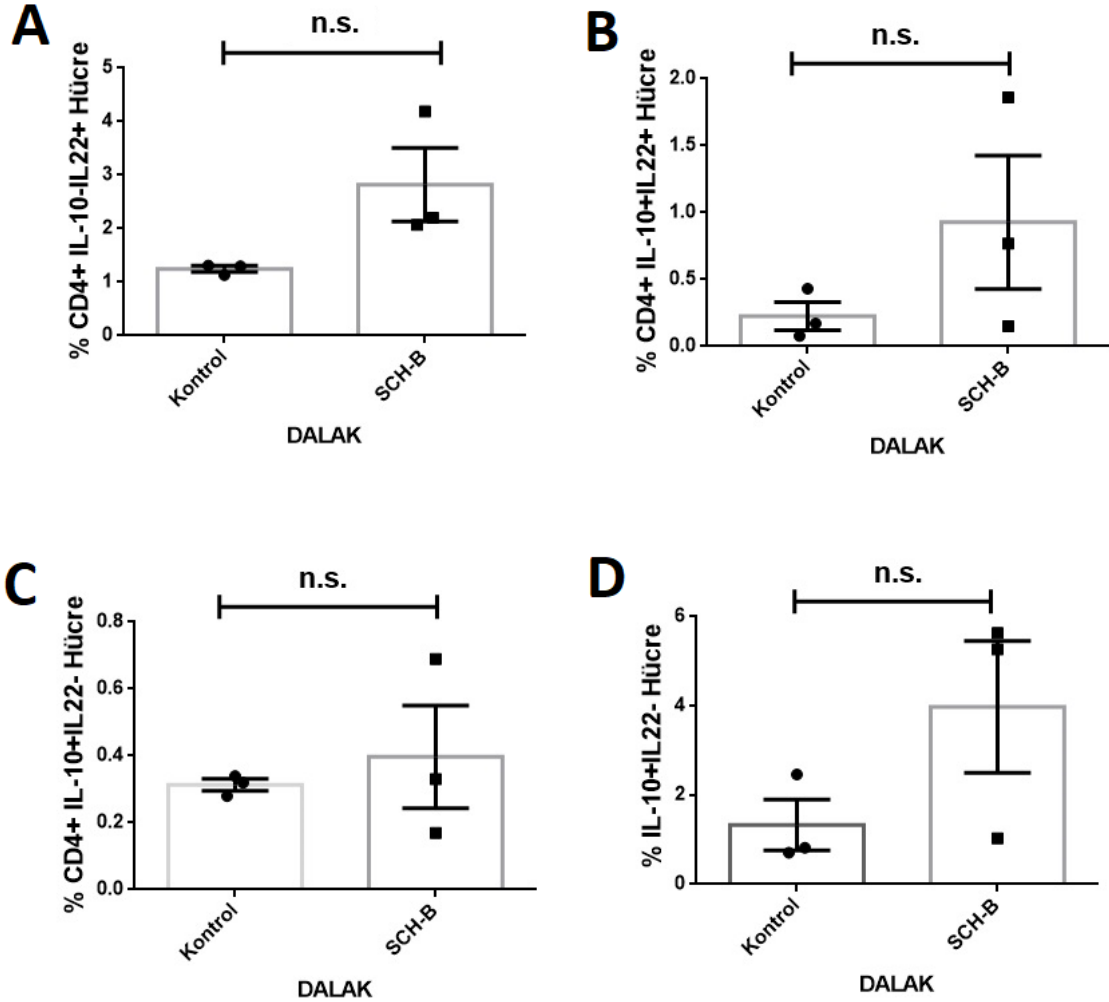
DLK'tan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.10'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.10. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Şekil 4.11.A'da CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,24 ve Sch-B grubunun ise %2,82 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.11.B'de CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,22 ve Sch-B grubunun ise %0,93 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.11.C'de CD4+IL-10-IL-22- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,31 ve Sch-B grubunun ise %0,40 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

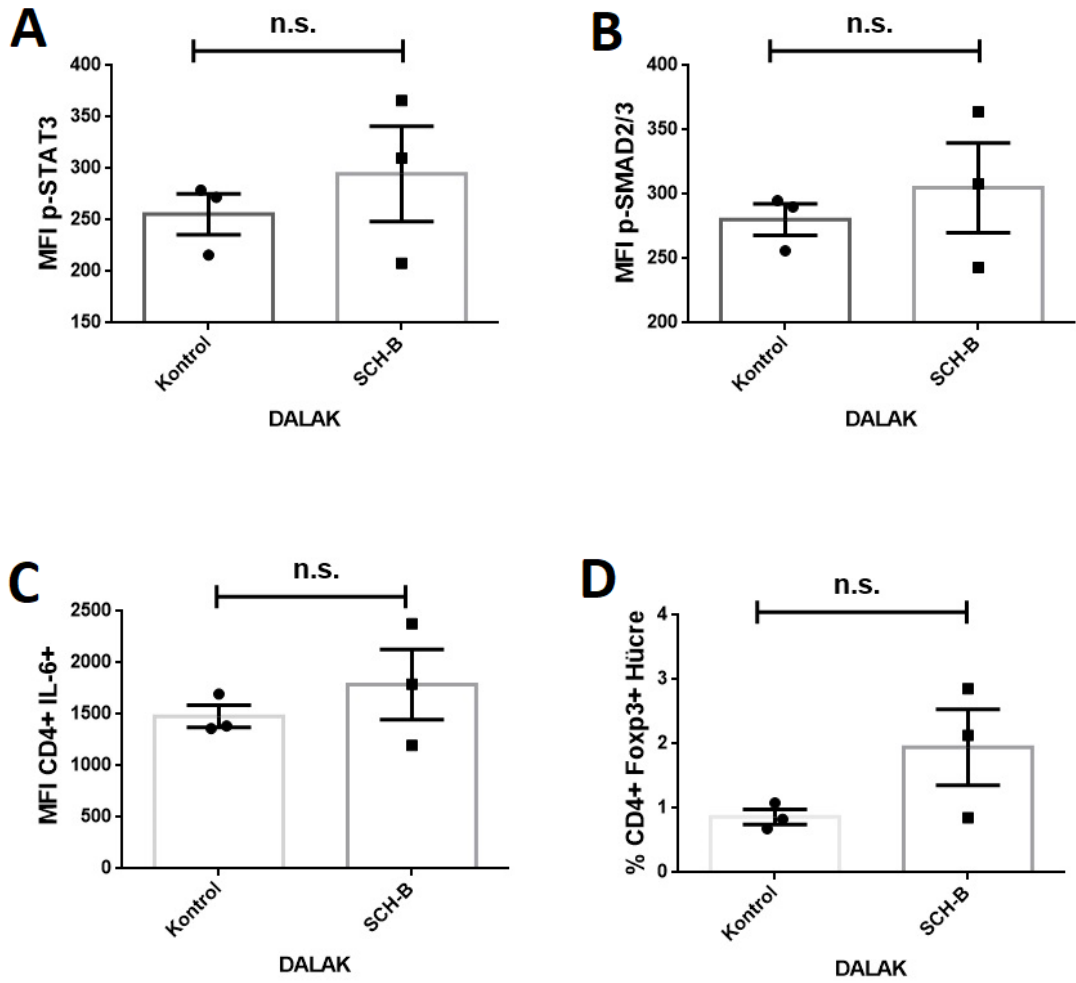
görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.11.D’de IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,33 ve Sch-B grubunun ise %3,98 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



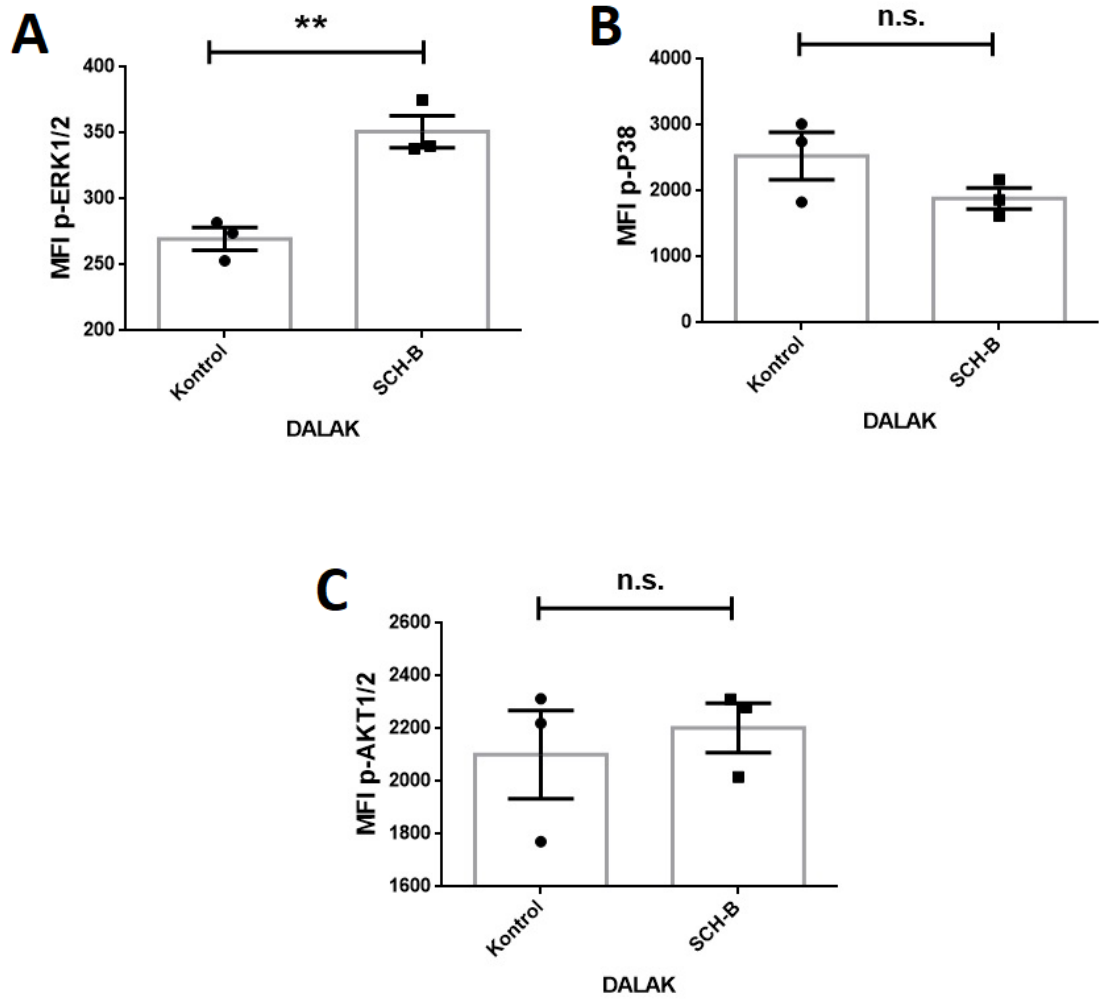
Şekil 4.11 DLK’tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

DLK’taki lökositler CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE, p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p- Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil

4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Şekil 4.12.A'da lökosit hücrelerinde p-Stat3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 256 ve Sch-B grubunun ise 294 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.12.B'de lökosit hücrelerinde p-Smad2/3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 281 ve Sch-B grubunun ise 305 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.12.C'de CD4+ T hücrelerinde IL-6 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 1481 ve Sch-B grubunun ise 1789 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.12.D'de CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,86 ve Sch-B grubunun ise %1,95 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.13.A'da hücrelerin p-ERK1/2'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 269 ve Sch-B grubunun ise 351'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.005$). Şekil 4.13.B'de hücrelerin p-P38'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 2532 ve Sch-B grubunun ise 1885 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.13C'de hücrelerin p-Akt1/2'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 2100 ve Sch-B grubunun ise 2200 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.12. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue*, p-Smad2/3-PE ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+T hücrelerinin IL-6+ ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



Şekil 4.13. DLK'tan elde edilen lökositlerin p-P38-APC, p-ERK1/2-APC ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ** $p < 0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

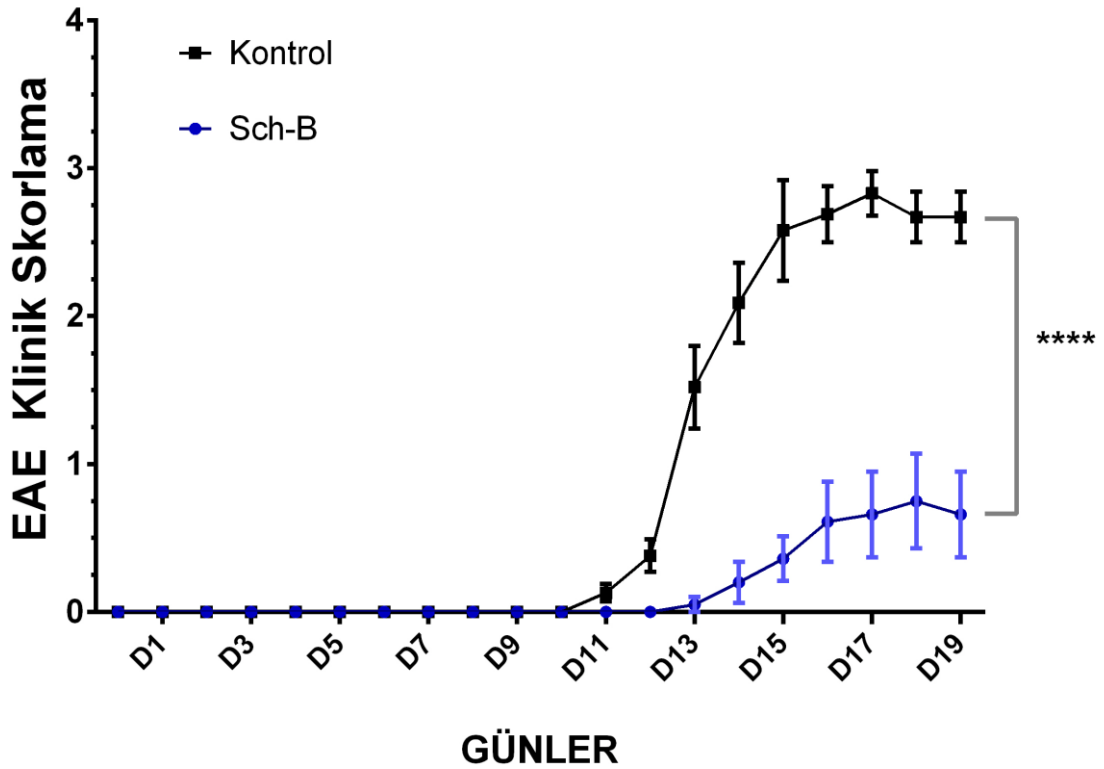
4.1.2. Schisandrin B'nin efektör fazda etkisi

Bu çalışmada Sch-B'nin efektör fazda etkinliğini anlamak için MOG₃₅₋₅₅ peptidi ile immünize edilmiş C57BL6 farelerine i.p. olarak gün aşırı 9 doz Sch-B verilmiştir. 10.gün MS klinik skorları ortaya çıkmaya başlamıştır. 17-19. Günlerde klinik skor pik

yapmıştır (Şekil4.14). Sch-B'nin etkinliğini görebilmek için fareler 19. gün servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilerek incelenmiştir.

4.1.2.1. Schisandrin B'nin MS klinik Skorlaması

C57BL6 farelerin immünizasyonundan sonra MS klinik skorlanmasına başlanmıştır. Kontrol grubunda 16 ve Sch-B grubunda ise 11 fare her gün klinik olarak skorlanmıştır.

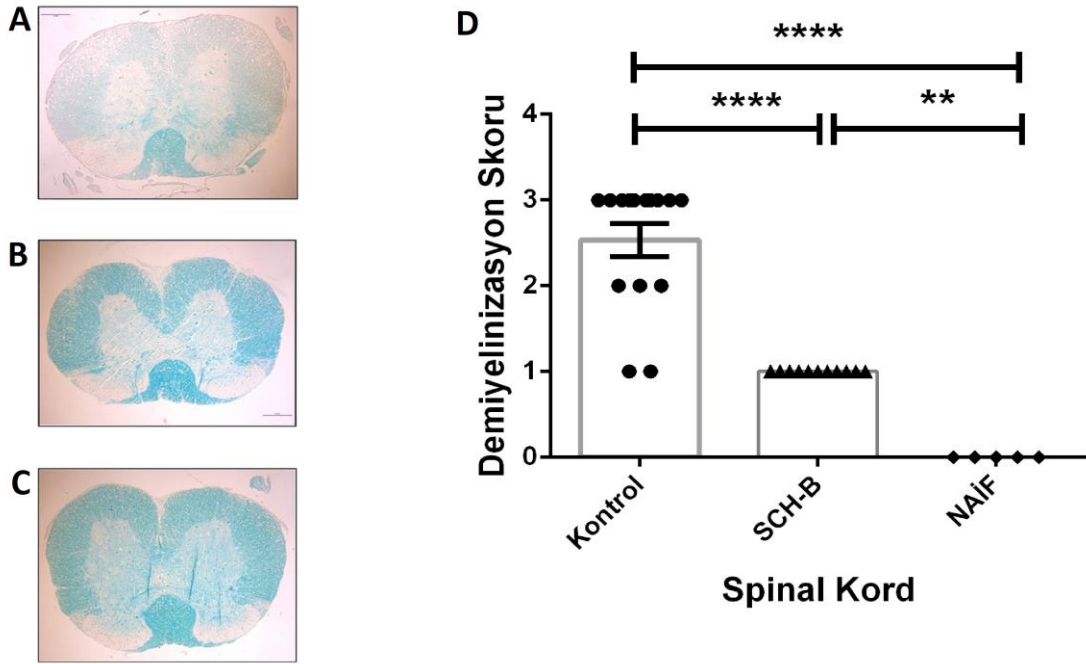


Şekil 4.14. C57BL6 farelerinin MS klinik skorlaması. Kontrol (n:16) ve Sch-B (n:11) gruplarının karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis), Sch-B (Schisandrin B), D (Gün).

4.1.2.2. Schisandrin B'nin Demiyelinizasyona Etkisi

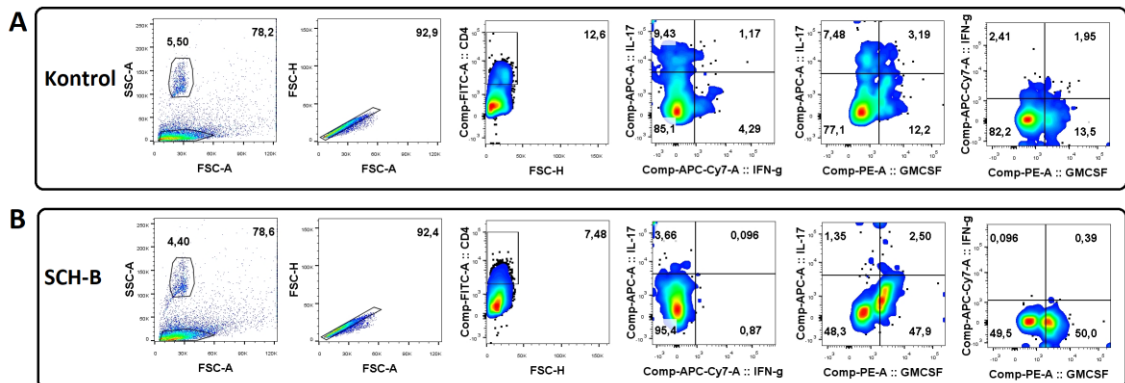
C57BL6 farelerinin immünizasyondan 19 gün sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Daha sonra farelerin spinal kordları çıkarılıp luxol fast blue ile boyanmıştır. Daha sonra skorlaması yapılmıştır (Şekil 4.15). Luxol fast blue miyelinleri maviye boyamaktadır. Şekil 4.15.A'da kontrol grubu farenin spinal kordunda meydana

gelen demiyelinizasyon görülmektedir. Şekil 4.15.B'de Sch-B grubu farelerin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon görülmektedir. Şekil 4.15.C'de Naif (Sağlıklı fare) grubu farelerin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon görülmektedir. Şekil 4.15.D'de kontrol, Sch-B ve Naif grubu farelerinin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon skorlaması görülmektedir.



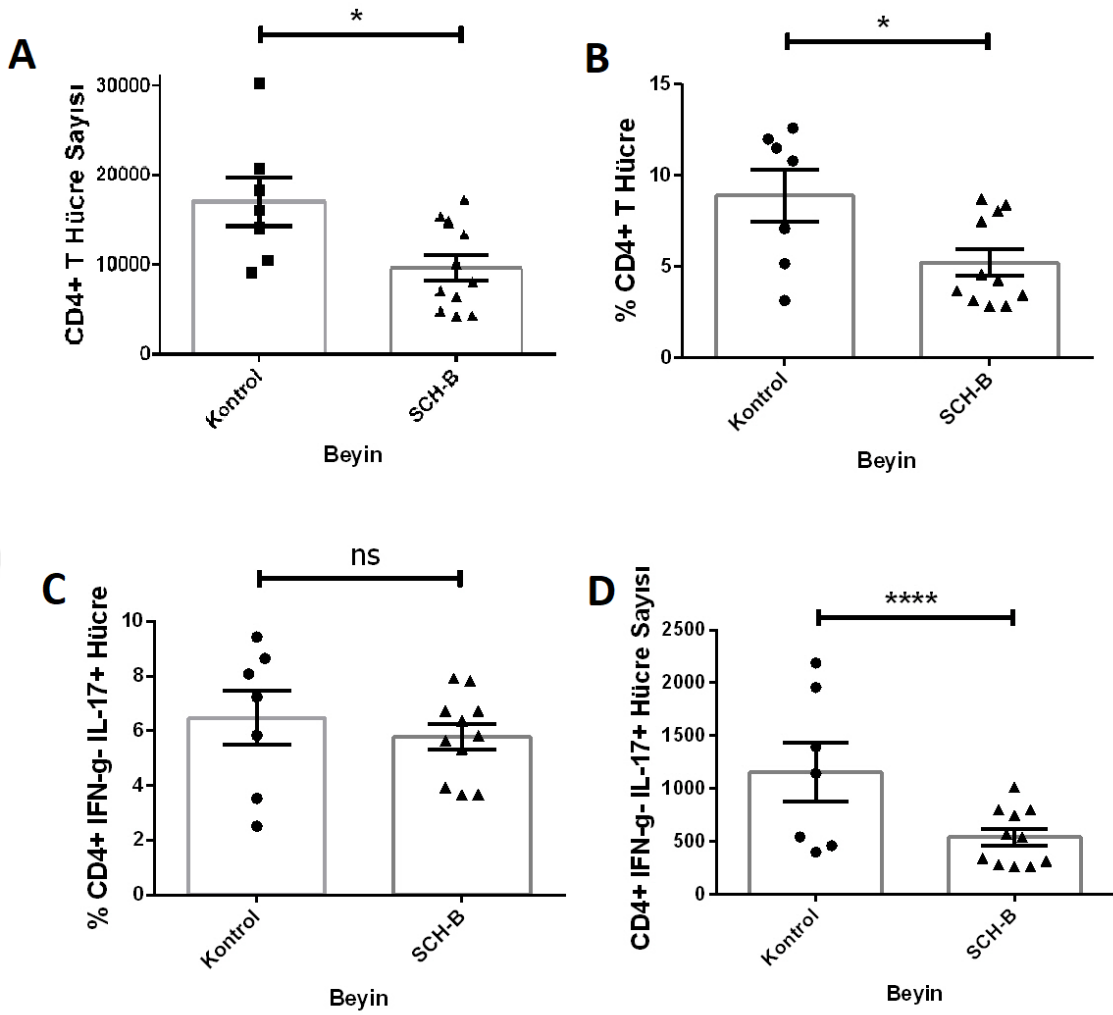
Şekil 4.15. C57BL6 farelerinin Demiyelinizasyon skorlaması. A) Kontrol, B) Sch-B ve C) Naif farelerin spinal kordlarının luxol mavisi ile boyanmış kesitlerinin görüntüleri. D) Demiyelinizasyon skolarının kantifiye edilerek gösterilmesi. Kontrol (n:16) ve Sch-B (n:11) gruplarının karşılaştırılması. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

4.1.2.3. Schisandrin B'nin MSS'ne infiltre olan T hücrelerine Etkisi



Şekil 4.16. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

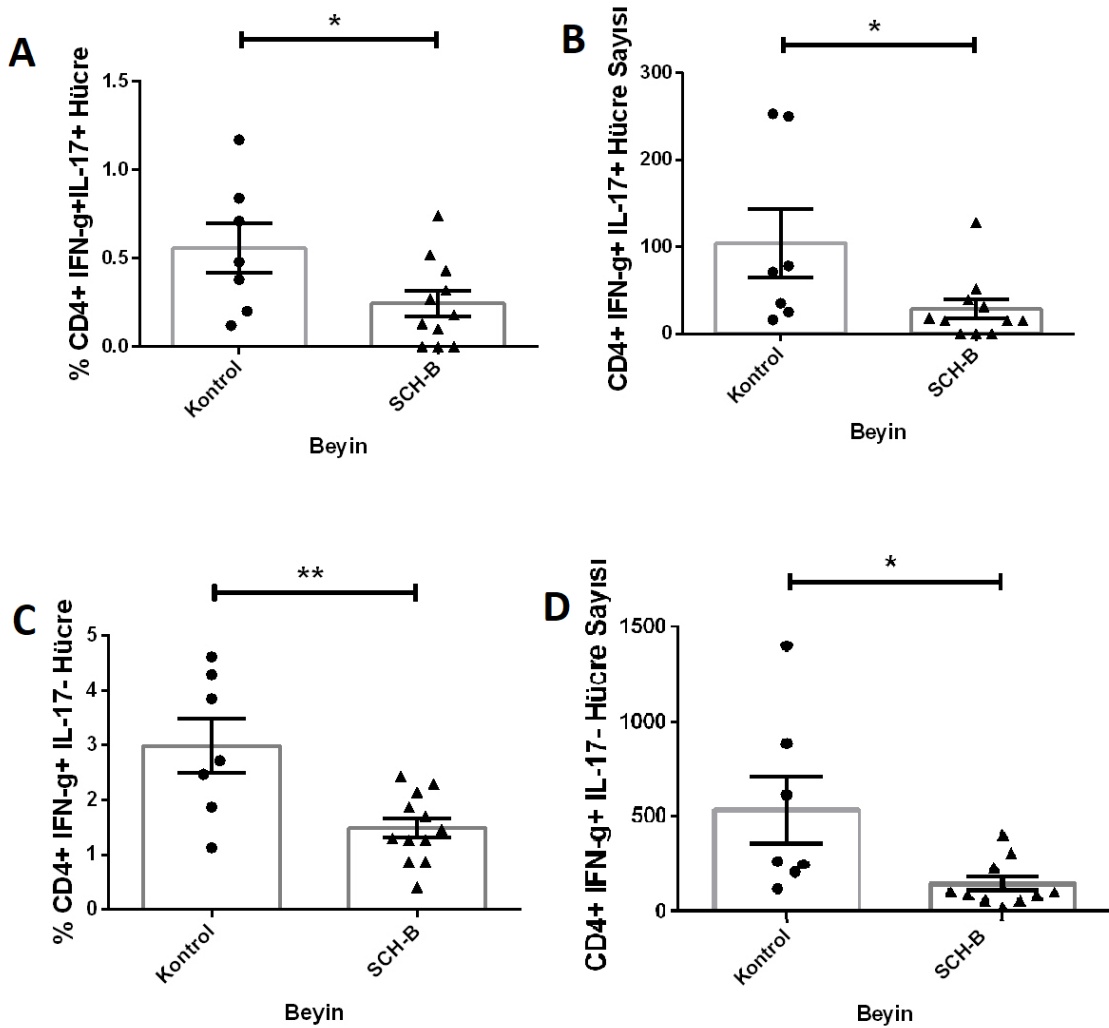
Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Şekil 4.17.A'da CD4+T hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %8,91 ve Sch-B grubunun ise %5,23'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.02$). Şekil 4.17.B'de CD4+T hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 17034 ve Sch-B grubunda ise 9665 CD4+T hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.018$). Şekil 4.17.C'de CD4+IL-17+IFN- γ -hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %6,47 ve Sch-B grubunun ise %5,78 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.17.D'de CD4+IL-17+IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1156 ve Sch-B grubunda ise 540 CD4+IL-17+IFN- γ - hücre vardır ve iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.02$).



Şekil 4.17. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+ T hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+ T hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+ IFN- γ - hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17+ IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * p<0.05; **** p<0,0001; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Şekil 4.18.A'da CD4+IL-17+IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,56 ve Sch-B grubunun ise %0,24 olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.045). Şekil 4.18.B'de CD4+IL-17+IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalama 104 ve

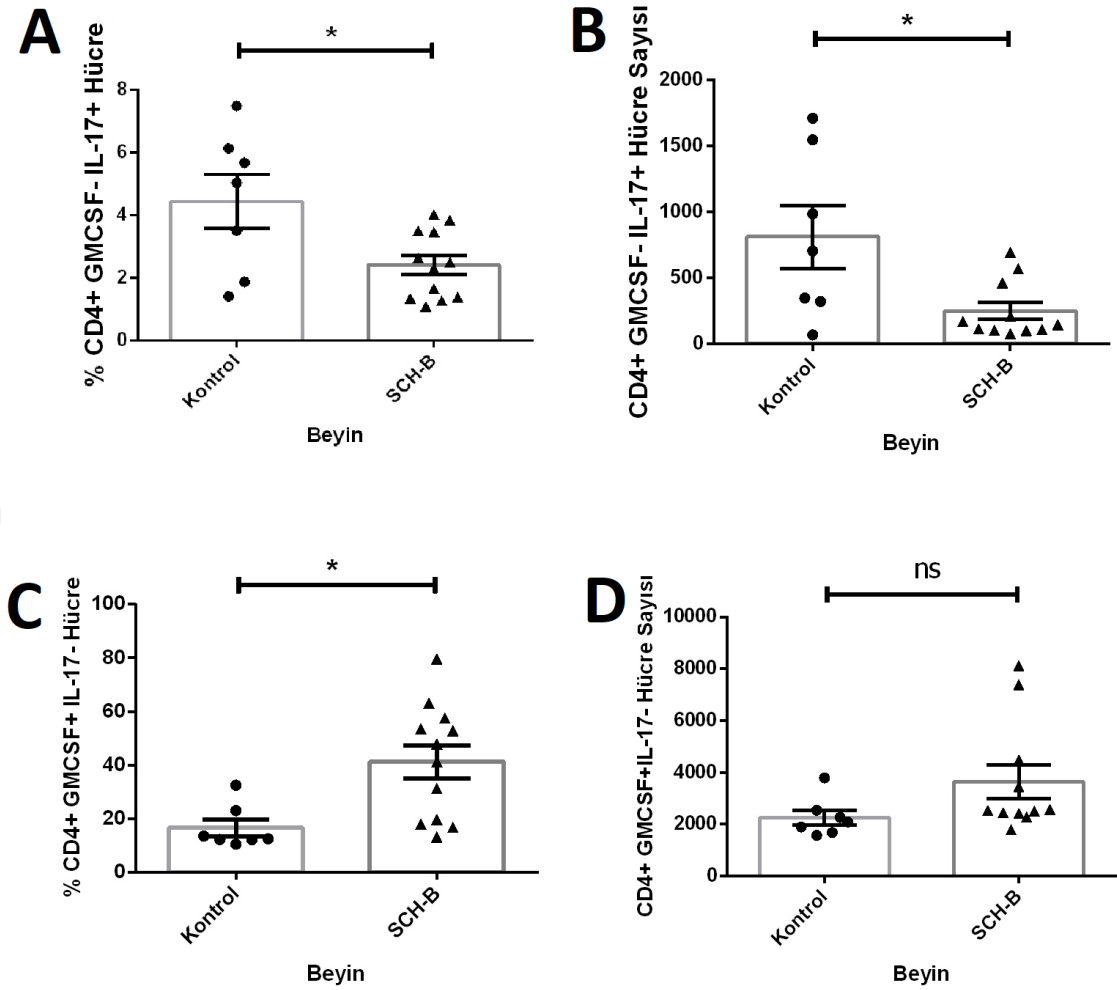
Sch-B grubunun ise 28 CD4+IL-17+IFN- γ + hücredir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.039$). Şekil 4.18.C'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %2,99 ve Sch-B grubunun ise %1,49'dur ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.003$). Şekil 4.18.D'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 535 ve Sch-B grubunda ise 146 CD4+IL-17-IFN- γ + hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.017$).



Şekil 4.18. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17+ IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17- IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin

kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17- IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

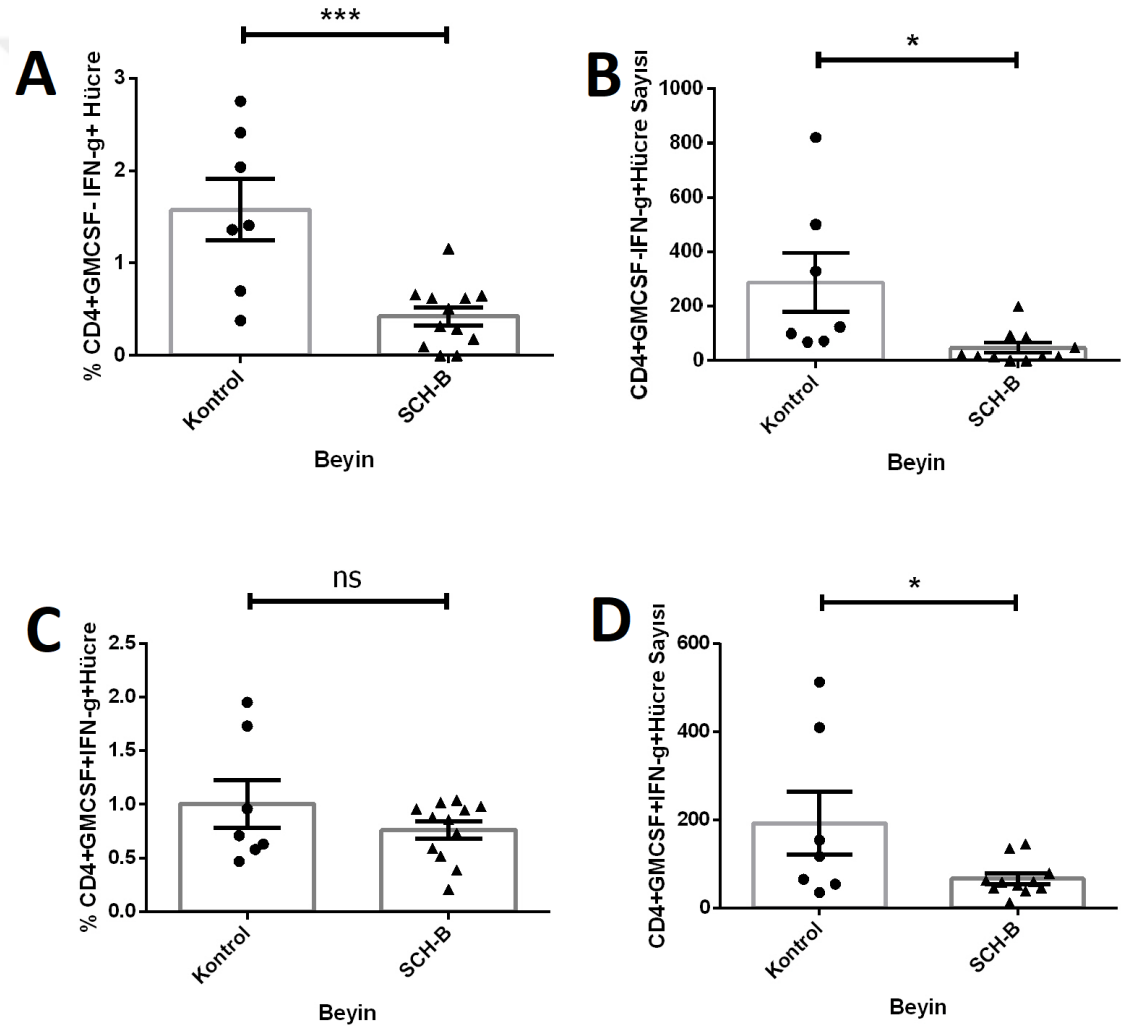
Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Şekil 4.19.A'da CD4+IL-17+GM-CSF- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %4,45 ve Sch-B grubunun ise %2,41 olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.016$). Şekil 4.19.B'de CD4+IL-17+GM-CSF- hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 812 ve Sch-B grubunda ise 249 CD4+IL-17+GM-CSF- hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.014$). Şekil 4.19.C'de CD4+IL-17-GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %16,64 ve Sch-B grubunun ise %41,25'tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.010$). Şekil 4.19.D'de CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 2268 ve Sch-B grubunda ise 3640 CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.19. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+GM-CSF- hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17+GM-CSF- hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17-GM-CSF+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17- GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Şekil 4.20.A'da CD4+IFN- γ +GM-CSF- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,58 ve Sch-B grubunun ise %0,42 olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0007$). Şekil 4.20.B'de CD4+IFN- γ +GM-CSF- hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda

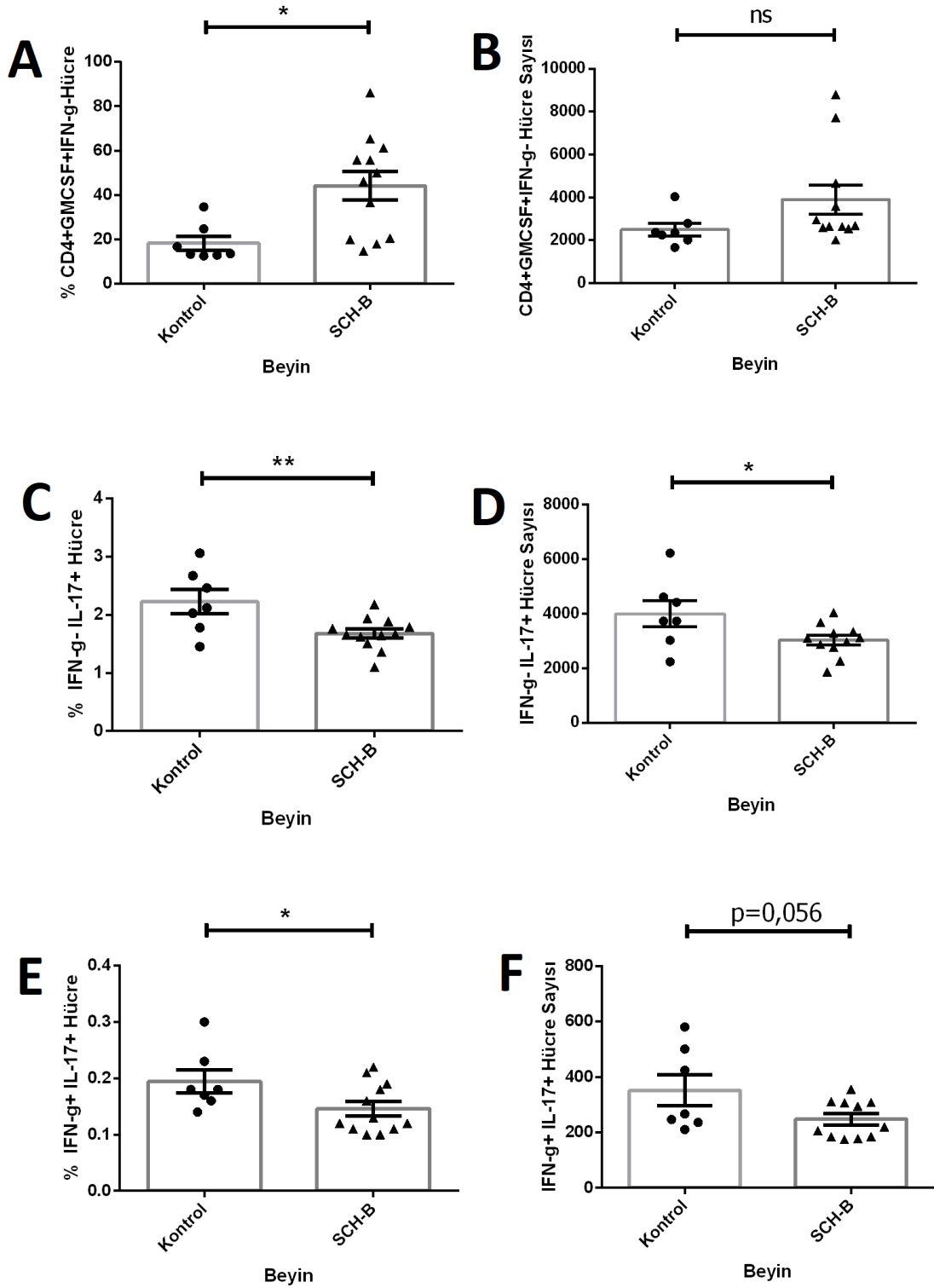
ortalama 288 ve Sch-B grubunda ise 46 CD4+IFN- γ +GM-CSF- hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.014$). Şekil 4.20.C'de CD4+IFN- γ +GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1 ve Sch-B grubunun ise %0,76 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.20.D'de CD4+IFN- γ +GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 193 ve Sch-B grubunda ise 66 CD4+IFN- γ +GM-CSF+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.046$).



Şekil 4.20. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+IFN- γ +GM-CSF- hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IFN- γ +GM-CSF- hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IFN- γ +GM-CSF+ hücrelerin

yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IFN- γ +GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p<0.05$; *** $p<0.001$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

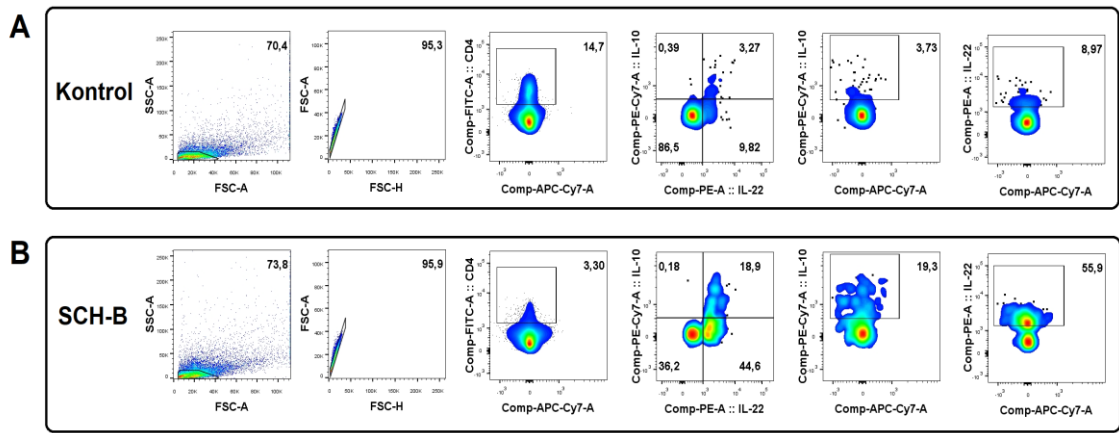
Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Şekil 4.21.A'da CD4+IFN- γ -GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %18,3 ve Sch-B grubunun ise %44,1 olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$). Şekil 4.21.B'de CD4+IFN- γ -GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 2500 ve Sch-B grubunda ise 3900 CD4+IFN- γ -GM-CSF+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.21.C'de IFN- γ -IL-17+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %2,23 ve Sch-B grubunun ise %1,67'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.009$). Şekil 4.21.D'de IFN- γ -IL-17+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 3995 ve Sch-B grubunda ise 3029 IFN- γ -IL-17+ hücre vardır ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.044$). Şekil 4.21.E'de IFN- γ +IL-17+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,195 ve Sch-B grubunun ise %0,145'tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.048$). Şekil 4.21.F'de IFN- γ +IL-17+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 353 ve Sch-B grubunda ise 248 IFN- γ +IL-17+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grups arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.056$).



Şekil 4.21. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+IFN- γ -GM-CSF+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IFN- γ -GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) IFN- γ -IL-

17+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) IFN- γ -IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, E) IFN- γ +IL-17+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, F) IFN- γ +IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması.* $p<0.05$; ** $p<0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

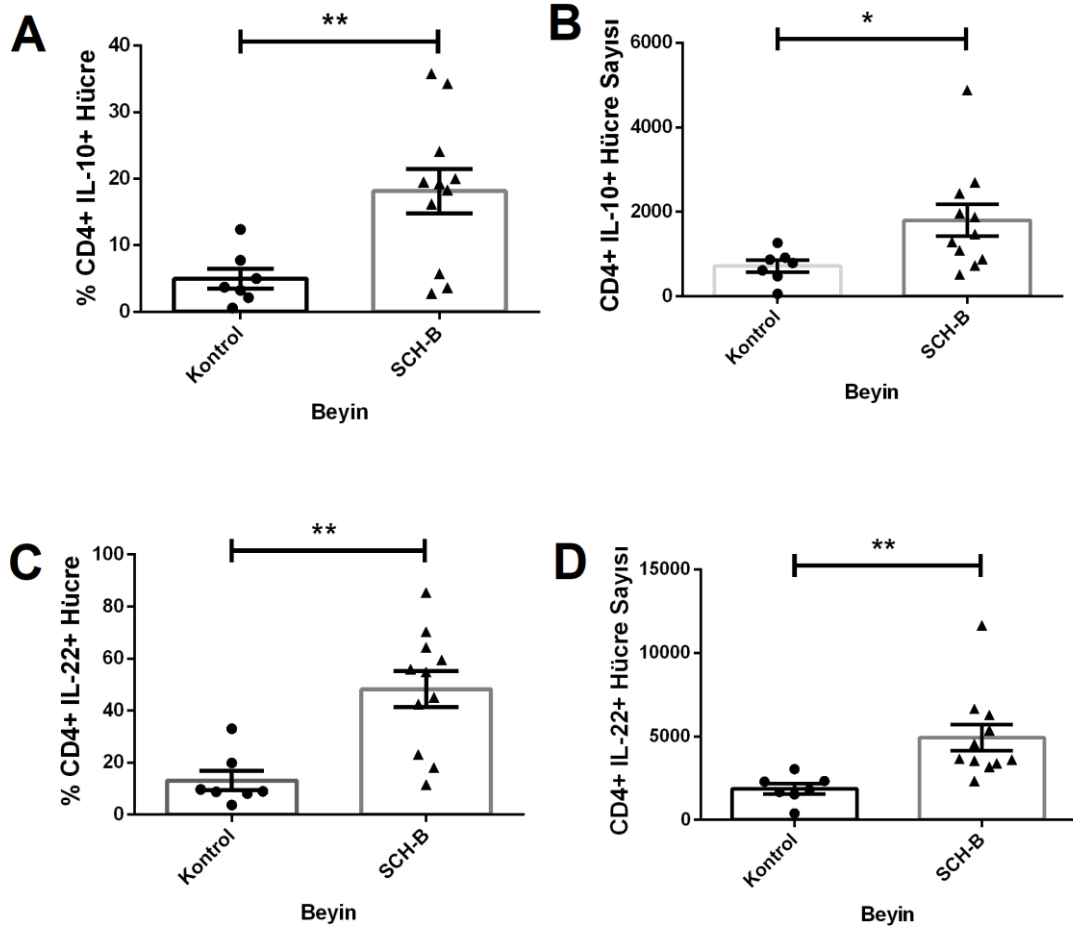
Beyin'den elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.22'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Şekil 4.23.A'da CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %4,98 ve Sch-B grubunun ise %18,15'tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.008$). Şekil 4.23.B'de CD4+IL-10+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 715 ve Sch-B grubunda ise 1804 CD4+IL-10+ hücre vardır ve iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.039$). Şekil 4.23.C'de CD4+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %13,16 ve Sch-B grubunun ise %48,25'tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0016$). Şekil 4.23.D'de CD4+IL-22+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B

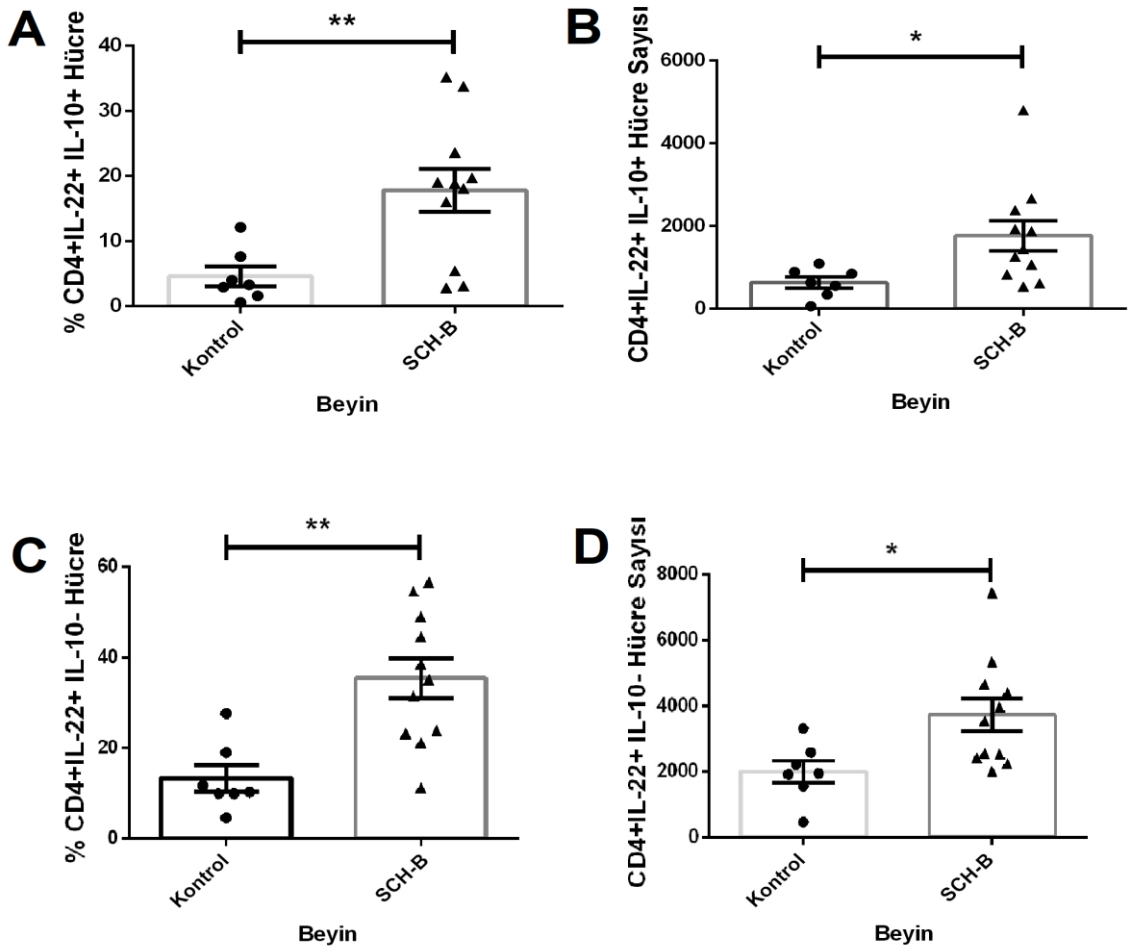
grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1865 ve Sch-B grubunda ise 4930 CD4+IL-22+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.008$).



Şekil 4.23. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-22+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması.* $p<0.05$; ** $p<0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.24'te gösterilmiştir. Şekil 4.24.A'de CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %4,58 ve Sch-B grubunun ise %17,8'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.007$). Şekil 4.24.B'de CD4+IL-10+IL-22+ hücre sayıları kontrol ile

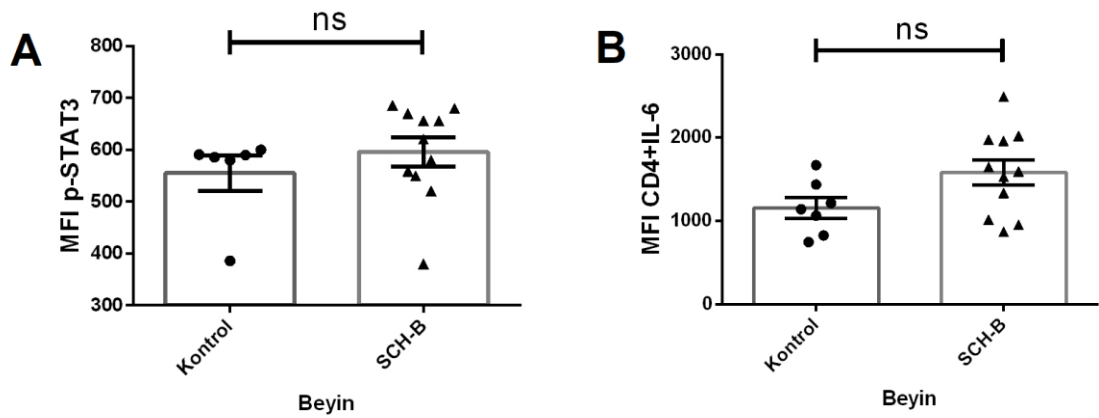
Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 632 ve Sch-B grubunda ise 1765 CD4+IL-10+IL-22+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.031$). Şekil 4.24.C’de CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %13,21 ve Sch-B grubunun ise %35,4’tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0022$). Şekil 4.24.D’de CD4+IL-10-IL-22+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1994 ve Sch-B grubunda ise 3735 CD4+IL-10-IL-22+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.022$).



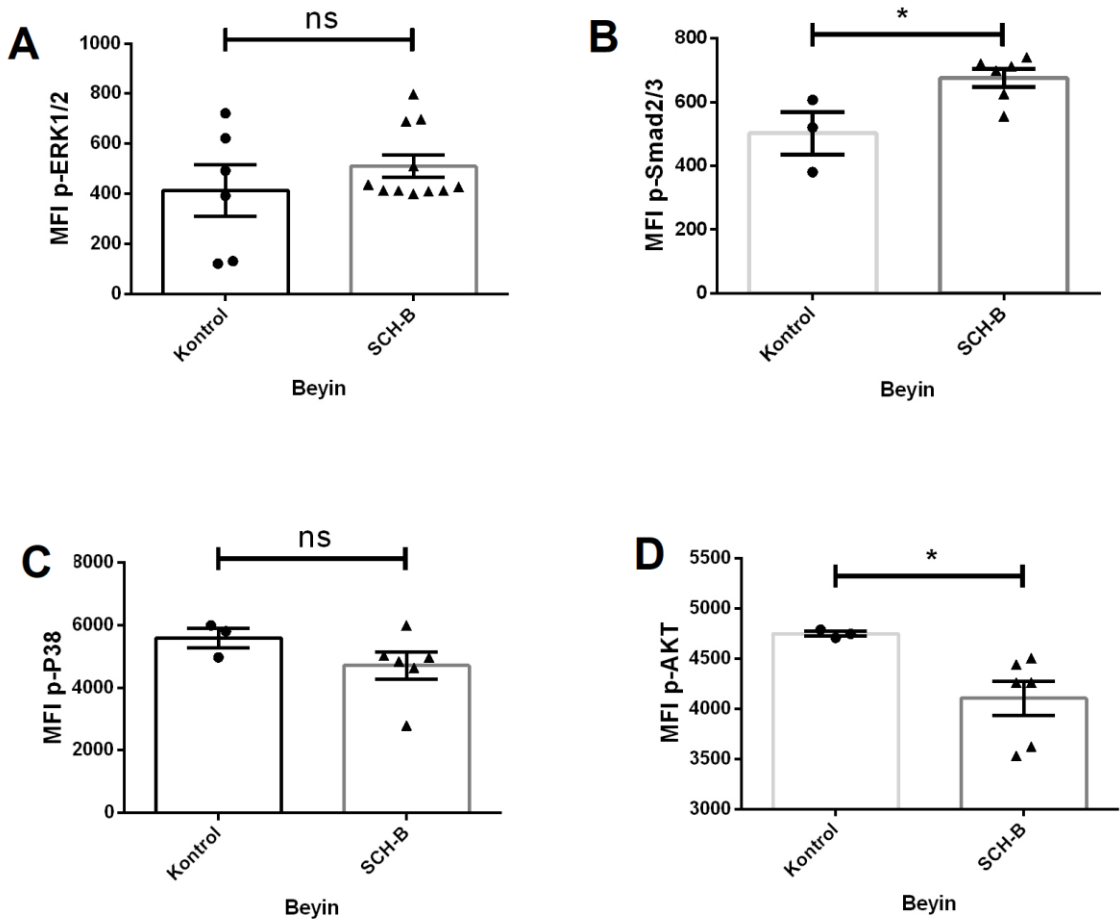
Şekil 4.24. Beyin’den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+IL-22+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması C) CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-10-IL-22+ hücre sayılarının

kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Beyin'deki lökositler CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE, p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Şekil 4.25.A'da hücrelerin p-Stat3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 555 ve Sch-B grubunun ise 596 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.25.B'de CD4+IL-6+ ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 1159 ve Sch-B grubunun ise 1584 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.25.C'de CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,89 ve Sch-B grubunun ise %1,31 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.26A'da hücrelerin p-ERK1/2'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 414 ve Sch-B grubunun ise 510 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.26.B'de hücrelerin p-Smad2/3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun MFI 503 ve Sch-B grubunun ise 675'tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.024$). Şekil 4.26.C'de hücrelerin p-P38'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 5587 ve Sch-B grubunun ise 4711 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.26.D'de hücrelerin p-Akt1/2'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 4750 ve Sch-B grubunun ise 4108 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$).



Şekil 4.25. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue* ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-6+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

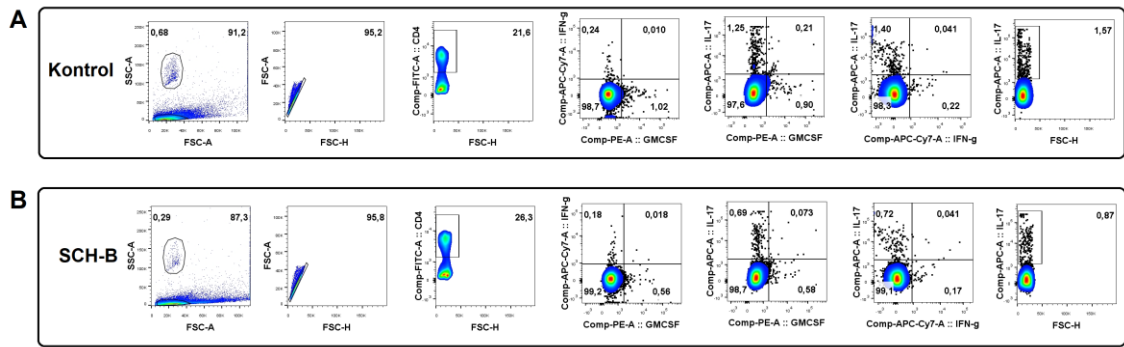


Şekil 4.26. Beyin'den elde edilen lökositlerin p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-Smad ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması.* $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.1.3. Schisandrin B'nin Lenf Noduna etkisi

C57BL6 farelerinin immünizasyondan 19 gün sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen farelerin İnguinal lenf nodları toplanmıştır. Stariner yardımıyla hücreler süspanse hale getirilip, çeşitli antikorlar ile boyanmıştır. Akım sitometri yardımıyla hücreler analiz edilmiştir.

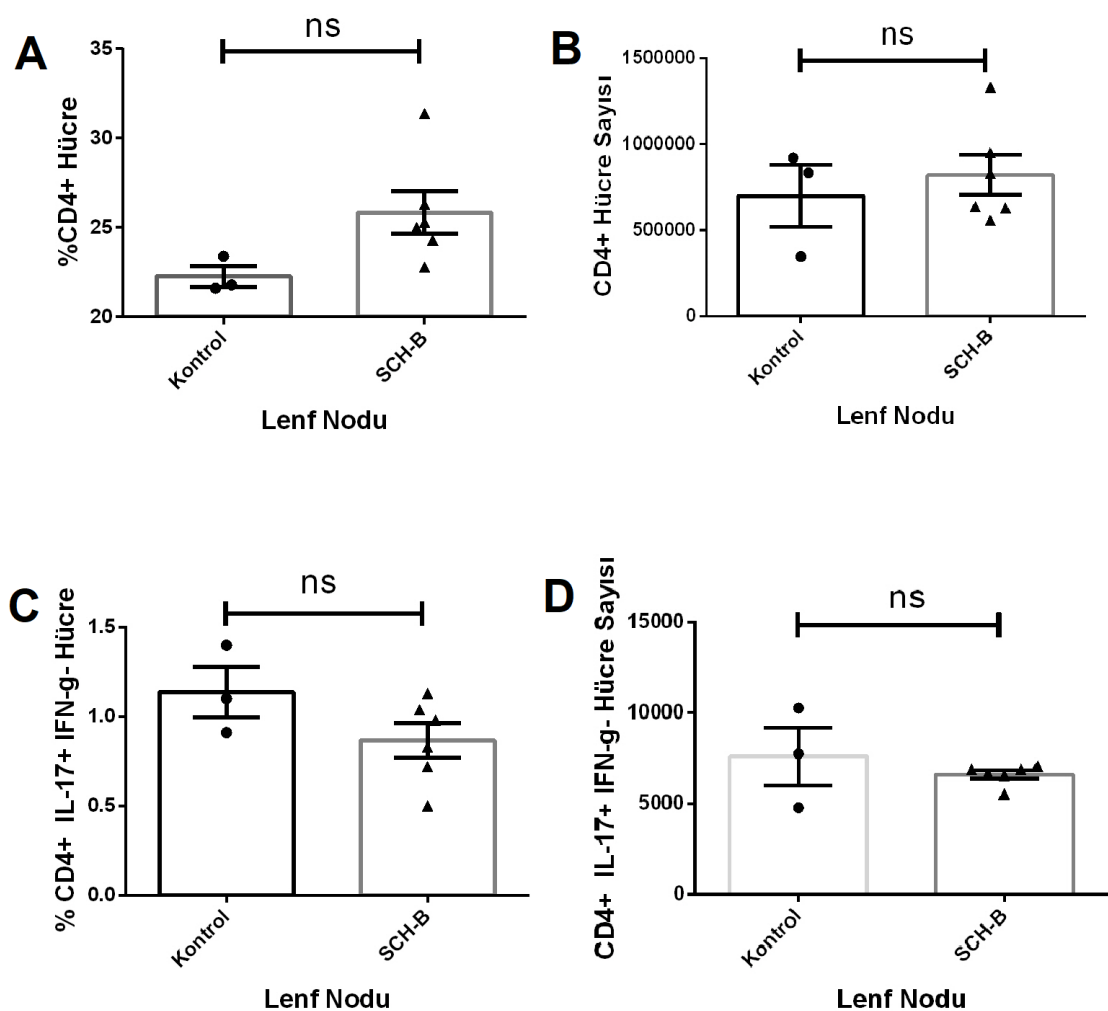
LN'dan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.27'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.27. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Şekil 4.28.A'da CD4⁺ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %22,3 ve Sch-B grubunun ise %25,8 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

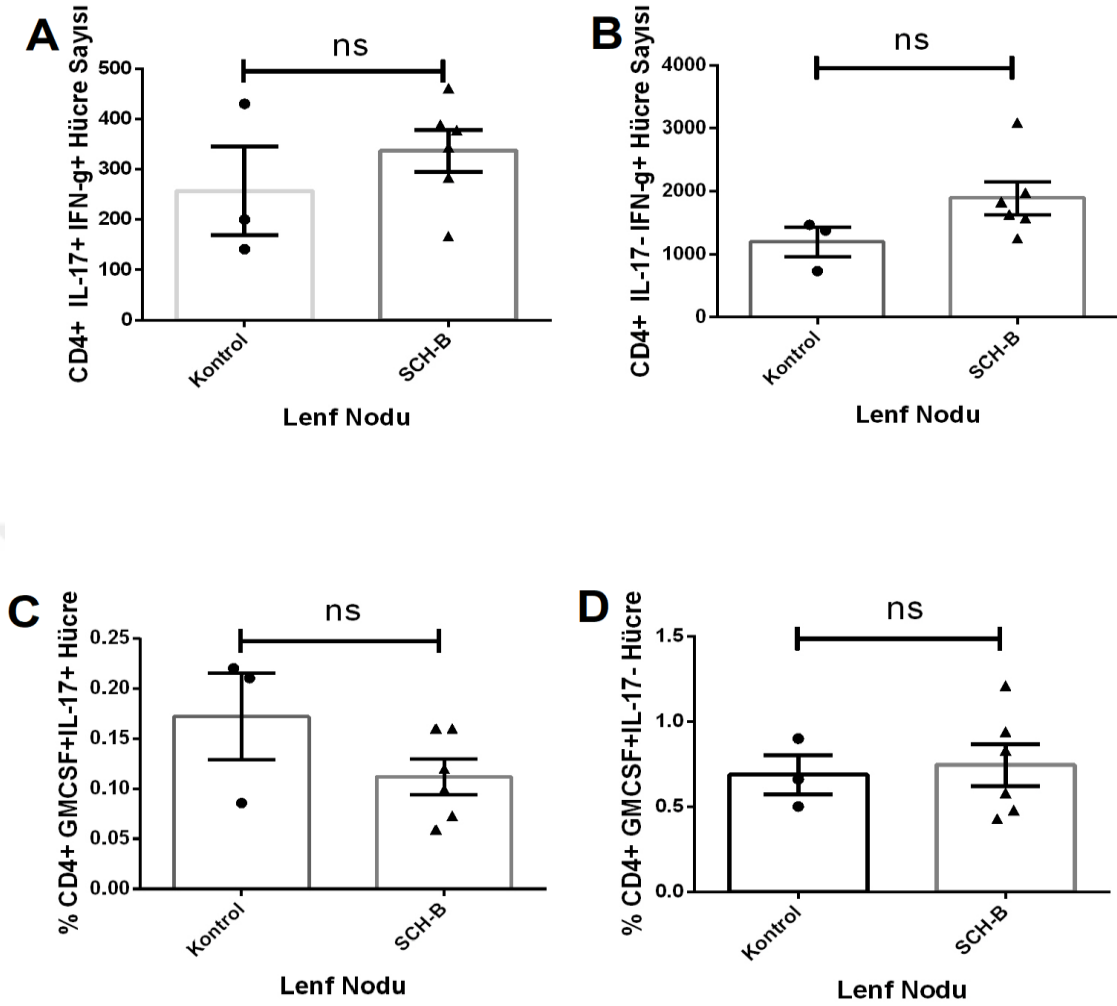
görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.28.B’de CD4+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 698430 ve Sch-B grubunda ise 820700 CD4+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.28.C’de CD4+IL-17+ IFN- γ - hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,14 ve Sch-B grubunun ise %0,86 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.28.D’de CD4+IL-17+ IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 7600 ve Sch-B grubunda ise 6600 CD4+IL-17+ IFN- γ - hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.28. LN’den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve lökositlerinin analizi. A) CD4+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu

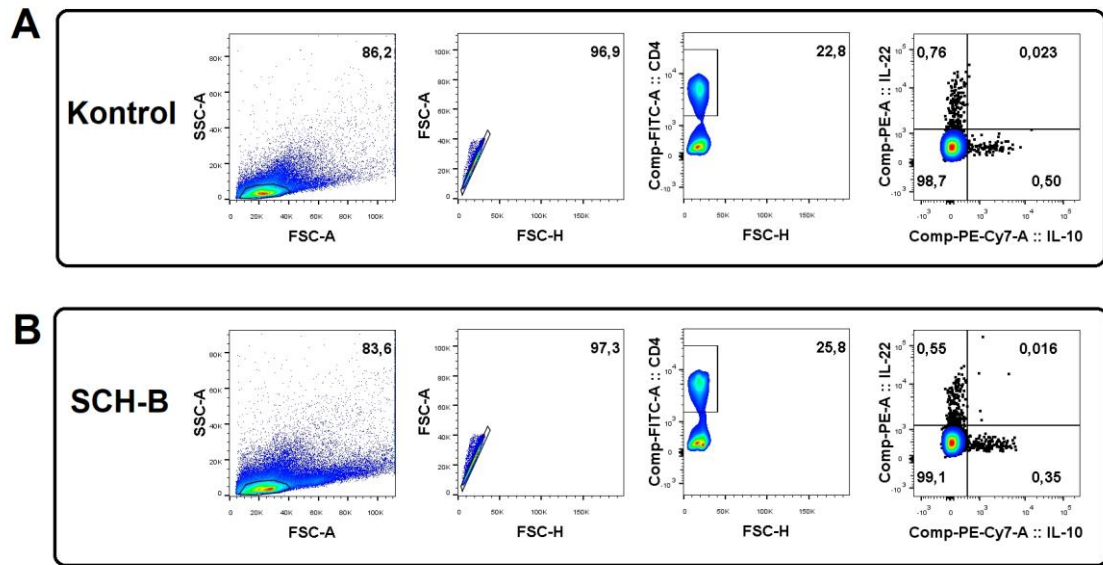
arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+ IFN- γ - hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17+ IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.29'da gösterilmiştir. Şekil 4.29.A'da CD4+IL-17+IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 257 ve Sch-B grubunda ise 336 CD4+IL-17+IFN- γ + hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.29.B'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1196 ve Sch-B grubunda ise 1896 CD4+IL-17-IFN- γ + hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.29.C'de CD4+IL-17+GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,17 ve Sch-B grubunun ise %0,11 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.29.D'de CD4+IL-17+GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 0,69 ve Sch-B grubunun ise %0,74 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.29. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+ GM-CSF+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17-GM-CSF+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

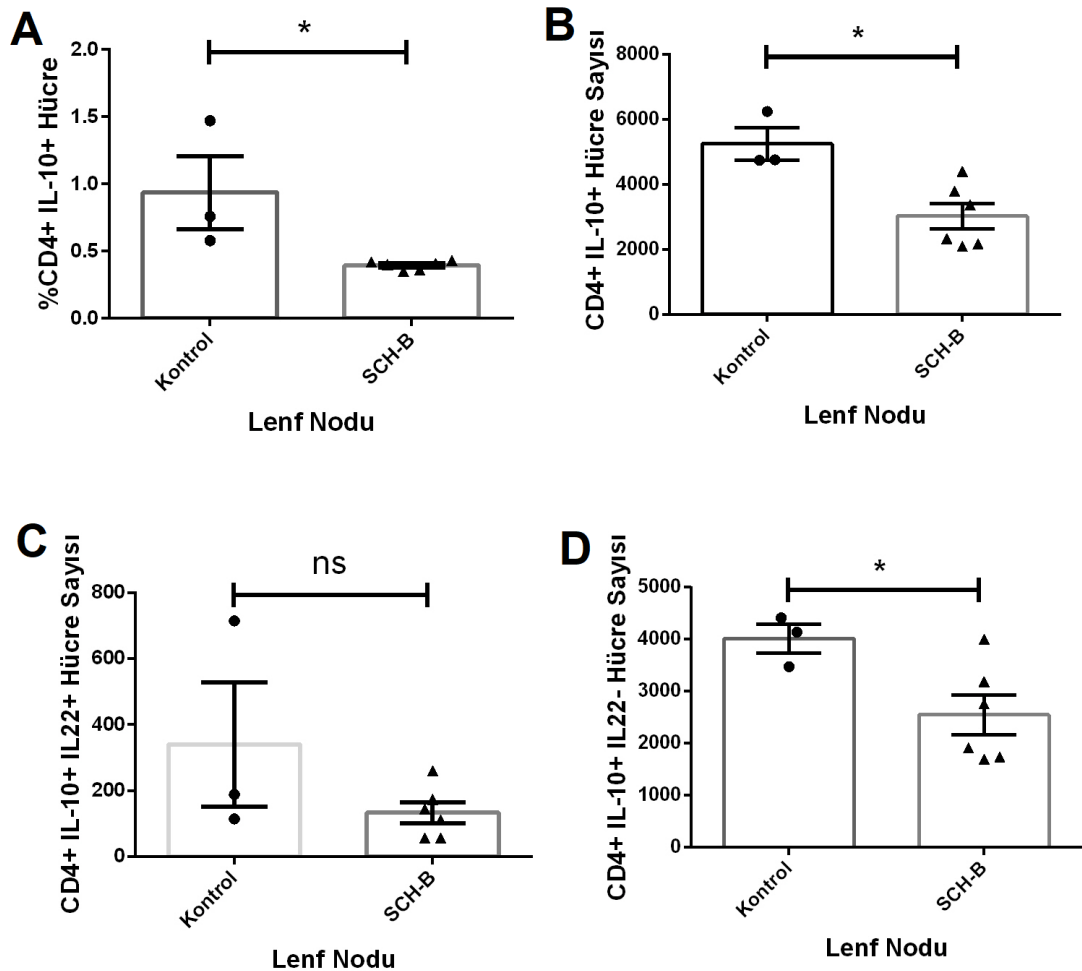
LN'dan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.30'da boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.30. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

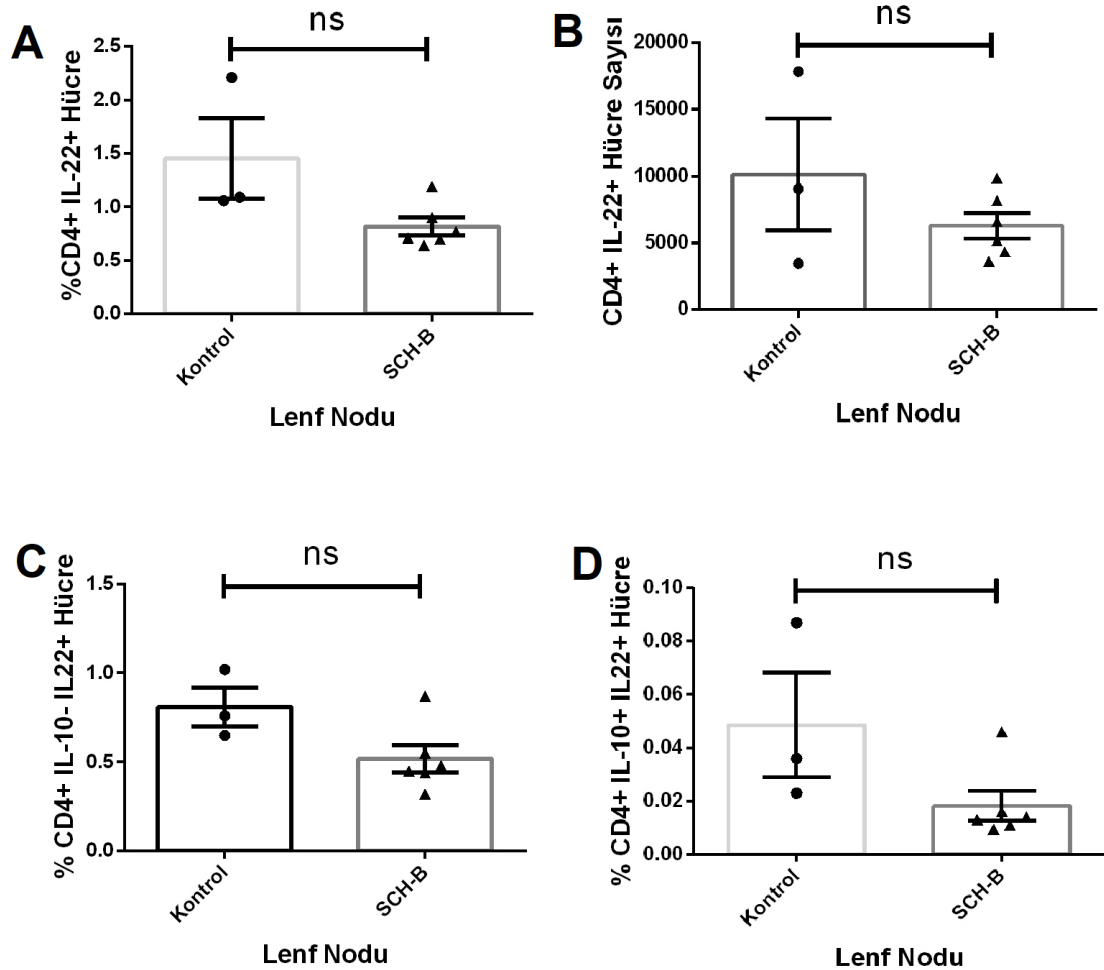
LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.31 ve Şekil 4.32'de gösterilmiştir. Şekil 4.31.A'da CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,94 ve Sch-B grubunun ise %0,40'tır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.02$). Şekil 4.31.B'de CD4+IL-10+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 5248 ve Sch-B grubunda ise 3030 CD4+IL-10+ hücre vardır ve grubunda iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.012$). Şekil 4.31.C'de CD4+IL-10+IL-22+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 10123 ve Sch-B grubunda ise 6298 CD4+IL-10+IL-22+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.31.D'de CD4+IL-10+IL-22- hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 4010 ve Sch-B grubunda ise 2553 CD4+IL-10+IL-22- hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.042$). Şekil 4.32.A'da CD4+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,45 ve Sch-B grubunun ise %0,82 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.32.B’de CD4+IL-22+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 10123 ve Sch-B grubunda ise 6298 CD4+IL-10+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.32.C’de CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,81 ve Sch-B grubunun ise %0,52 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.32.D’de CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,048 ve Sch-B grubunun ise %0,018 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.31. LN’den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol

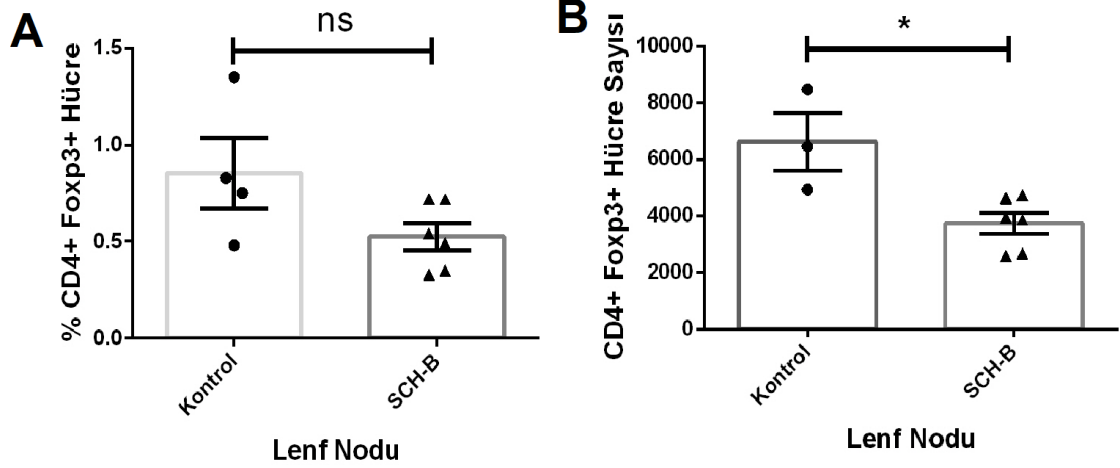
ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * p<0.05; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



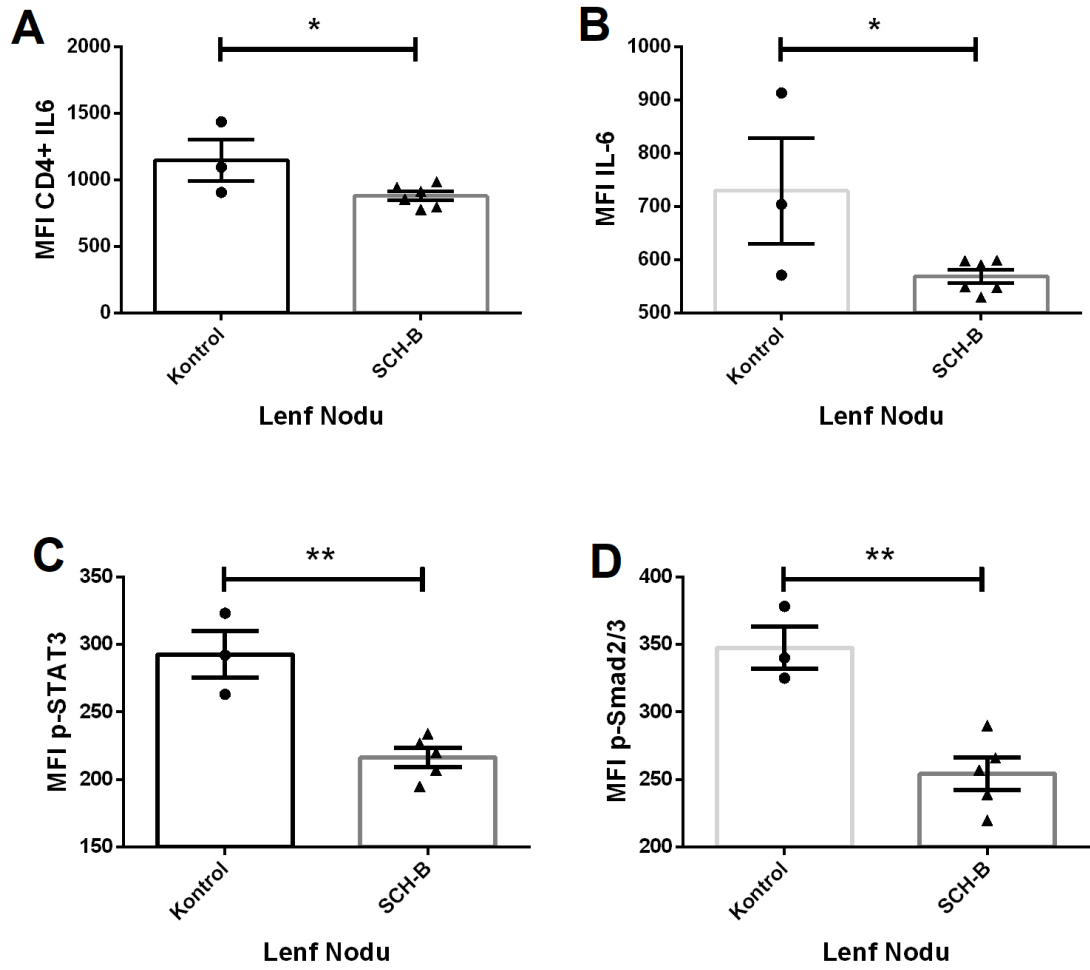
Şekil 4.32. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'daki lökositler CD4-FITC, Foxp3-Pacific Blue, IL-6-PE, p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-Pacific Blue ile boyanmış ve Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'te gösterilmiştir. Şekil 4.33.A'da CD4+Foxp3+ hücrelerin

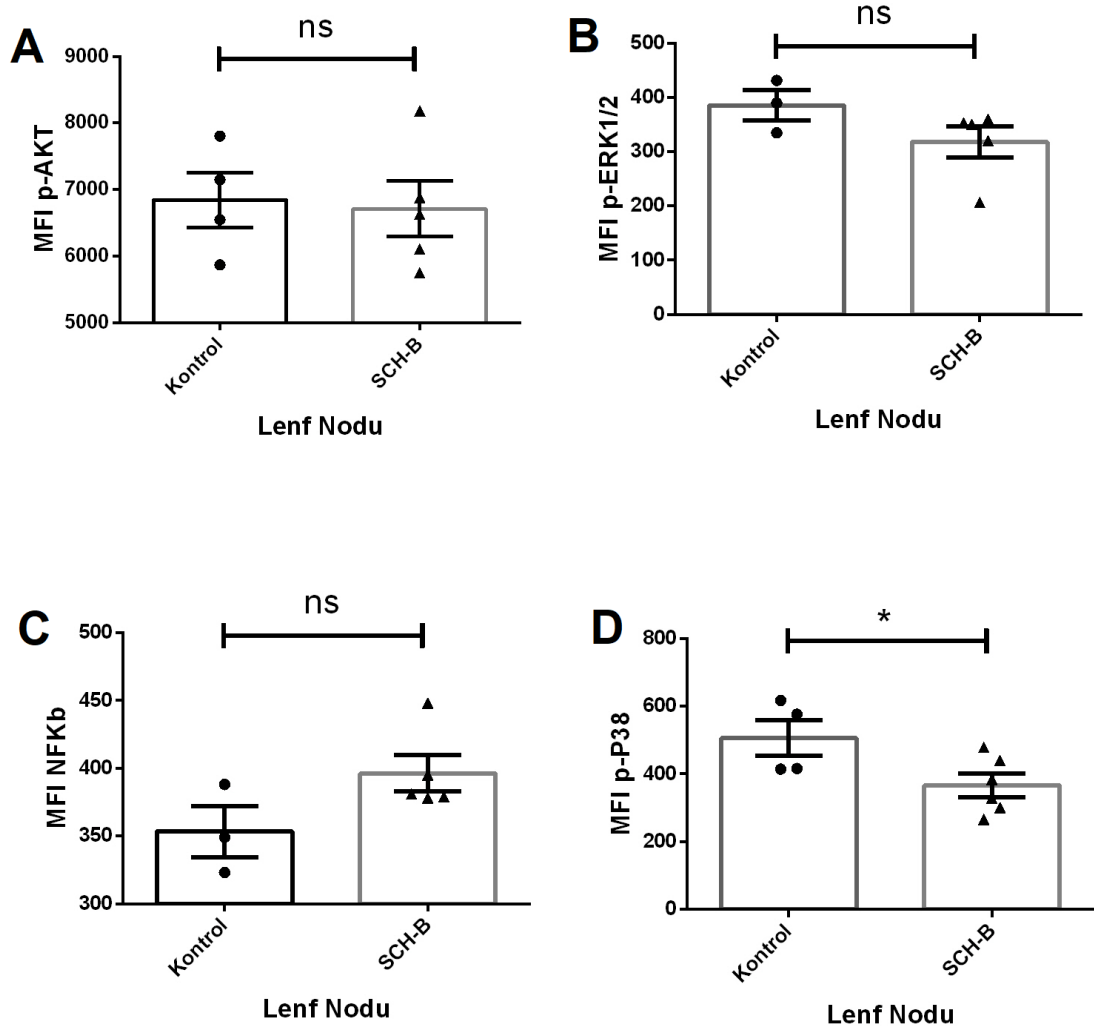
yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,85 ve Sch-B grubunun ise %0,53 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.33.B'de CD4+Foxp3+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 6627 ve Sch-B grubunda ise 3746 CD4+Foxp3+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.013$). Şekil 4.34.A'da CD4+ hücrelerin IL-6'nın ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 1146 ve Sch-B grubunda ise 879'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.05$). Şekil 4.34.B'de hücrelerin IL-6'nın ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 729 ve Sch-B grubunda ise 569'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.049$). Şekil 4.34.C'de hücrelerin p-Stat3'ün ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 293 ve Sch-B grubunun ise 216'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0029$). Şekil 4.34.D'de hücrelerin p-Smad2/3'ün ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 348 ve Sch-B grubunun ise 254'tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.003$). Şekil 4.35.A'da hücrelerin p- AKT1/2'nin ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 6845 ve Sch-B grubunda ise 6711 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.35.B'de hücrelerin p-ERK1/2'nin ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 385 ve Sch-B grubunda ise 318 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.35.C'de hücrelerin p-NF κ b'nin ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 353 ve Sch-B grubunun ise 396 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.35.D'de hücrelerin p-P38'in ortalama floresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 506 ve Sch-B grubunun ise 366'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.047$).



Şekil 4.33. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC ve Foxp3-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) CD4+ Foxp3+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+ Foxp3+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



Şekil 4.34. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-6-PE, p-Smad2/3-PE ve p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-6+ lökosit hücrelerinin ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) IL-6+ lökosit hücrelerinin ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.



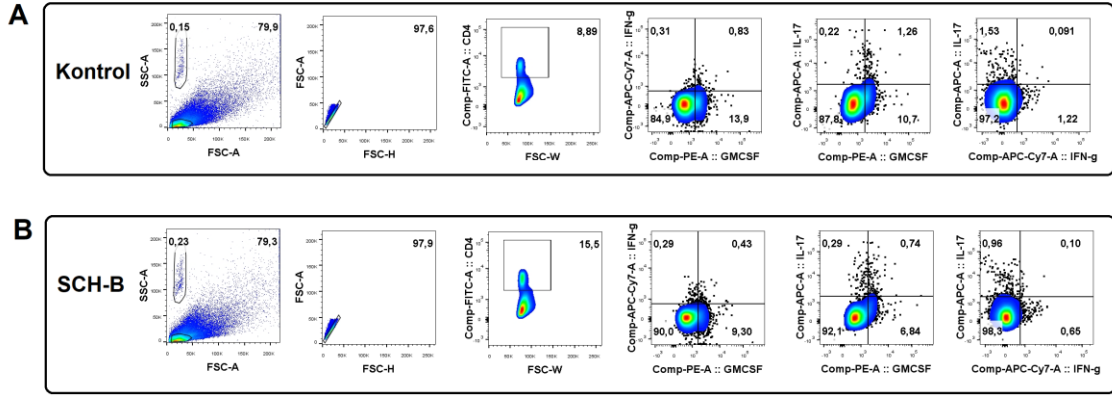
Şekil 4.35. LN'dan elde edilen lökositlerin p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-NFκb-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-NFκb ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması.* $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.1.3. Schisandrin B'nin Dalağa etkisi

C57BL6 farelerinin immünizasyondan 19 gün sonra fareler servikal dislokasyonla kurban edilmiştir. Kurban edilen farelerin dalakları çıkarılmıştır. Daha sonra

stariner yardımıyla hücreler süspansiyon haline getirilip, çeşitli antikorlarla boyanmıştır. Akım sitometri yardımıyla hücreler analiz edilmiştir.

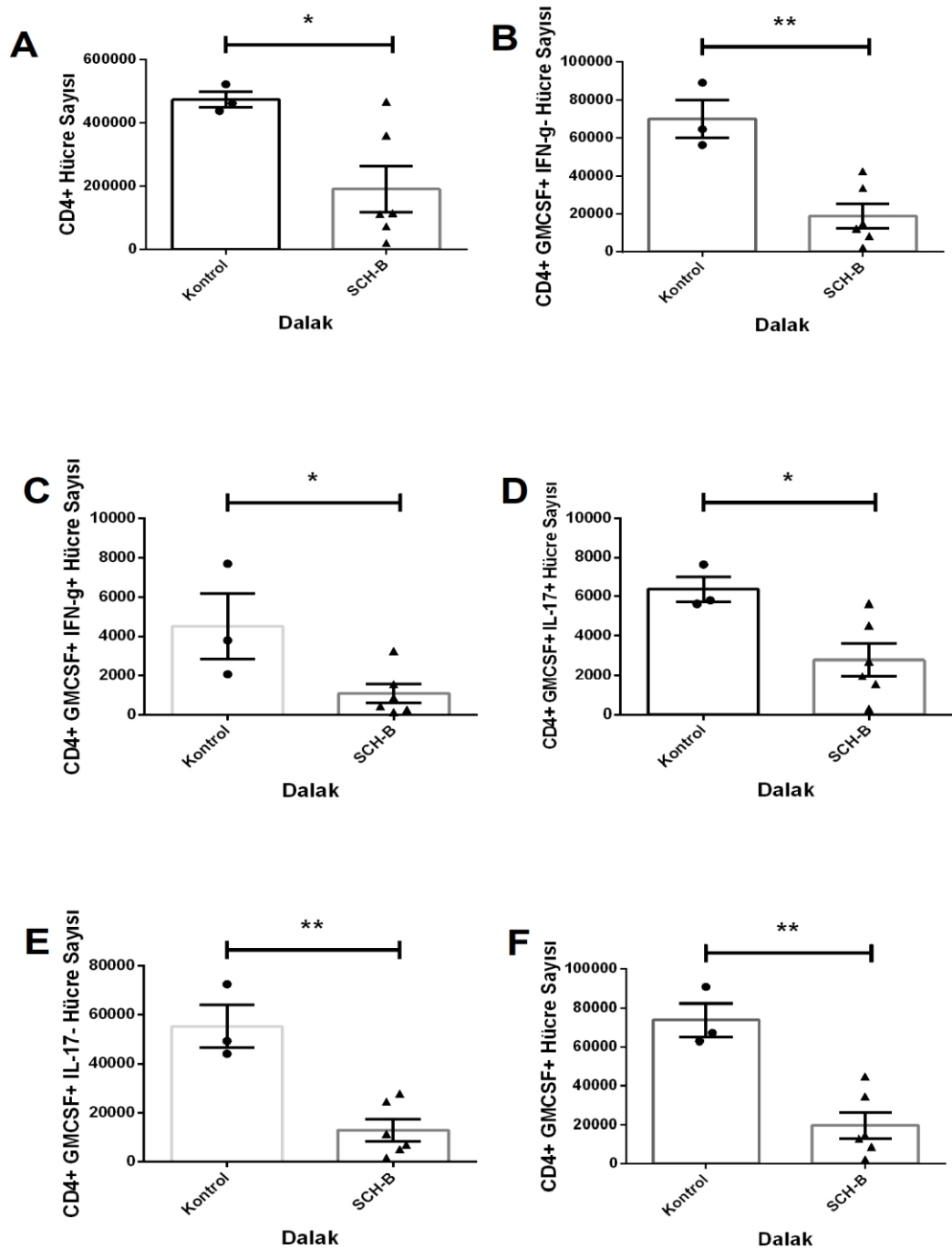
DLK'tan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.36'da boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.36. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) Sch-B grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

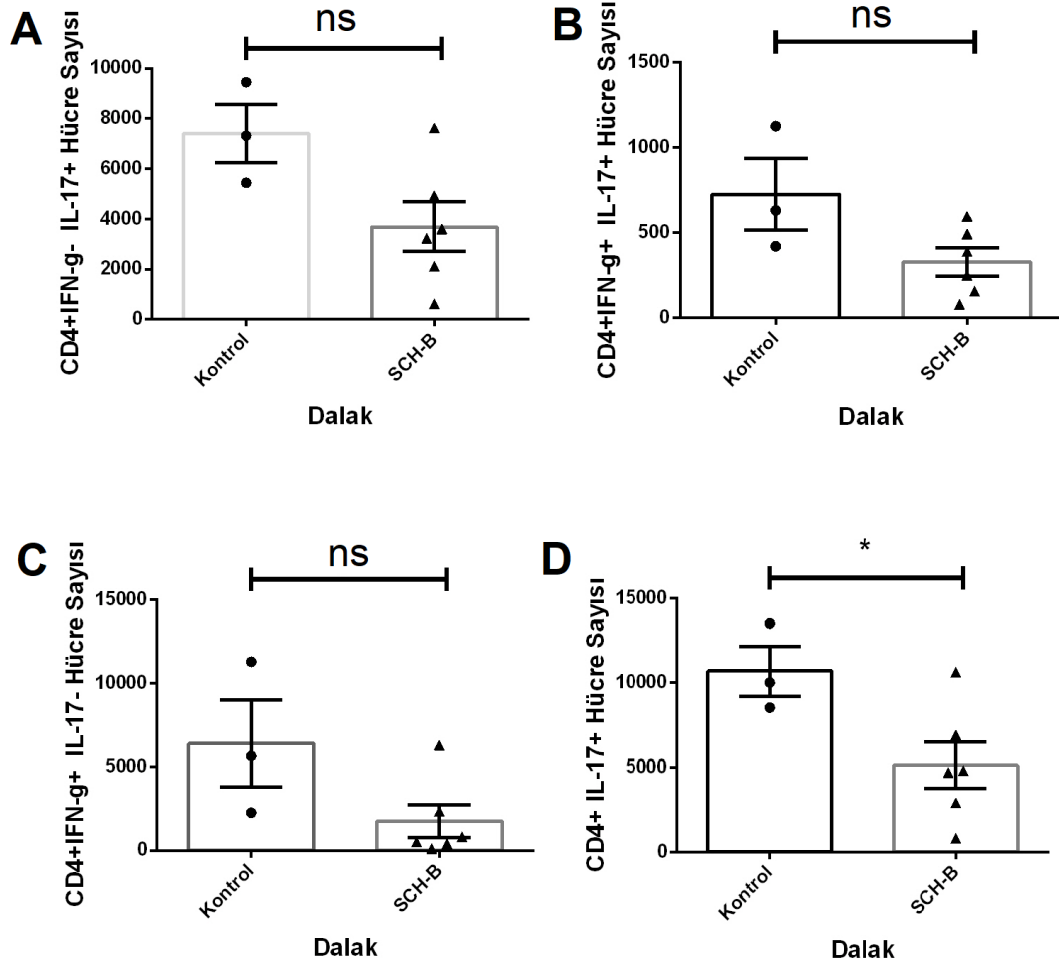
DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.37'de gösterilmiştir. Şekil 4.37.A'da CD4+ T hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 474403 ve Sch-B grubunda ise 191626 CD4+ T hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,034$). Şekil 4.37.B'de CD4+GM-CSF+IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 70000 ve Sch-B grubunda ise 18900 CD4+GM-CSF+IFN- γ - hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,002$). Şekil 4.37.C'de CD4+GM-CSF+IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 4521 ve Sch-B grubunda ise 1093 CD4+GM-CSF+IFN- γ + hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,033$). Şekil 4.37.D'de CD4+IL-17+ GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 6358 ve Sch-B grubunda ise 2777 CD4+IL-17+ GM-CSF+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,025$). Şekil 4.37.E'de CD4+IL-17- GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama

55279 ve Sch-B grubunda ise 12948 CD4+IL-17- GM-CSF+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0017$). Şekil 4.37.F’de CD4+ GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 73679 ve Sch-B grubunda ise 19675 CD4+ GM-CSF+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.002$).



Şekil 4.37. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+ GM-CSF + IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+ IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+GM-CSF+IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, E) CD4+GM-CSF+IL-17- hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, F) CD4+GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması.* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

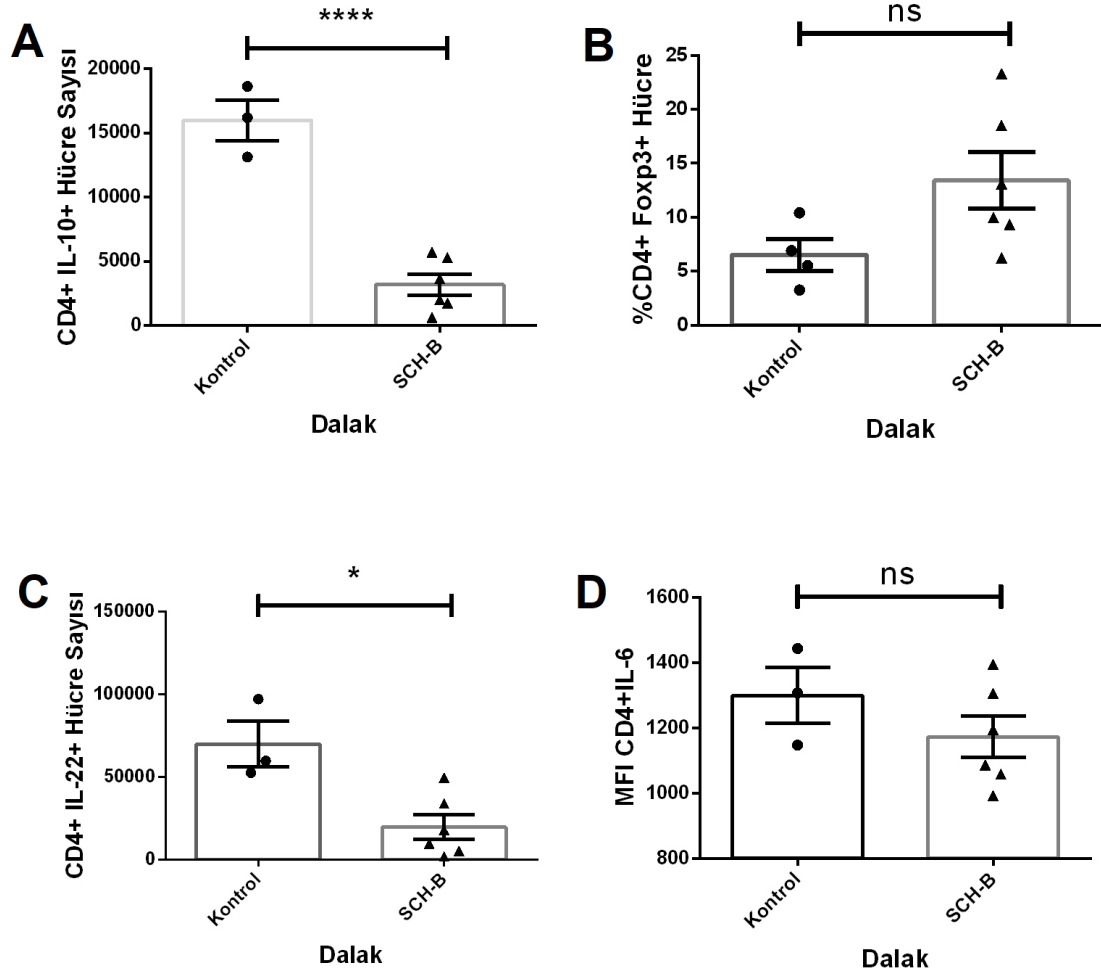
DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.38'de gösterilmiştir. Şekil 4.38.A'da CD4+IL-17+IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 7406 ve Sch-B grubunda ise 3689 CD4+IL-17+IFN- γ + hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.056$). Şekil 4.38.B'de CD4+IL+17+IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 725 ve Sch-B grubunda ise 327 CD4+IL+17+IFN- γ + hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.064$). Şekil 4.38.C'de CD4+IL+17-IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 6391 ve Sch-B grubunda ise 1752 CD4+IL+17-IFN- γ + hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.074$). Şekil 4.38.D'de CD4+IL-17+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 10677 ve Sch-B grubunda ise 5126 CD4+IL-17+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.042$).



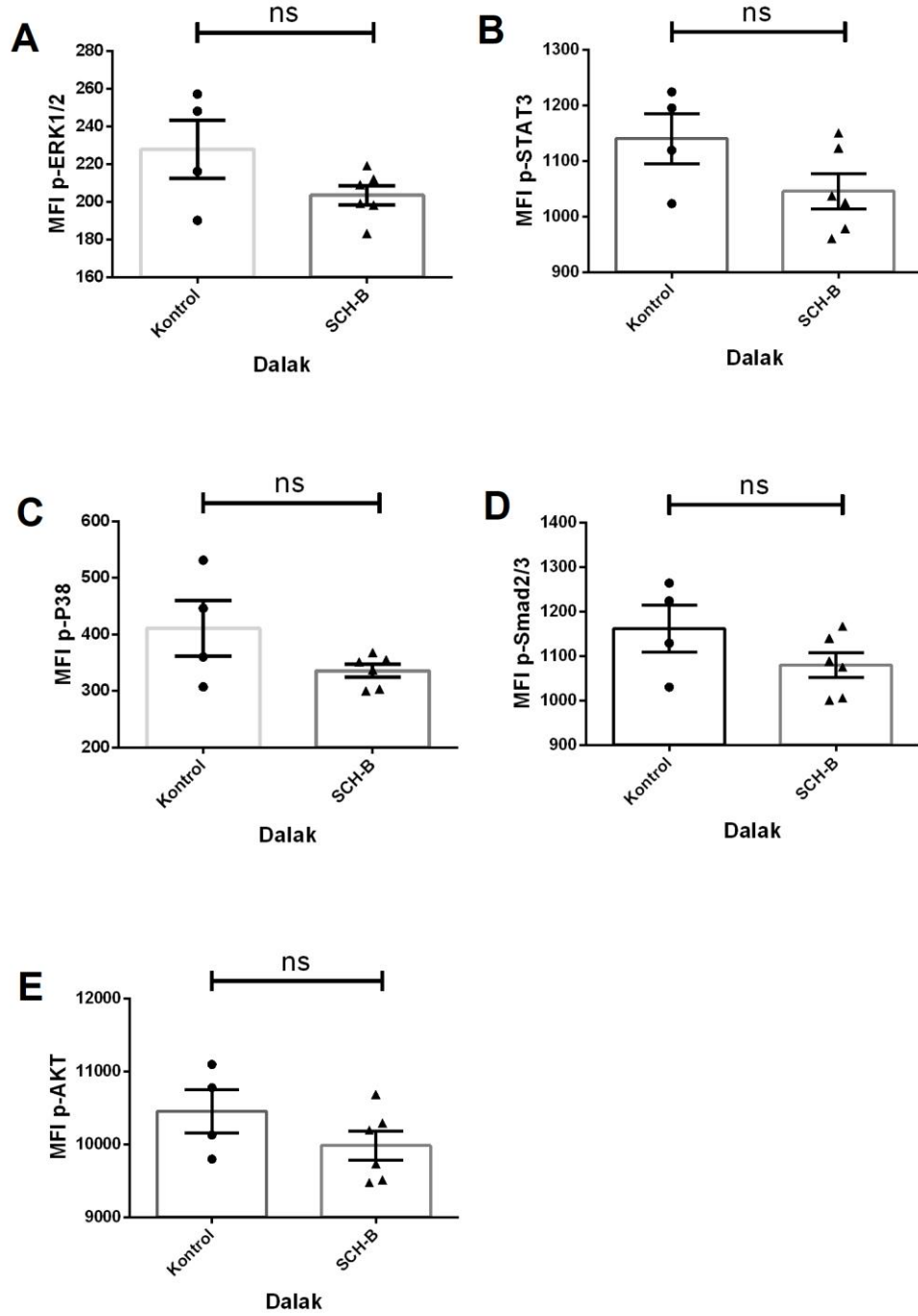
Şekil 4.38. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17+IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.39-40'ta gösterilmiştir. Şekil 4.39.A'da CD4+IL-10+ hücre sayıları kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 15900 ve Sch-B grubunda ise 3200 CD4+IL-10+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Şekil 4.39.B'de CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama %6,5 ve Sch-B grubunda ise %13,4 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p = 0.08$). Şekil 4.39.C'de CD4+IL-22+ hücre sayıları

kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 69859 ve Sch-B grubunda ise 19720 CD4+IL-22+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$). Şekil 4.39.D’de CD4+ hücrelerin IL-6’nin ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 1299 ve Sch-B grubunda ise 1172 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.40.A’de hücrelerin p-ERK1/2’nin ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 227 ve Sch-B grubunda ise 3303 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.40.B’de hücrelerin p-Stat3’ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 1140 ve Sch-B grubunun ise 1046 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.40.C’de hücrelerin p-P38’in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 411 ve Sch-B grubunun ise 335 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.40.D’de hücrelerin p-Smad2/3’ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 1162 ve Sch-B grubunun ise 1080 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.40.E’de hücrelerin p-Akt1/2’nin ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 10450 ve Sch-B grubunda ise 9983 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.39. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-22+ hücre sayılarının kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin CD4+IL-6+ ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; **** $p < 0,0001$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



Şekil 4.40. DLK'tan elde edilen lökositlerin p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında

karşılaştırılması, E) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile Sch-B grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.2. Alantolakton'un MS'e Etkisi

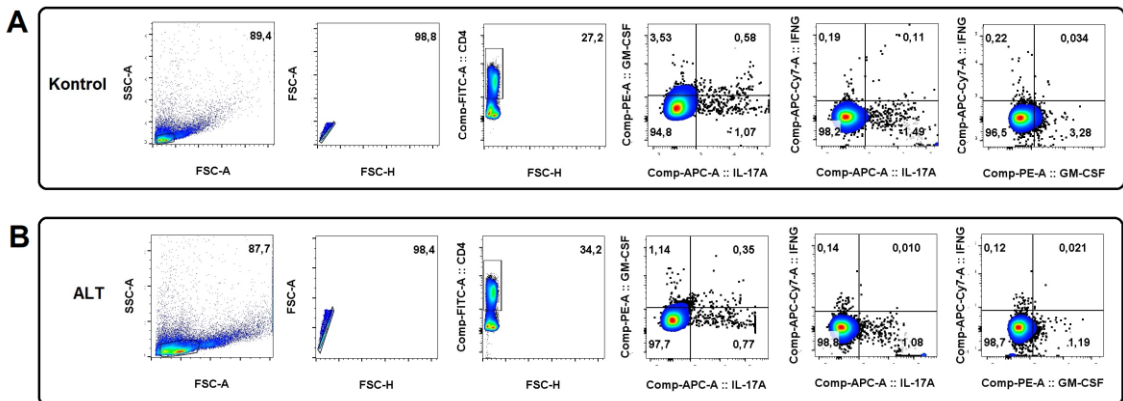
MS hastalığının sebebi olan otoreaktif T hücrelerinin neden oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Otoreaktif T hücrelerinin aktive olup drene lenf nodlarına gelip buradan MSS'e gitmektedir. MSS'ne infiltre olan T hücreleri MS oluşmasına sebep olmaktadır.

4.2.1. Alantolakton'un Priminge etkisi

Bu çalışmada drene lenf noduna toplanan T hücrelerine ALT'nin etkisinin olup olmadığı test edilmiştir. Aynı zamanda bu dönemde dalaktaki T hücrelerine etkisi de test edildi. İmmünizasyonun 7. günü kontrol ve 15 mg/kg ALT'nin ip. olarak verilen gruplardan 3'er adet fare servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Farelerin inguinal lenf nodları (LN) ve dalakları (DLK) toplandı ve daha sonra akım sitometri ile analiz edilmiştir.

4.2.1.1. Alantolakton'un İnguinal Lenf Noduna Etkisi

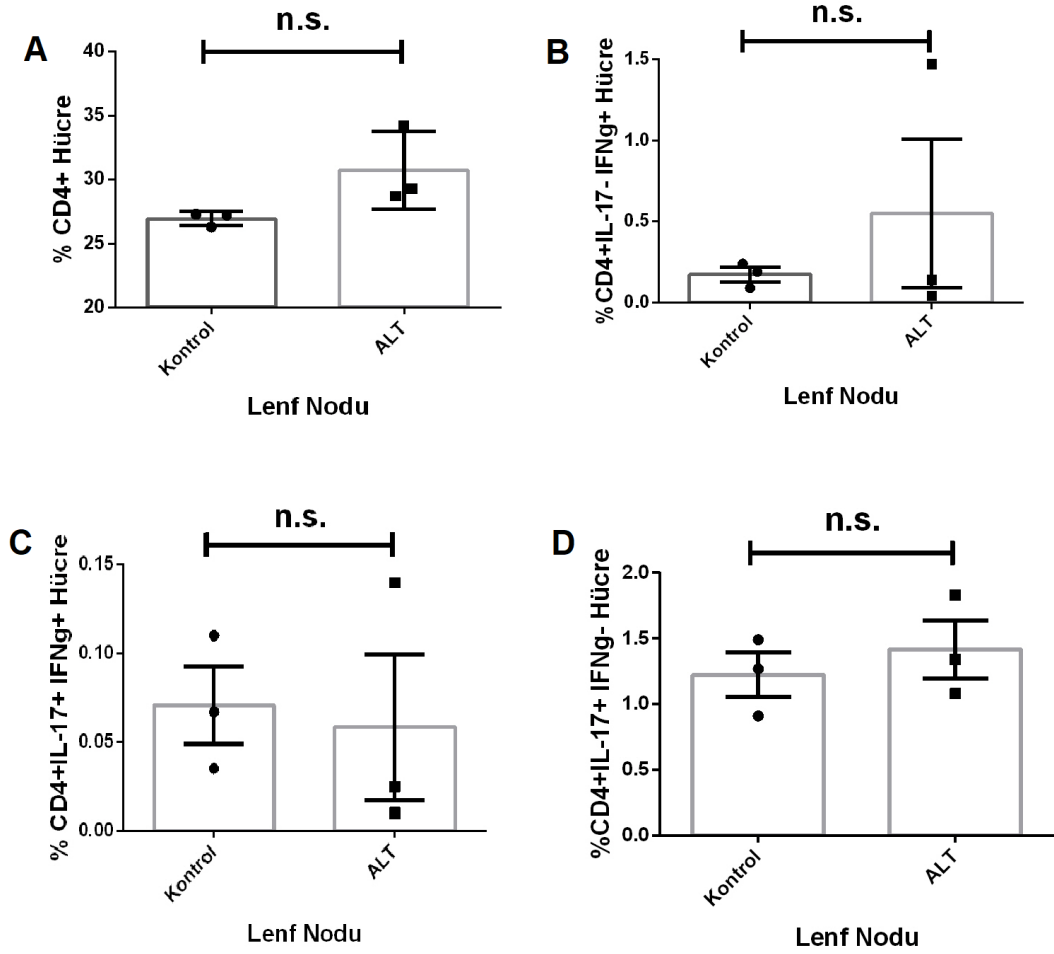
LN'dan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.41'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.41. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A)

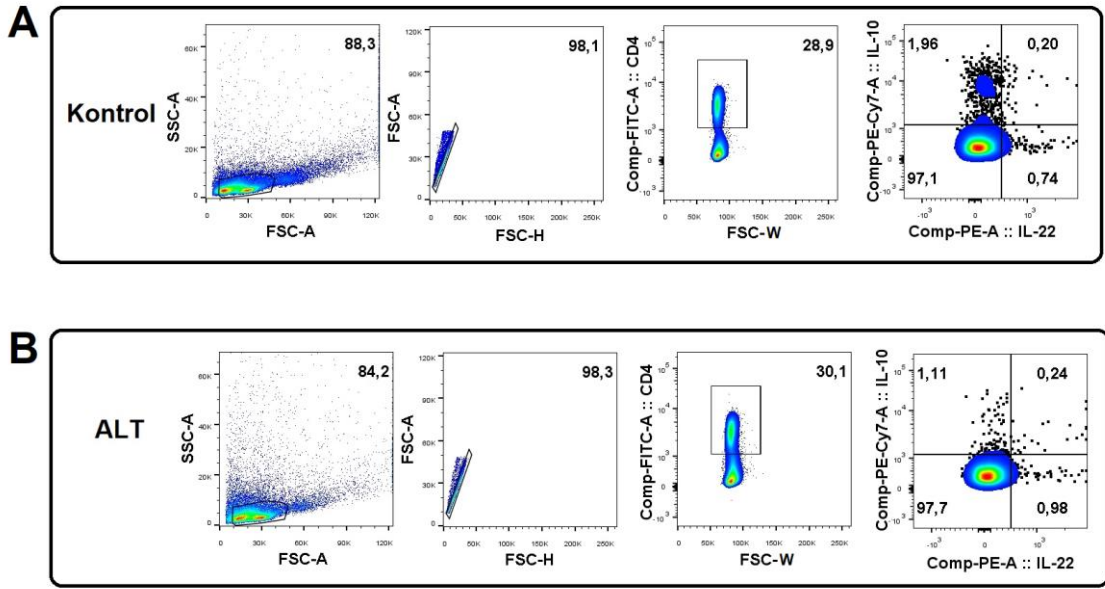
Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area, ALT: Alantolakton)

LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.42'de gösterilmiştir. Şekil 4.42.A'da CD4+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %26,93 ve ALT grubunun ise %30,73 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.42.B'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,18 ve ALT grubunun ise %0,55 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.42.C'de CD4+IL-17+IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,071 ve ALT grubunun ise %0,058 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.42.D'de CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,22 ve ALT grubunun ise %1,41 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



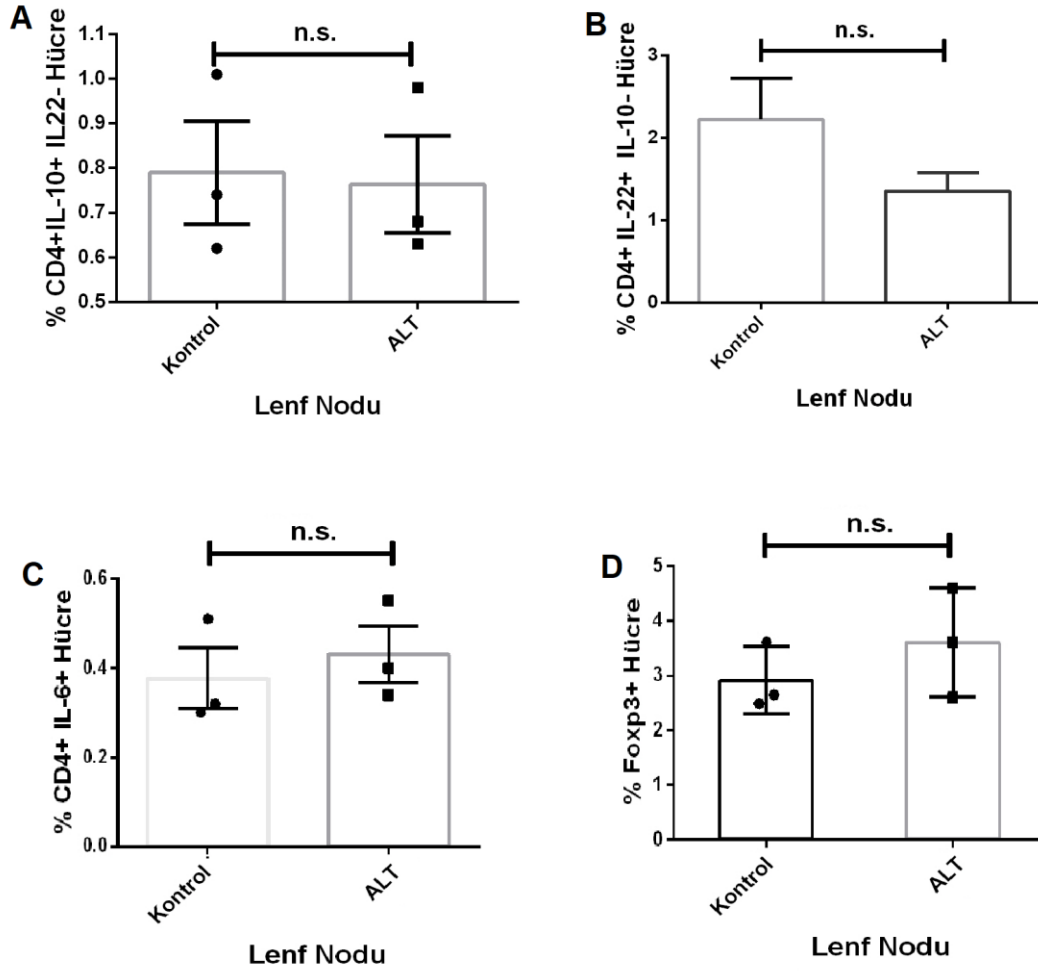
Şekil 4.42. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+IFN- γ + hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'dan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.43'te boyanan lökositlerinin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.43. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerinin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

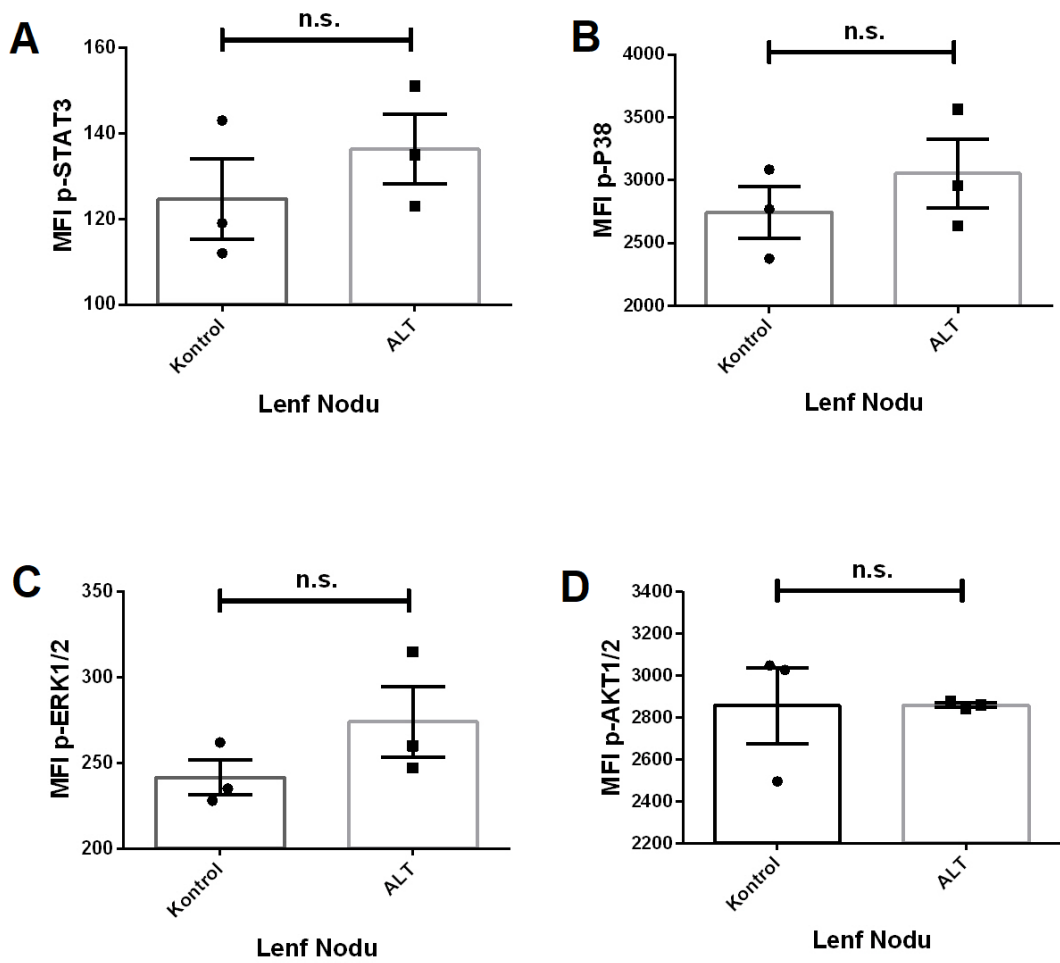
LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, IL-22-PE, Foxp3-*Pacific Blue*, ve IL-6-PE ile boyanmış ve Şekil 4.44'de gösterilmiştir. Şekil 4.44.A'da CD4+IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,79 ve ALT grubunun ise %0,76 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.44.B'de CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %2,22 ve ALT grubunun ise %1,36 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.44.C'de CD4+IL-6+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,38 ve ALT grubunun ise %0,43 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.44.C'de CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %2,9 ve ALT grubunun ise %3,6 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.44. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, IL-22-PE, Foxp3-*Pacific Blue*, ve IL-6-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+IL-22- hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-16+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'daki lökositler p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil 4.45'te gösterilmiştir. Şekil 4.45.A'da lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.45.B'de hücrelerin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 2744 ve ALT grubunun ise 3054 olarak

bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.45.C’de hücrelerin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 241 ve ALT grubunun ise 274 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.45.D’de hücrelerin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 2858 ve ALT grubunda ise 2861 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

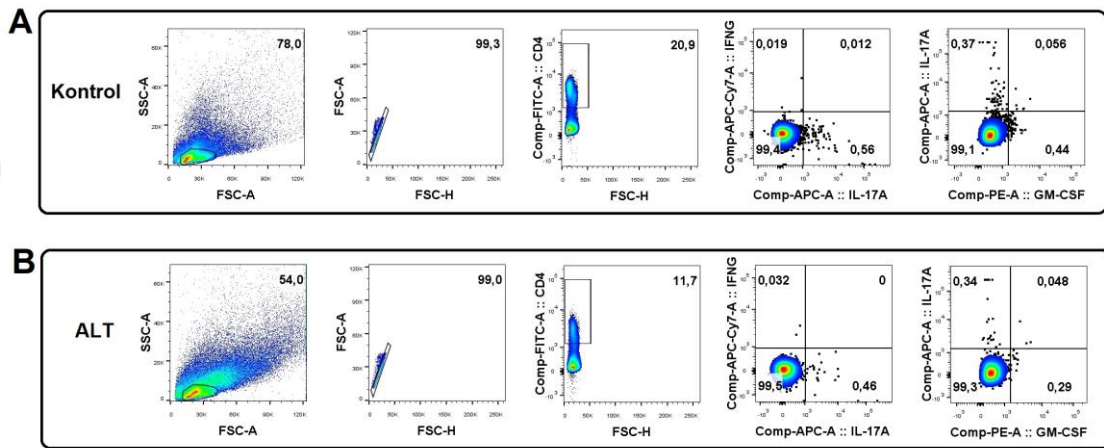


Şekil 4.45. LN’den elde edilen lökositlerin p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2

ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.2.1.2. Alantolakton'un Dalağa Etkisi

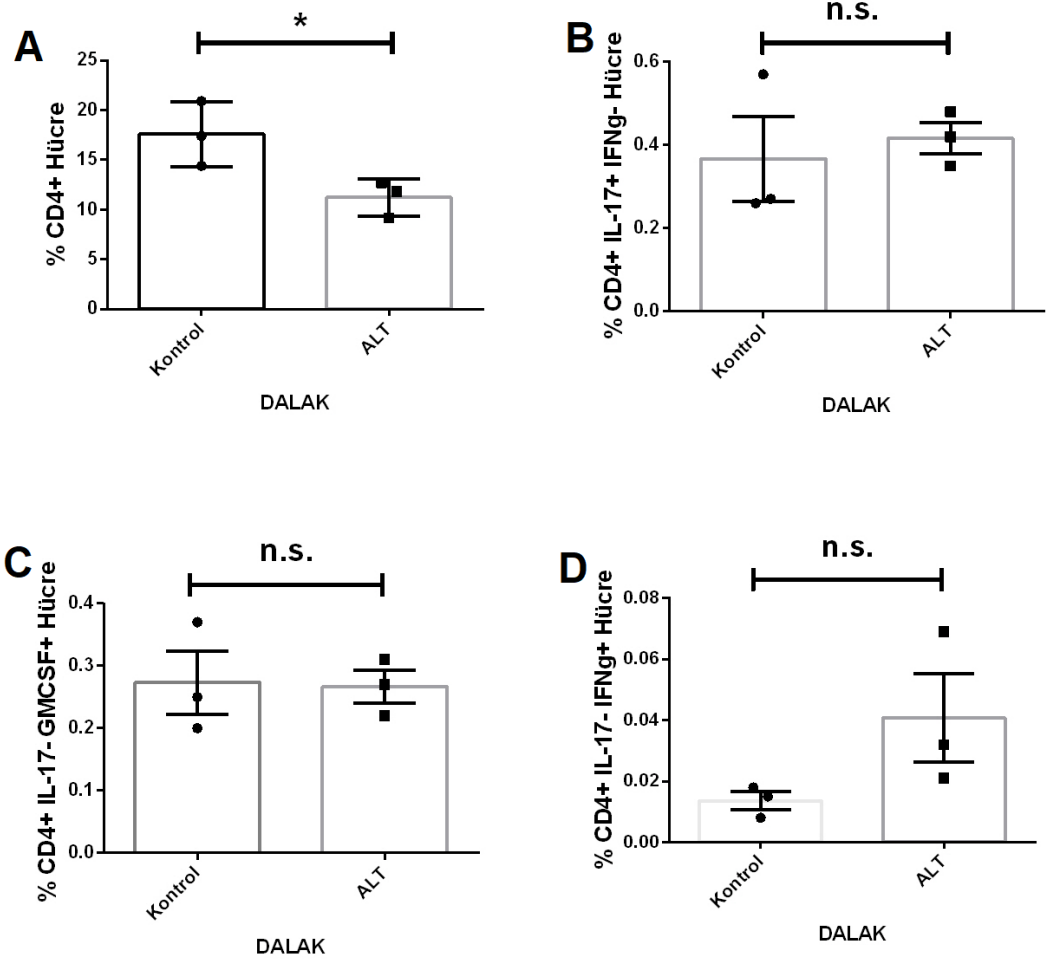
DLK'tan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.46'da boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.46. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

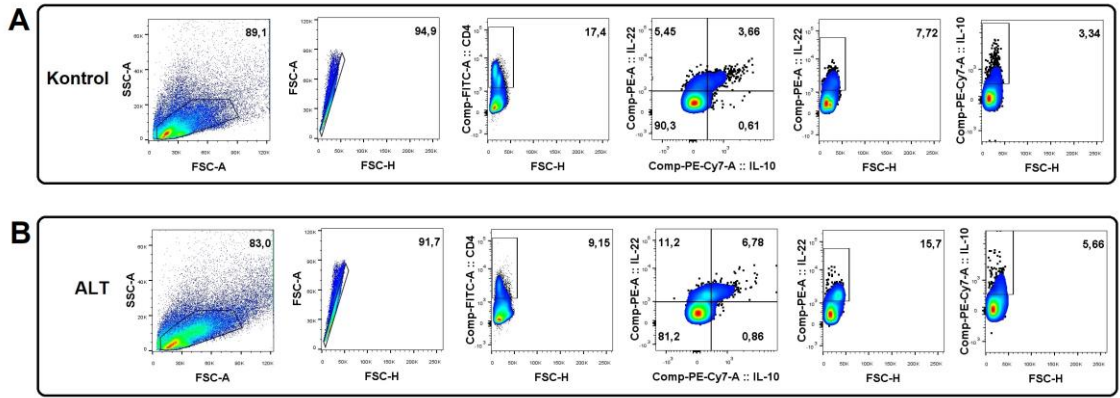
DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.47'de gösterilmiştir. Şekil 4.47.A'da CD4+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %17,57 ve ALT grubunun ise %11,22'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.042$). Şekil 4.47.B'de CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,37 ve ALT grubunun ise %0,41 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.47.C'de CD4+IL-17-GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,27 ve ALT grubunun ise %0,26 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.47.D'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında

karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,014 ve ALT grubunun ise %0,040 olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



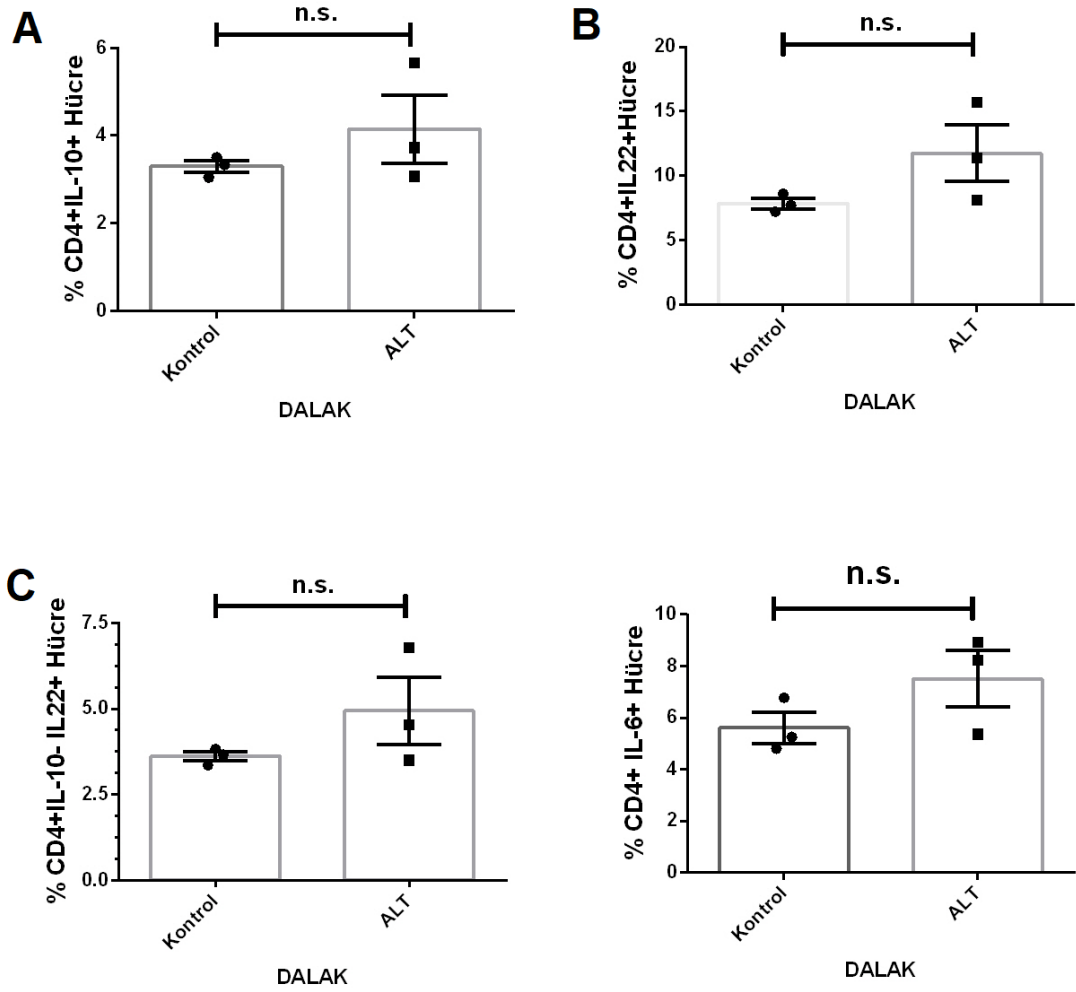
Şekil 4.47. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17+ IFN- γ - hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17- GM-CSF+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p<0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

DLK'tan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.48'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.48. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılma stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılma stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılma stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

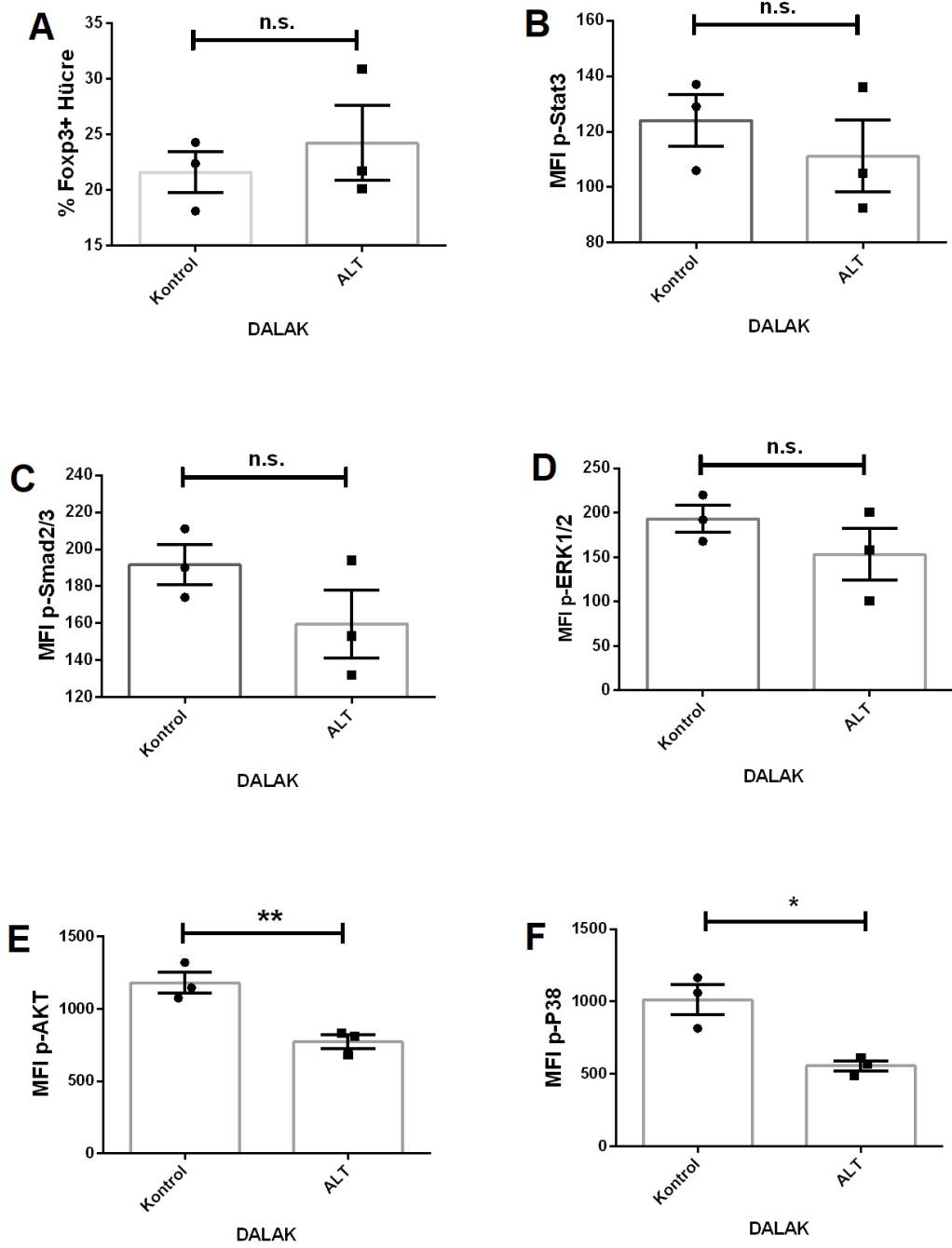
DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, IL-22-PE ve IL-6-PE ile boyanmış ve Şekil 4.49'da gösterilmiştir. Şekil 4.49.A'da CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %3,29 ve ALT grubunun ise %4,15 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.49.B'de CD4+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %7,8 ve ALT grubunun ise %11,8 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.49.C'de CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %3,61 ve ALT grubunun ise %4,94 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.49.D'de CD4+IL-6+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %5,61 ve ALT grubunun ise %7,5 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.49. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, IL-22-PE ve IL-6-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-22+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-10-IL-22+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-6+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

DLK'taki lökositler CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue*, p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil 4.50'de gösterilmiştir. Şekil 4.50.A'de CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %14,9 ve ALT grubunun ise %16,6 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.50.B'da lökosit hücrelerinde p-Stat3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda

MFI 124 ve ALT grubunda ise 111 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.50.C'de lökosit hücrelerinde p-Smad2/3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 191 ve ALT grubunda ise 159 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.50.D'da hücrelerin p-ERK1/2'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 193 ve ALT grubunun ise 153 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.50.E'de hücrelerin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI değeri 1180 ve ALT grubunda ise 773'tür ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.009$). Şekil 4.50.F'de hücrelerin p-P38'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 1013 ve ALT grubunun ise 557'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.014$).



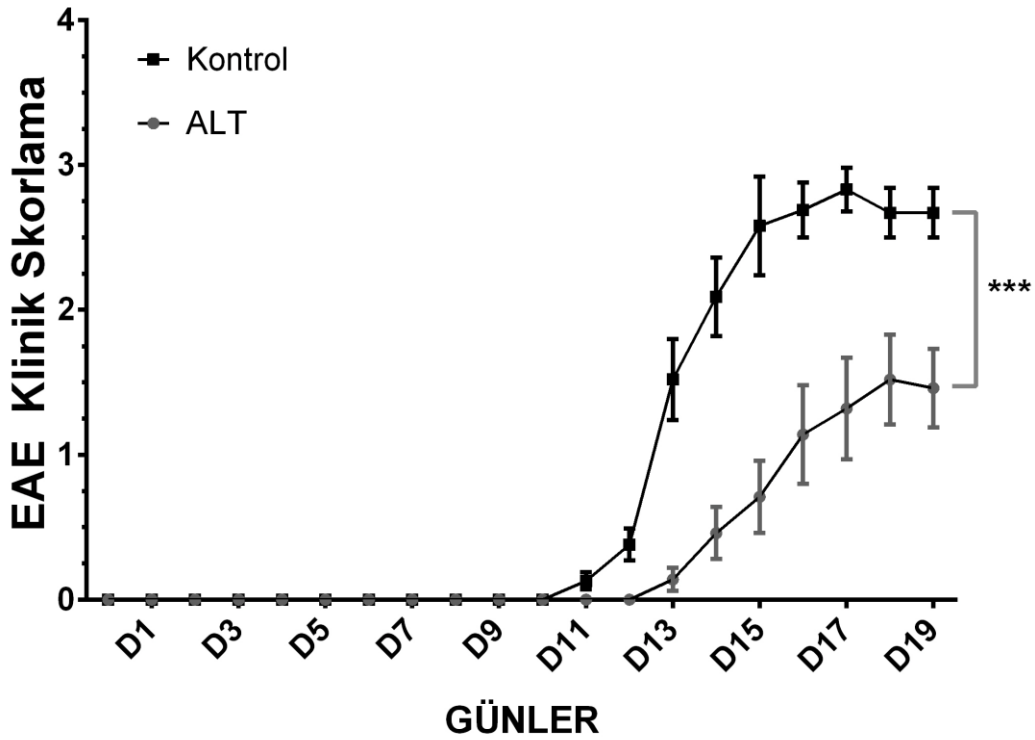
Şekil 4.50. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-Pacific Blue, p-Smad2/3-PE ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi. A) CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması B) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, E) Lökosit hücrelerinin

p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, F) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması.* $p<0.05$; ** $p<0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.2.2. Alantolakton'un MSS etkisi

4.2.2.1. Alantolakton'un MS klinik Skorlaması

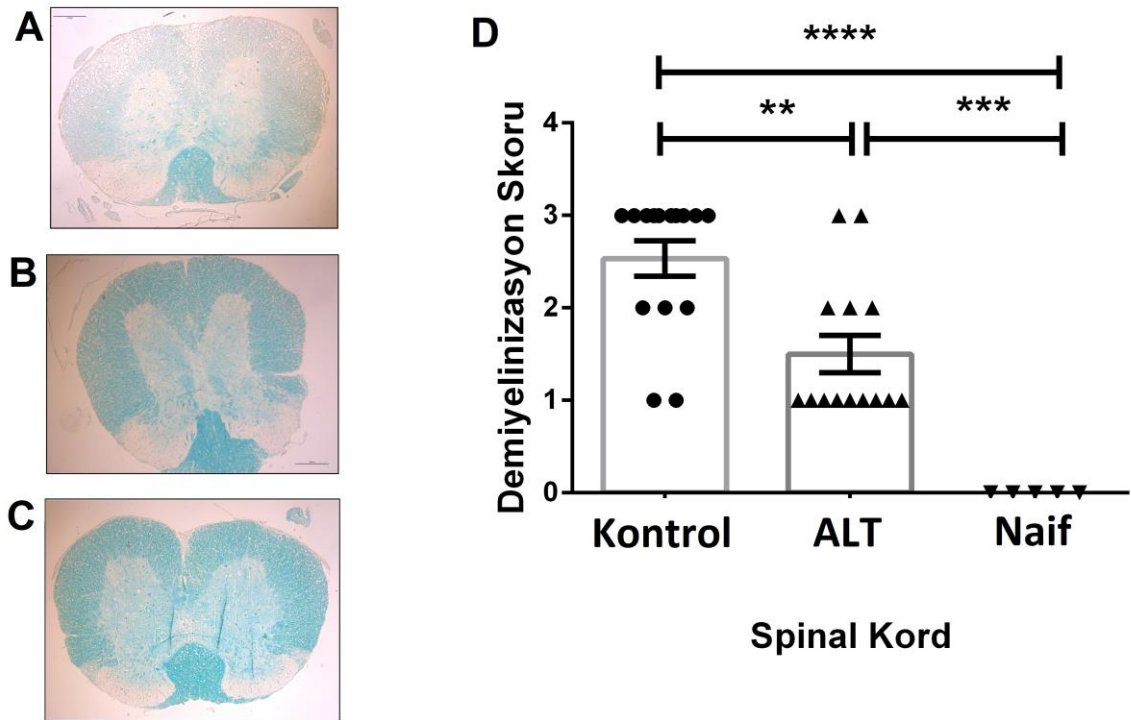
C57BL6 farelerin immünizasyonundan sonra MS klinik skorlanmasına başlanmıştır. Kontrol grubunda 16 ve ALT grubunda ise 14 fare her gün klinik olarak skorlanmıştır (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. C57BL6 farelerinin MS klinik skorlaması. Kontrol (n:16) ve ALT (n:14) gruplarının karşılaştırılması. *** $p<0.001$; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis, ALT: Alantolakton, D: Gün.

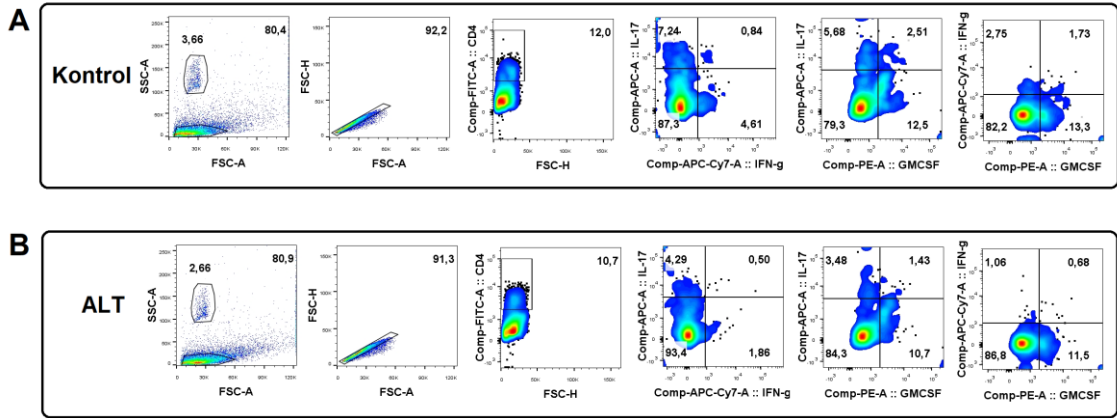
4.2.2.2. Alantolakton'un Demiyelinizasyona Etkisi

C57BL6 farelerinin immünizasyondan 19. gün sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Daha sonra farelerin spinal kordları çıkarılıp luxol fast blue ile boyanmıştır. Daha sonra skorlaması yapılmıştır (Şekil 4.52). Luxol fast blue miyelinleri maviye boyamaktadır. Şekil 4.52.A'da kontrol grubu farenin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon görülmektedir. Şekil 4.52.B'de ALT grubu farenin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon görülmektedir. Şekil 4.52.C'de Naif (Sağlıklı fare) grubu farenin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon görülmektedir. Şekil 4.52.D'de kontrol, ALT ve Naif grubu farelerinin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon skorlaması görülmektedir.



Şekil 4.52. C57BL6 farelerinin demiyelinizasyon skorlaması. A) Kontrol grubu farenin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon B) ALT grubu farenin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon C) Naif (Sağlıklı fare) grubu farenin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon D) Kontrol, ALT ve Naif grubu farelerinin spinal kordunda meydana gelen demiyelinizasyon skorlaması gruplarının karşılaştırılması. ** p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001.

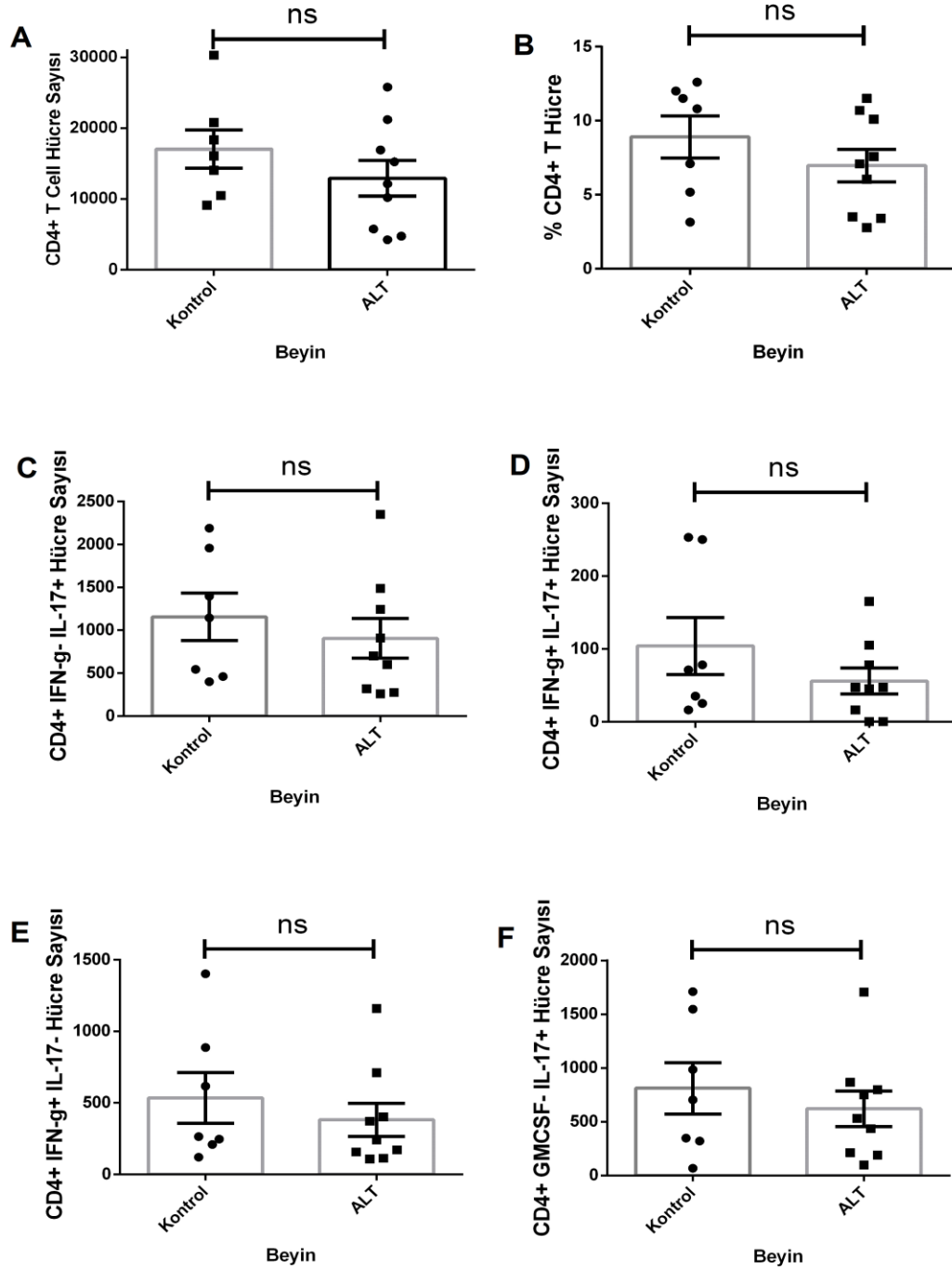
4.2.2.3. Alantolakton'un MSS'e infiltre olan T hücrelerine Etkisi



Şekil 4.53. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

Beyindeki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.54'te gösterilmiştir. Şekil 4.54.A'da CD4+T hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 17034 ve ALT grubunda ise 12900 CD4+T hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.54.B'de CD4+T hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %8,91 ve ALT grubunun ise %6,96 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.54.C'de CD4+IL-17+IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1156 ve ALT grubunda ise 905 CD4+IL-17+IFN- γ - hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.54.D'de CD4+IL-17+IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 104 ve ALT grubunda ise 55 CD4+IL-17+IFN- γ + hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.54.E'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 535 ve ALT grubunda ise 381 CD4+IL-17-IFN- γ + hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak

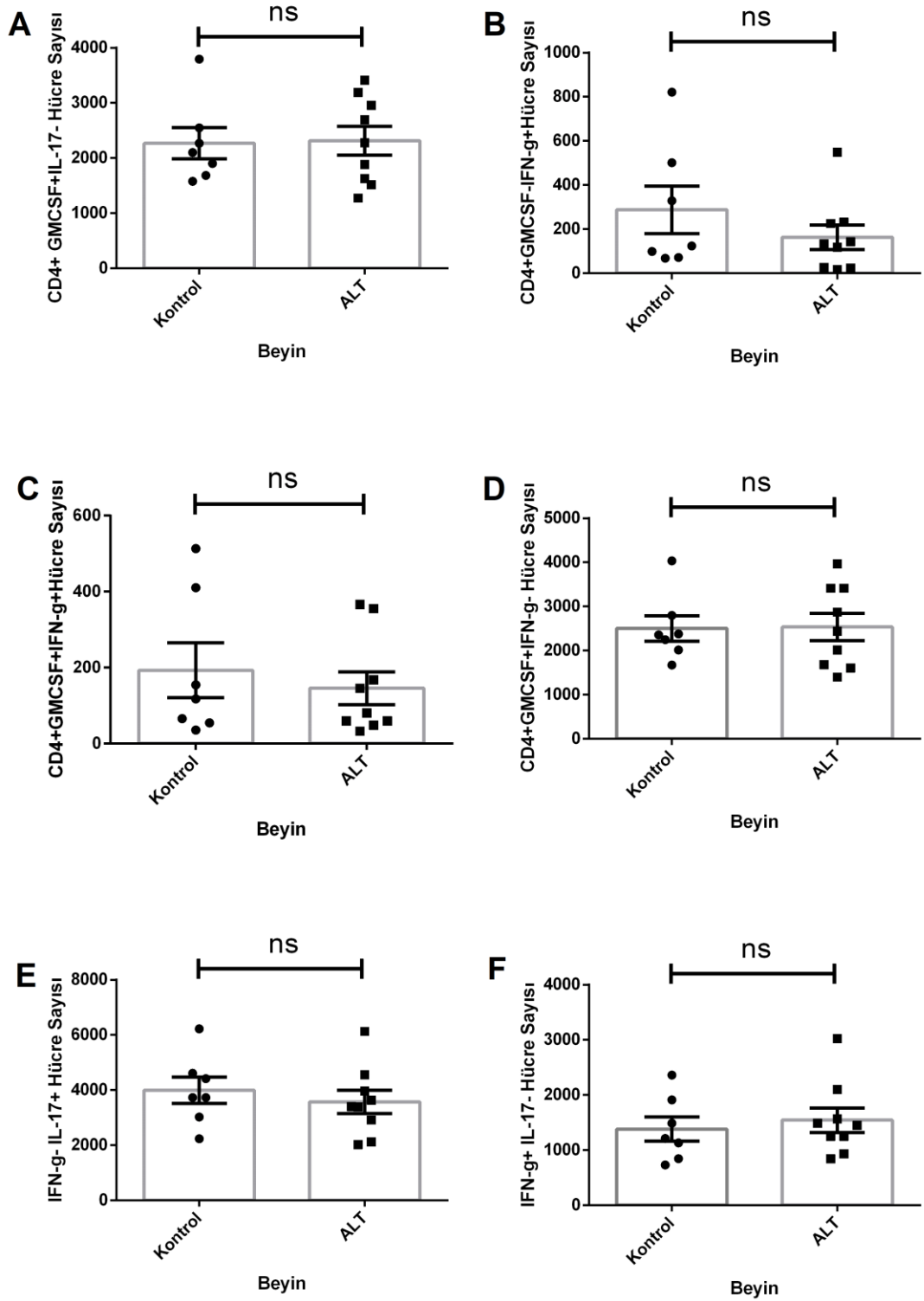
anlamli bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.54.E’de CD4+IL-17+GM-CSF- hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 811 ve ALT grubunda ise 621 CD4+IL-17+GM-CSF- hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.54. Beyin’den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+ T hücre sayılarının kontrol ile ALT

grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+ T hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+ IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17+ IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, E) CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, F) CD4+IL-17+GM-CSF- hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

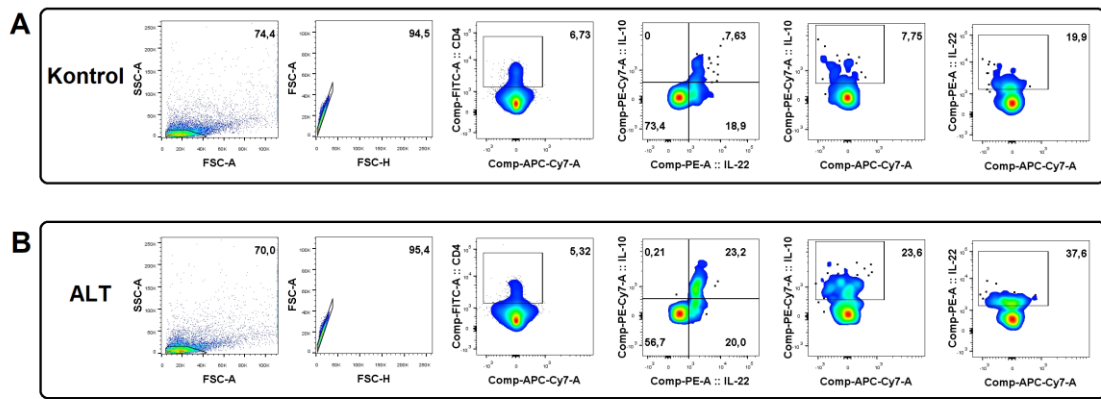
Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.55'te gösterilmiştir. Şekil 4.55.A'da CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 2268 ve ALT grubunda ise 2315 CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.55.B'de CD4+ IFN- γ +GM-CSF- hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 287 ve ALT grubunda ise 162 CD4+ IFN- γ +GM-CSF- hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.55.C'da CD4+ IFN- γ +GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 193 ve ALT grubunda ise 145 CD4+ IFN- γ +GM-CSF+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.55.D'de CD4+ IFN- γ -GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 2500 ve ALT grubunda ise 2534 CD4+IFN- γ +GM-CSF- hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.55.E'da total IL-17+IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 3995 ve ALT grubunda ise 3572 total IL-17+IFN- γ - hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.55.F'de total IL-17-IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1382 ve ALT grubunda ise 1544 total IL-17-IFN- γ + hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.55. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+GM-CSF-IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+GM-CSF+IFN- γ +

hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+GM-CSF+IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, E) IL-17+IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, F) IL-17-IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Beyin'den elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.56'da boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.

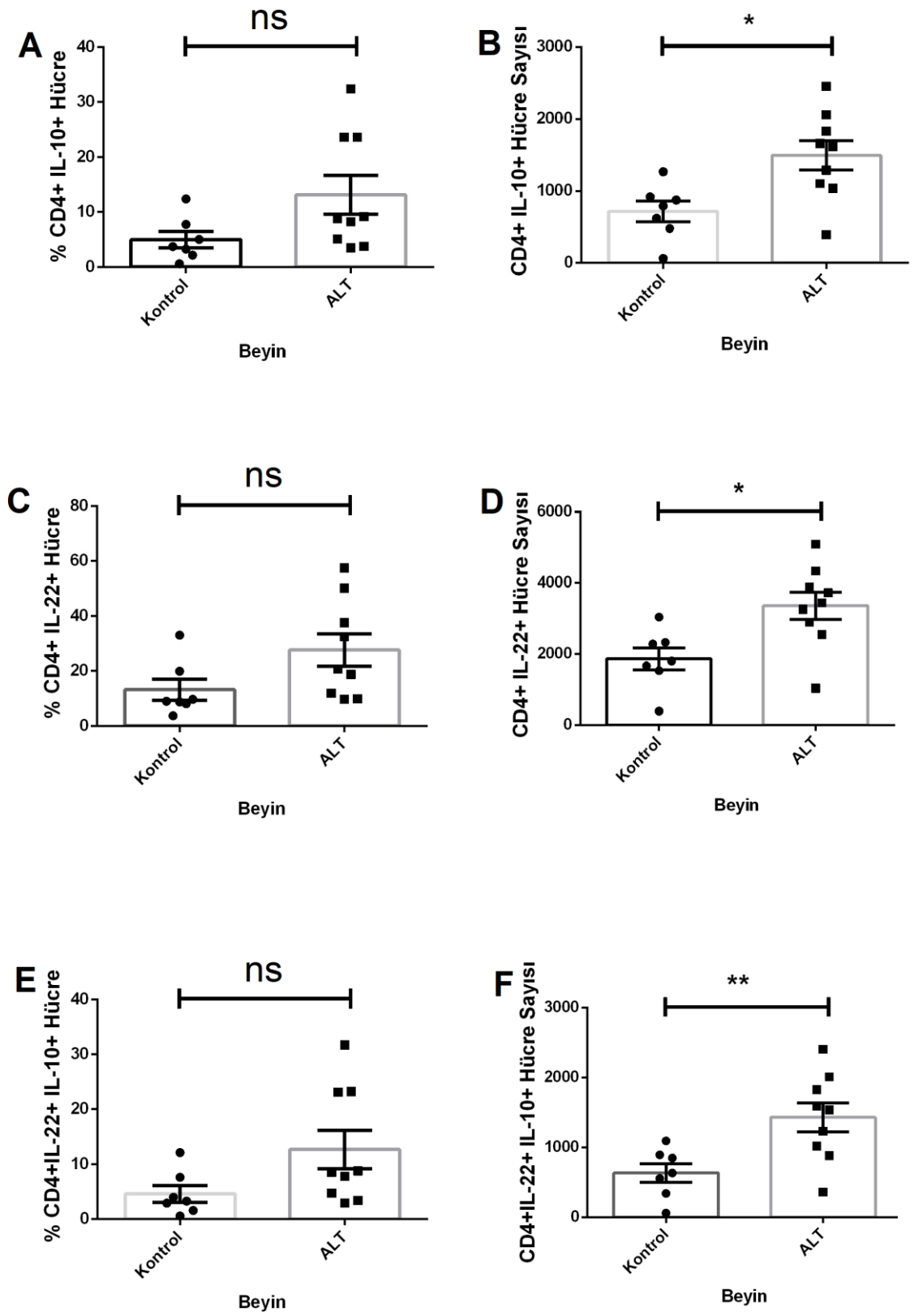


Şekil 4.56. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

Beyin'deki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.57'de gösterilmiştir. Şekil 4.57.A'da CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %4,98 ve ALT grubunun ise %13,13 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.07$). Şekil 4.57.B'de CD4+IL-10+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 715 ve ALT grubunda ise 1491 CD4+IL-10+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$). Şekil 4.57.C'de CD4+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %13,16 ve ALT grubunun ise %27,63 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.07$). Şekil 4.57.D'de CD4+IL-22+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1865 ve ALT grubunda ise 3358 CD4+IL-22+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunmuştur ($p=0.012$). Şekil 4.57.E’de CD4+IL-22+IL-10+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %4,58 ve ALT grubunun ise %12,69 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.07$). Şekil 4.57.F’de CD4+IL-22+IL-10+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 632 ve ALT grubunda ise 1430 CD4+IL-22+IL-10+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.009$).

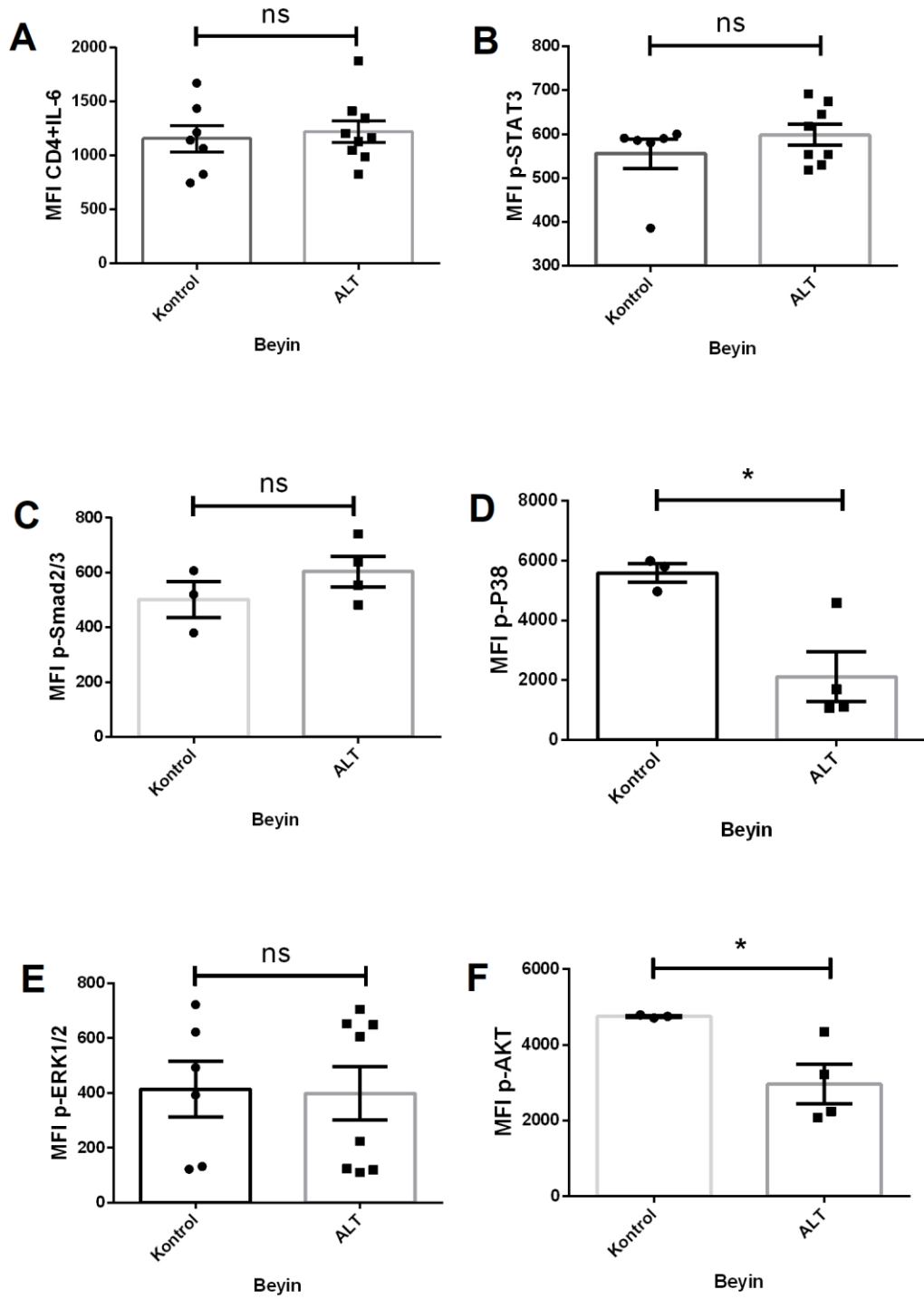




Şekil 4.57. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu

arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-22+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-22+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, E) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, F) CD4+IL-10+IL-22+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Beyin'deki lökositler CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE, p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil 4.58'de gösterilmiştir. Şekil 4.58.A'de CD4+IL-6+ ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 1159 ve ALT grubunda ise 1224 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.58.B'da hücrelerin p-Stat3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 555 ve ALT grubunda ise 598 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.58.C'de hücrelerin p-Smad2/3'ün ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 503 ve ALT grubunda ise 604 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.58.D'de hücrelerin p-P38'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 5587 ve ALT grubunun ise 2113'tür ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.019$). Şekil 4.58.E'de hücrelerin p-ERK1/2'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 414 ve ALT grubunda ise 399 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.58.F'de hücrelerin p-Akt1/2'in ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 4750 ve ALT grubunun ise 2970'tir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.034$).



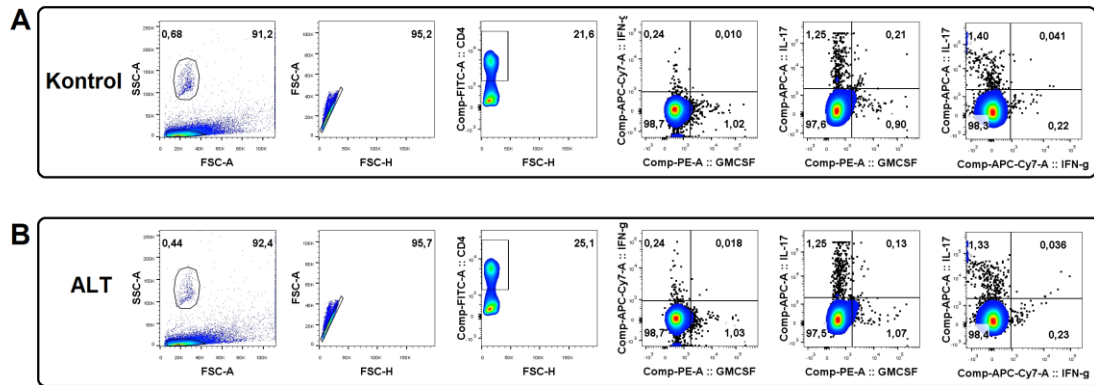
Şekil 4.58. Beyin'den elde edilen lökositlerin CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue* ve IL-6-PE, p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-6+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-Smad ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında

karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, E) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, F) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.2.3. Alantolakton'un Lenf Noduna etkisi

C57BL6 farelerinin immünizasyondan 19 gün sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen farelerin İnguinal lenf nodları toplanmıştır. Stariner yardımıyla hücreler süspanse hale getirilip, çeşitli antikorlar ile boyanmıştır. Akım sitometri yardımıyla hücreler analiz edilmiştir.

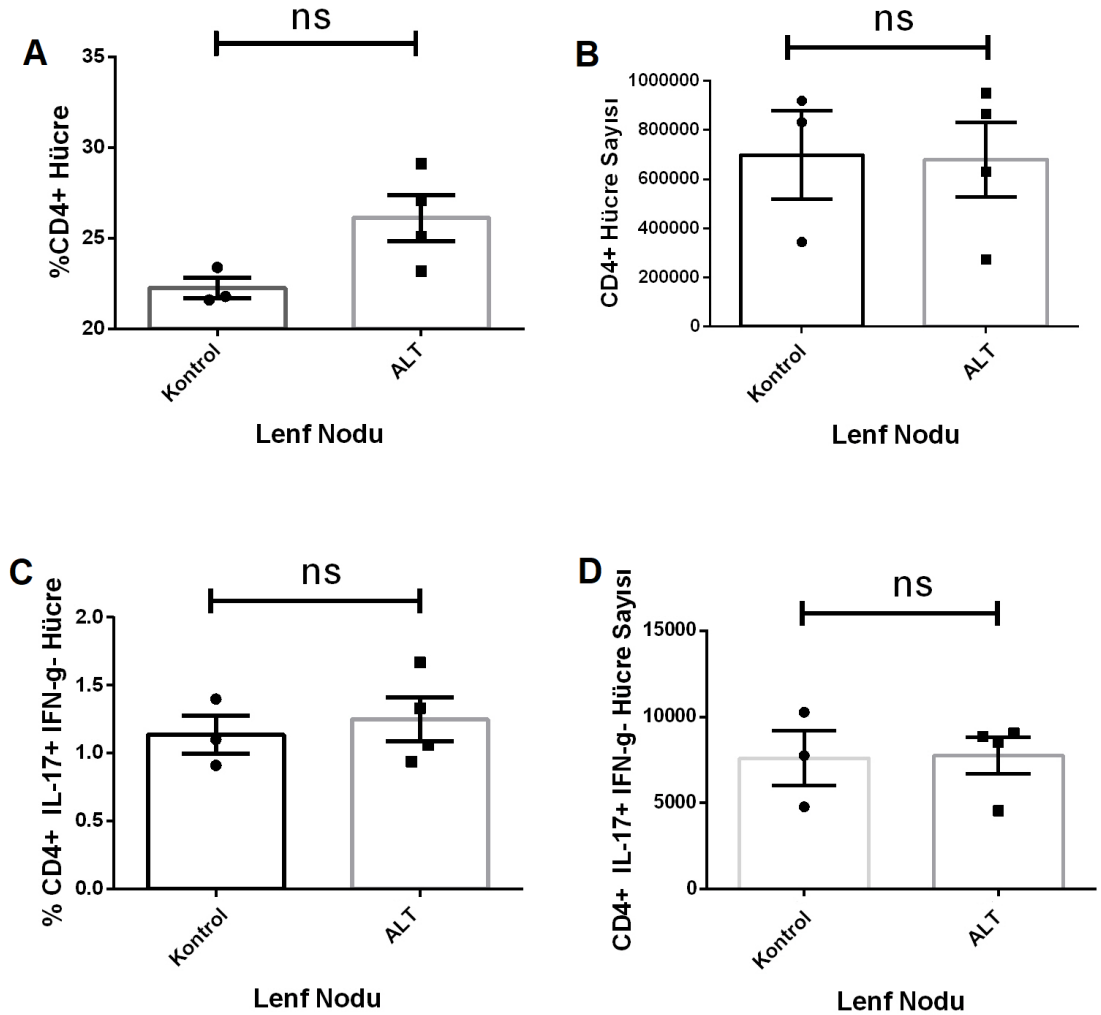
LN'dan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.59'da boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.59. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.60'ta gösterilmiştir. Şekil 4.60.A'da CD4+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %22,3 ve ALT grubunun ise %26,1 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.60.B'de CD4+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu

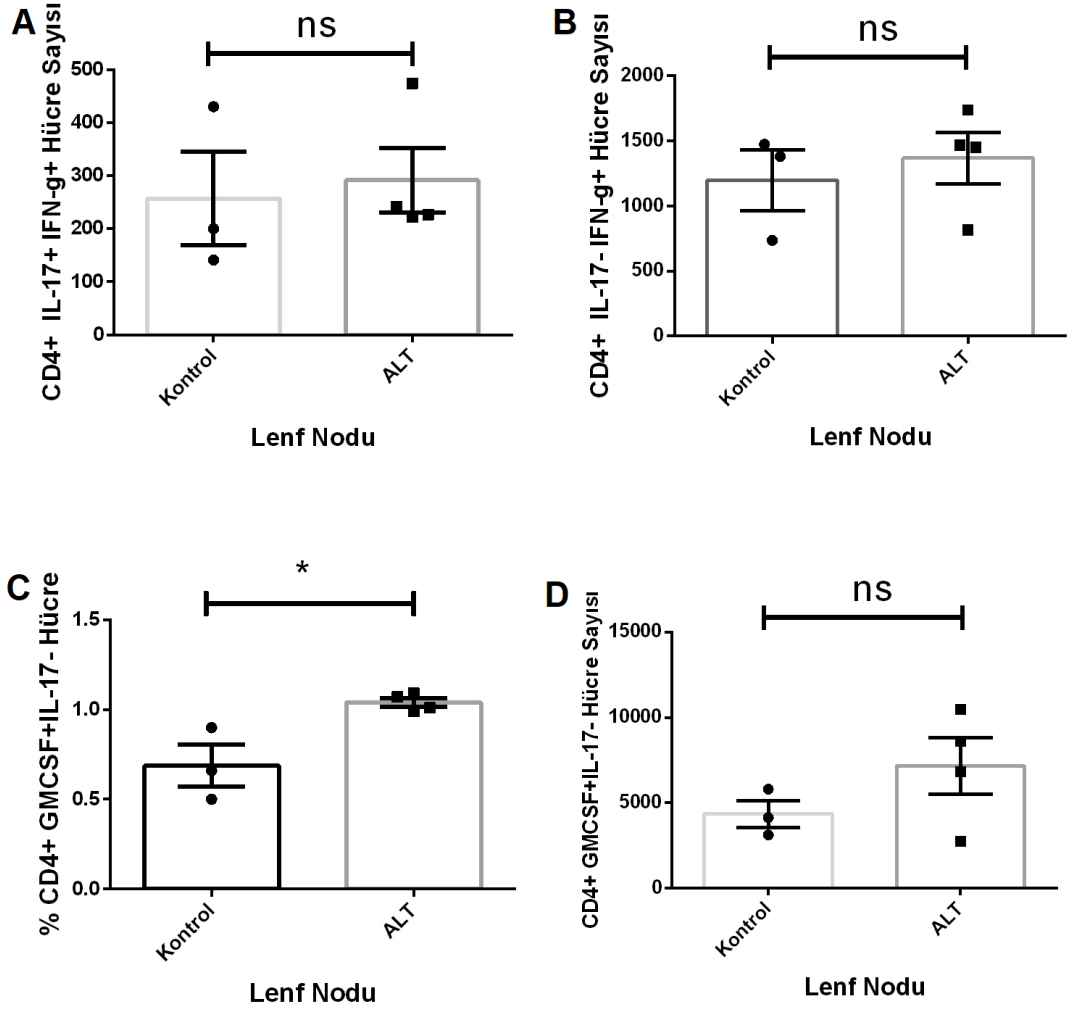
arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 698430 ve ALT grubunda ise 680495 CD4+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.60.C'de CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %1,14 ve ALT grubunun ise %1,25 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.60.D'de CD4+IL-17+IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 7600 ve ALT grubunda ise 7750 CD4+IL-17+IFN- γ - hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.60. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu

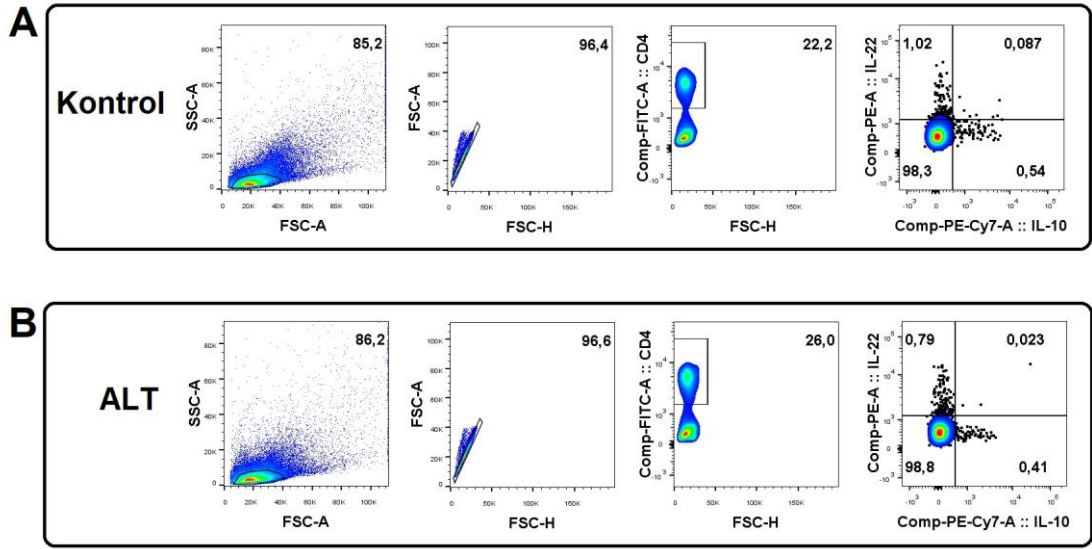
arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17+IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmış ve Şekil 4.61'de gösterilmiştir. Şekil 4.61.A'da CD4+IL-17+IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 257 ve ALT grubunda ise 291 CD4+IL-17+IFN- γ + hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.61.B'de CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 1196 ve ALT grubunda ise 1366 CD4+IL-17-IFN- γ + hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.61.C'de CD4+IL-17-GM-CSF+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,69 ve ALT grubunun ise %1,04'tür ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.017$). Şekil 4.61.D'de CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 4356 ve ALT grubunda ise 7169 CD4+IL-17-IFN- γ + hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



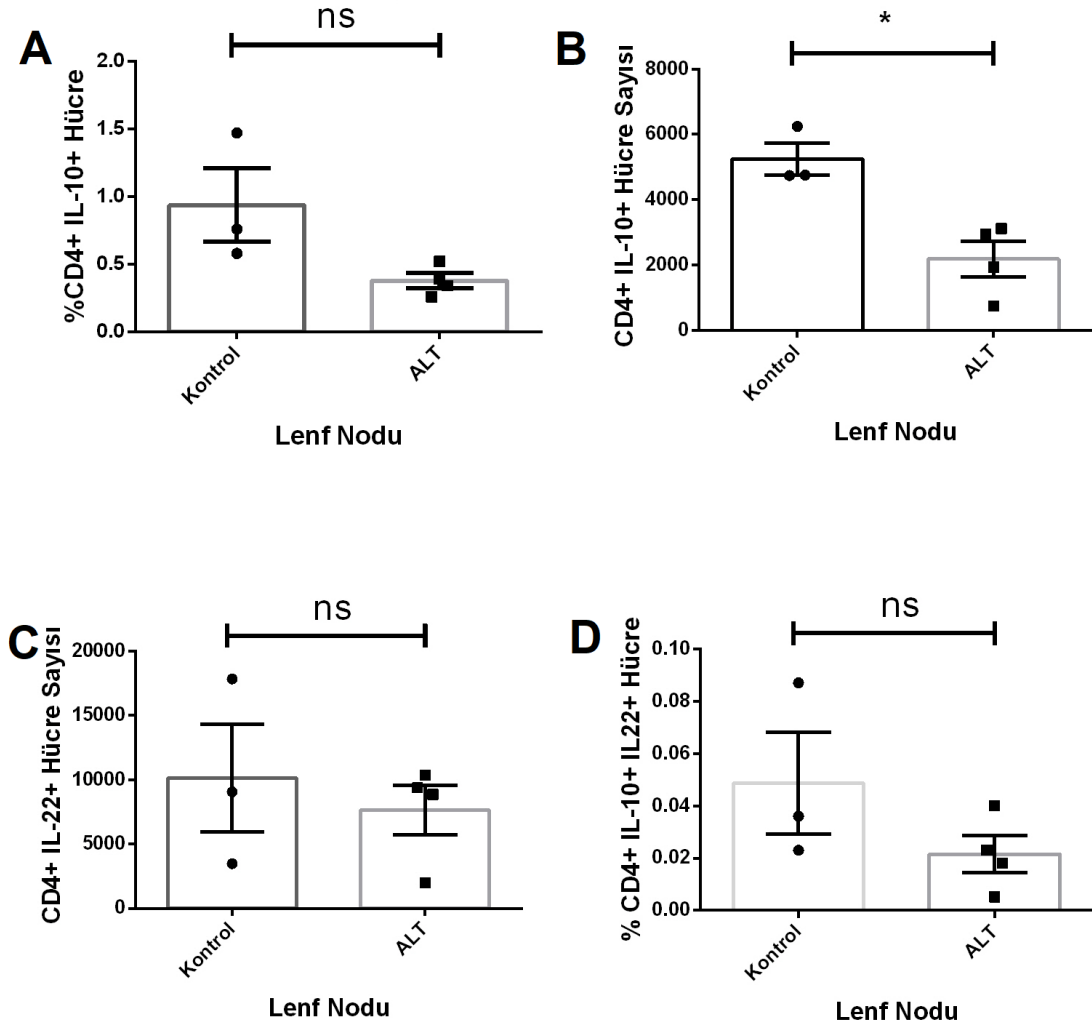
Şekil 4.61. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17-IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-17+ GM-CSF+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'dan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.62'de boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.62. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

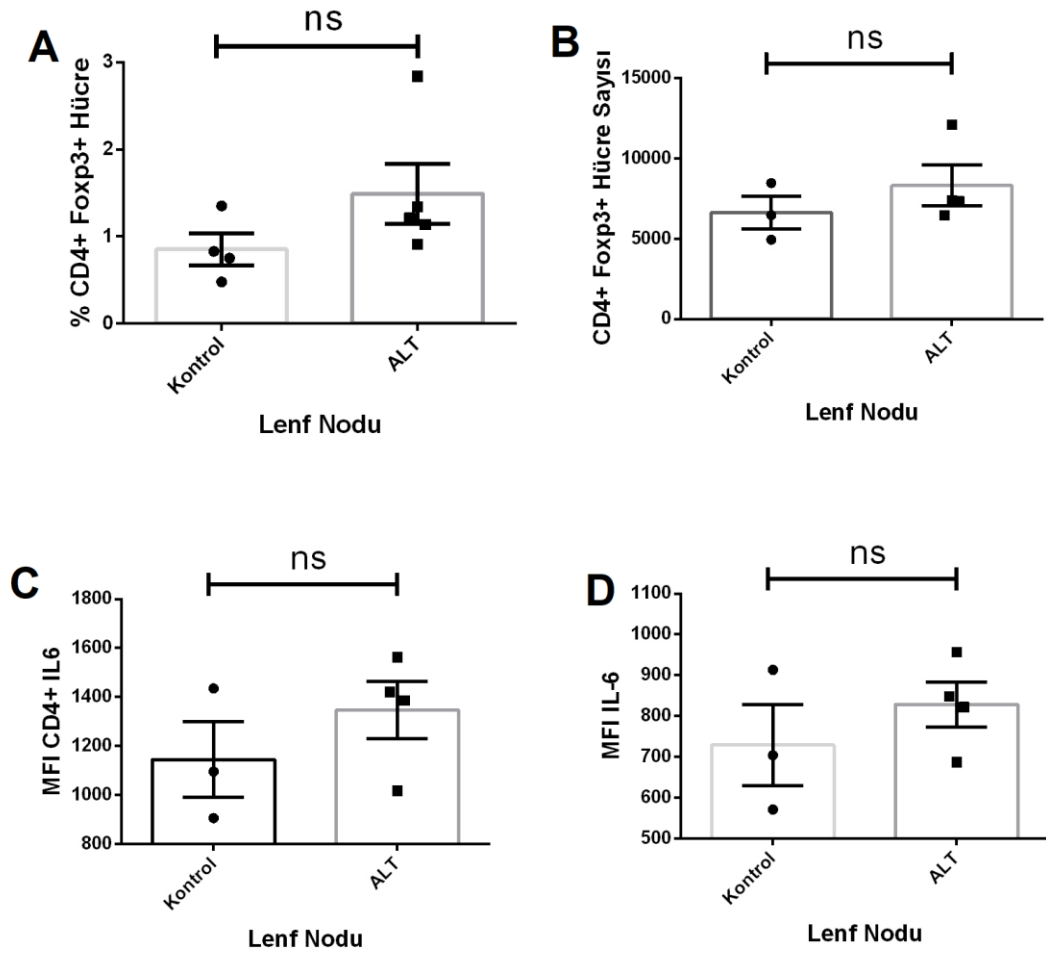
LN'daki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanmış ve Şekil 4.63'te gösterilmiştir. Şekil 4.63.A'da CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,94 ve ALT grubunun ise %0,38 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.07$). Şekil 4.63.B'de CD4+IL-10+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun grubunda 5248 ve ALT grubunda ise 2190 CD4+IL-10+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$). Şekil 4.63.C'de CD4+IL-22+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 10123 ve ALT grubunda ise 7649 CD4+IL-22+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.63.D'de CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,048 ve ALT grubunun ise %0,022 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



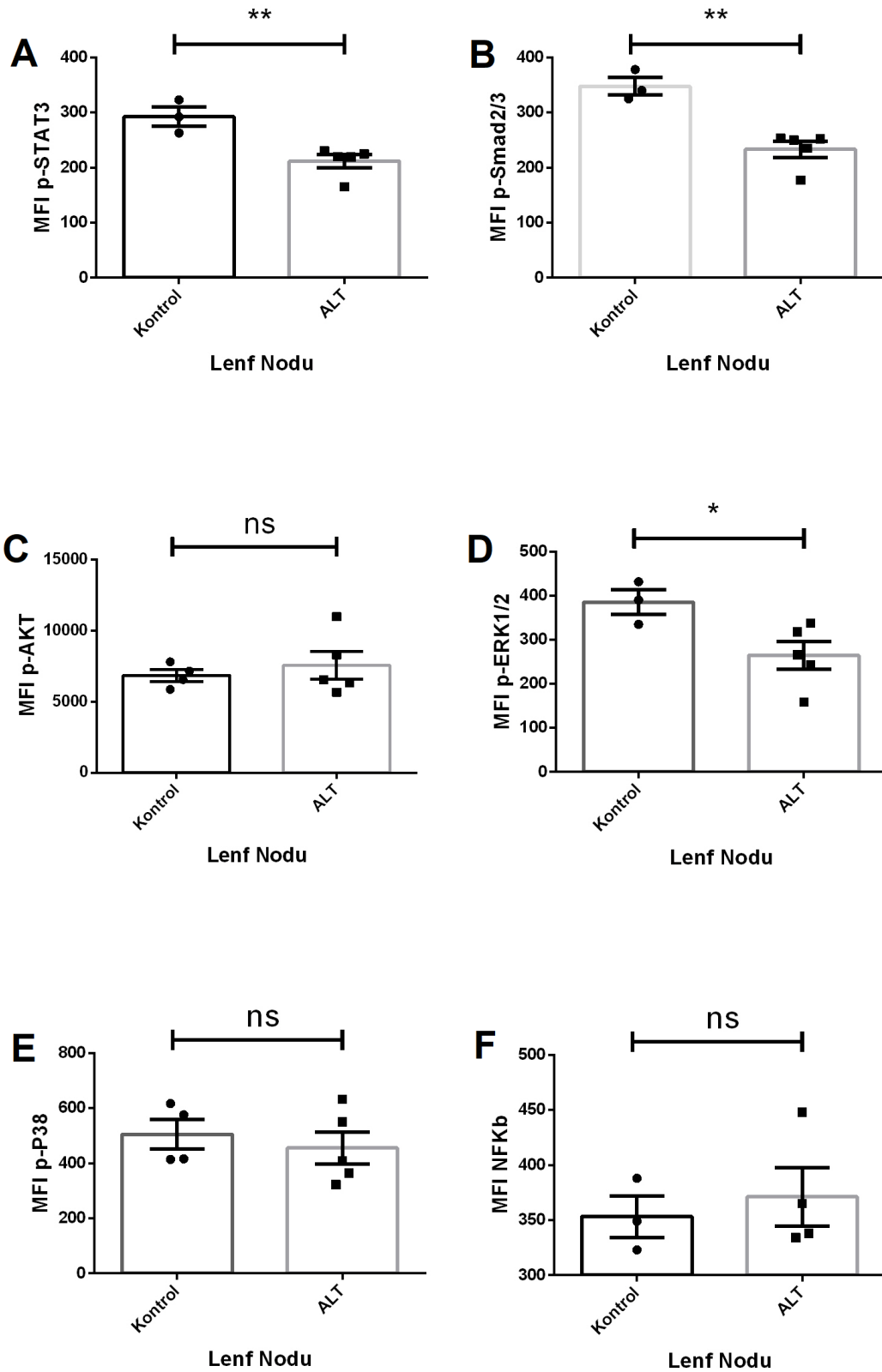
Şekil 4.63. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7 ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-10+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+ IL-22+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IL-10+IL-22+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

LN'daki lökositler CD4-FITC, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE, p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE, p-NF κ b-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil 4.64 ve Şekil 4.65'te gösterilmiştir. Şekil 4.64.A'da CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdeleri kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması %0,85 ve ALT grubunun ise %1,49 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Şekil 4.64.B'de CD4+Foxp3+

hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 6627 ve ALT grubunda ise 8317 CD4+Foxp3+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.64.C'da CD4+ hücrelerin IL-6 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 1146 ve ALT grubunda ise 1347 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.64.D'de hücrelerin IL-6 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 729 ve ALT grubunda ise 828 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.65.A'de hücrelerin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalaması 293 ve ALT grubunda ise 211'dir ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.007$). Şekil 4.65.B'de hücrelerin p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 348 ve ALT grubunun ise 233'tür ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.002$). Şekil 4.65.C'da hücrelerin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 6845 ve ALT grubunda ise 7567 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.65.D'de hücrelerin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 385 ve ALT grubunda ise 264'tür ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.04$). Şekil 4.65.E'de hücrelerin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 506 ve ALT grubunun ise 455 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.65.F'de hücrelerin p-NF κ b ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun ortalaması 353 ve ALT grubunun ise 371 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.64. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-6-PE ve Foxp3-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) CD4+ Foxp3+ hücrelerin yüzdelерinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+ Foxp3+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IL-6+ lökosit hücrelerinin ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) IL-6+ lökosit hücrelerinin ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



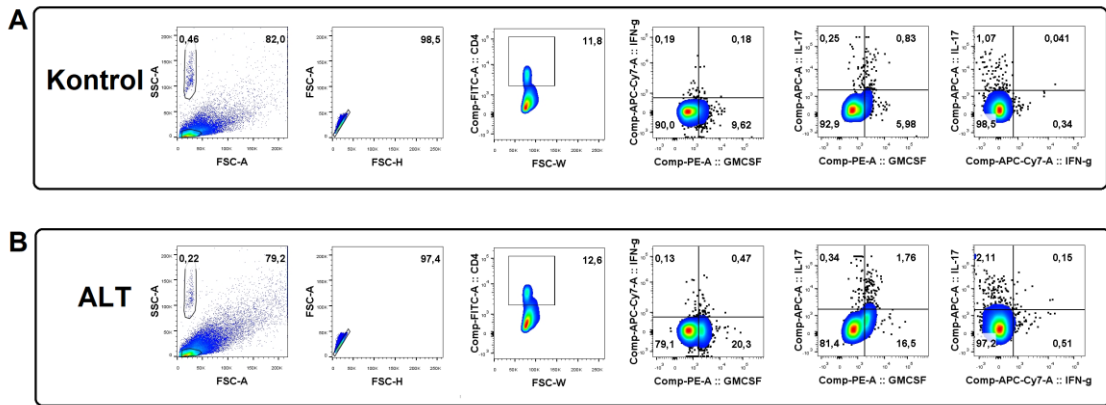
Şekil 4.65. LN'dan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-6-PE, p-Smad2/3-PE ve p-Stat3-FITC ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin

p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-ERK1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, E) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması F) Lökosit hücrelerinin p-NF κ b ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * p<0.05; ** p<0.01; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

4.2.3. Alantolakton'un Dalağa etkisi

C57BL6 farelerinin immünizasyondan 19 gün sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen farelerin dalakları çıkartılmıştır. Daha sonra stariner yardımıyla hücreler süspansiyon haline getirilip, çeşitli antikorlar ile boyanmıştır. Akım sitometri yardımıyla hücreler analiz edilmiştir.

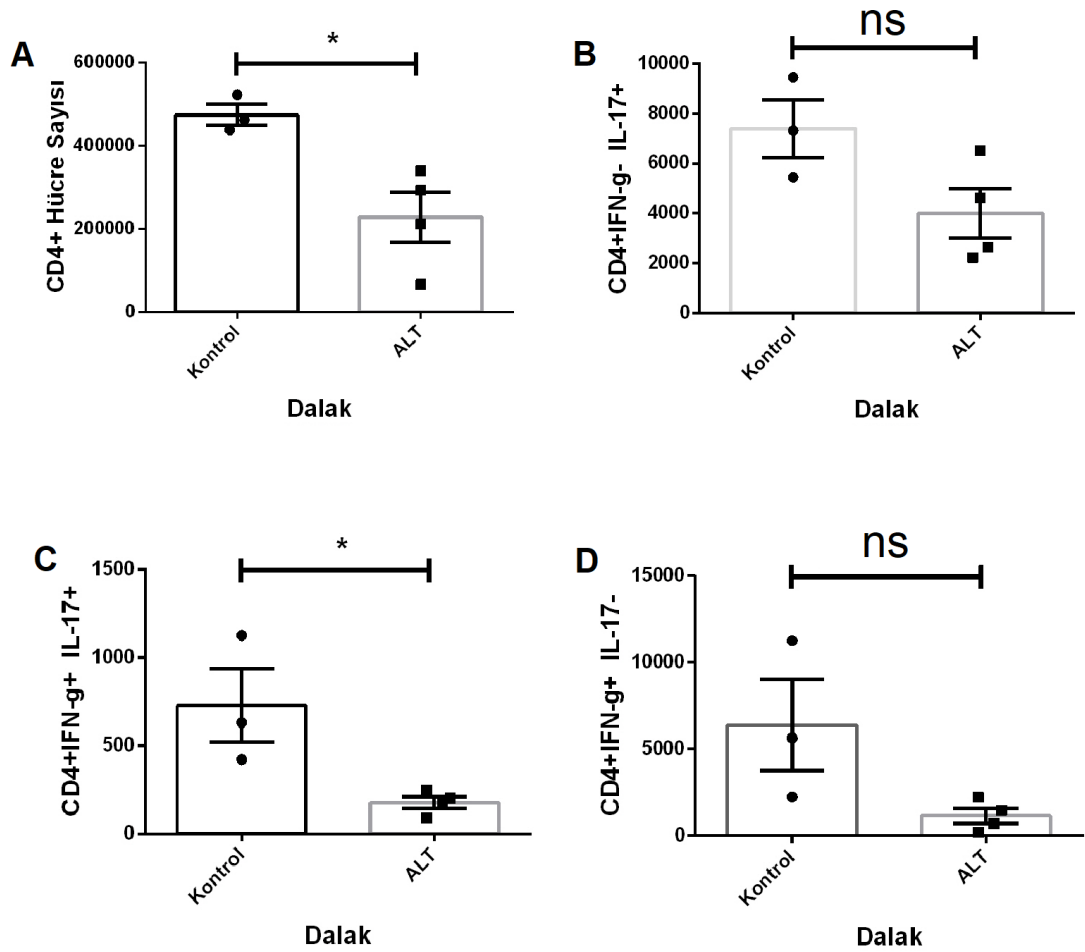
DLK'tan elde edilen lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanmıştır. Şekil 4.66'da boyanan lökositlerin kapılama stratejileri gösterilmiştir.



Şekil 4.66. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, IFN- γ -APC-Cy7 ve GM-CSF-PE ile boyanması ve lökositlerin kapılama stratejilerinin gösterilmesi. A) Kontrol grubu lökositlerin kapılama stratejisi, B) ALT grubu lökositlerin kapılama stratejisi (FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area)

DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.67'de gösterilmiştir. Şekil 4.67.A'da CD4+ T hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 474403 ve ALT grubunda ise

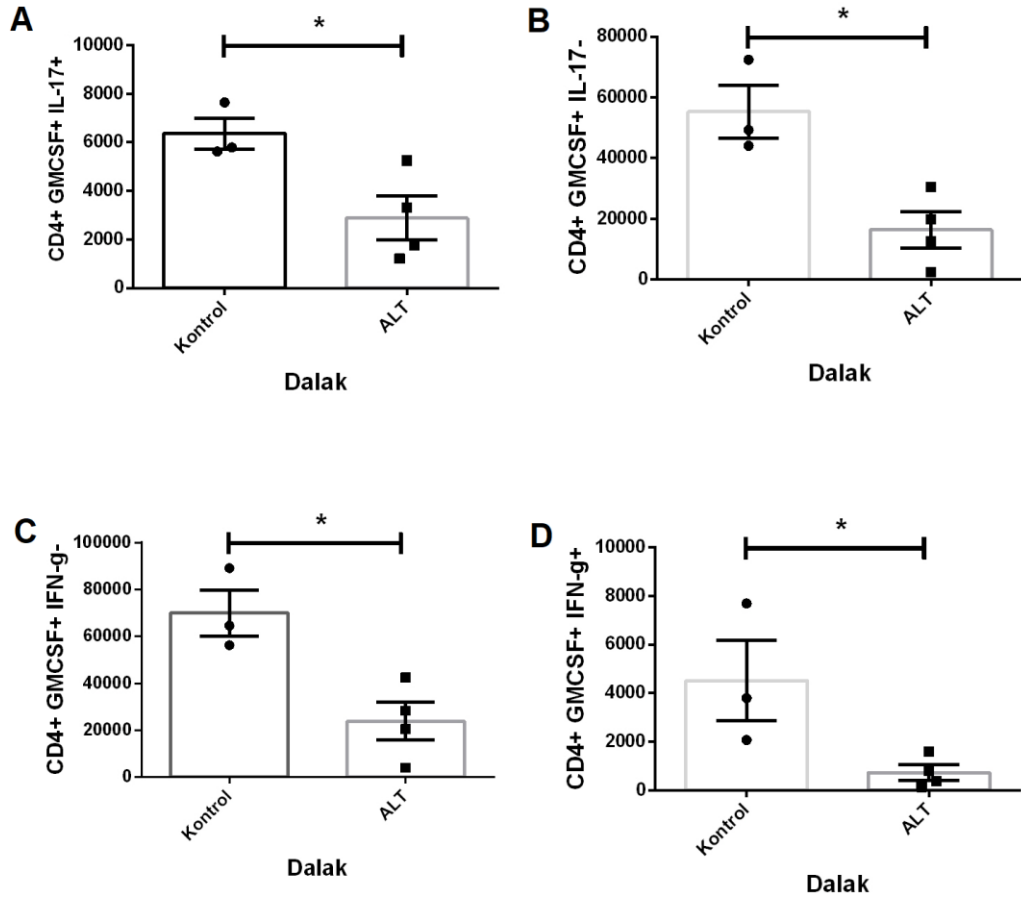
228032 CD4+ T hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.02$). Şekil 4.67.B'de CD4+IFN- γ -IL-17+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 7406 ve ALT grubunda ise 4000 CD4+ IFN-IL-17+hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.07$). Şekil 4.67.C'de CD4+IL-17+IFN+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 725 ve ALT grubunda ise 175 CD4+IL-17+IFN+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.027$). Şekil 4.67.D'de CD4+IL-17-IFN+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 6391 ve ALT grubunda ise 1165 CD4+IL-17-IFN+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.068$).



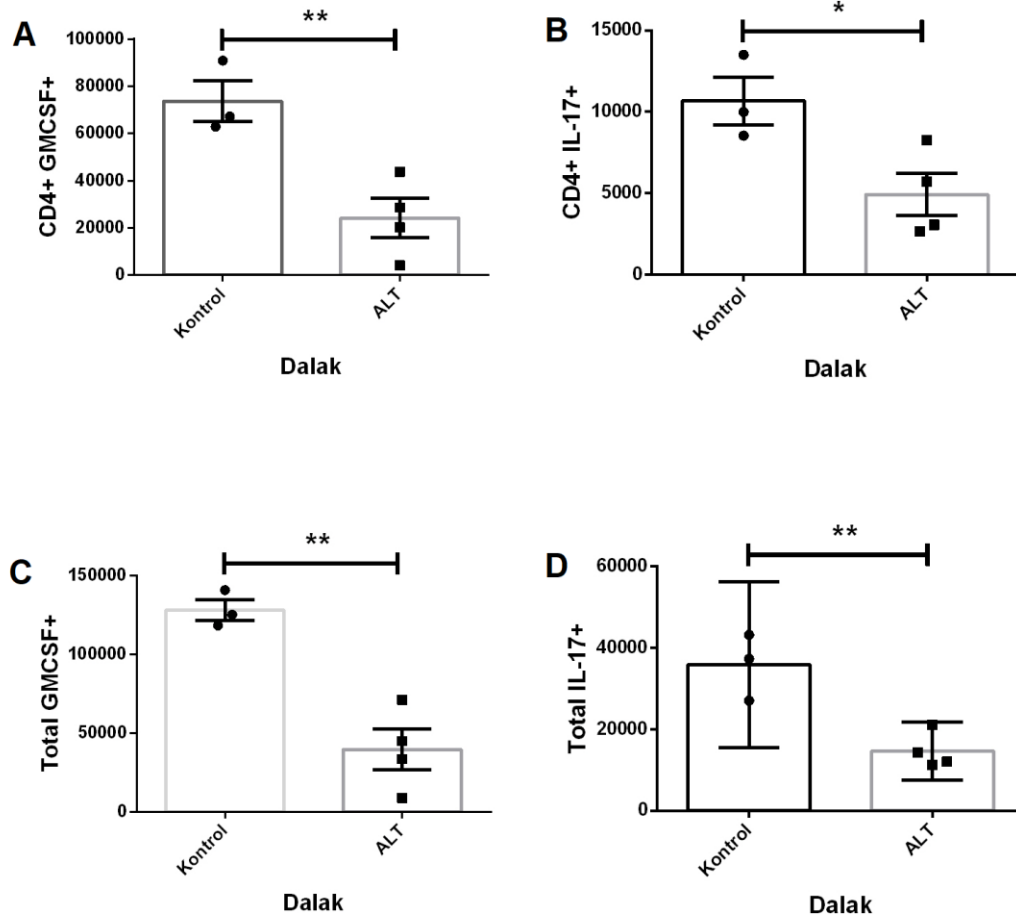
Şekil 4.67. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında

karşılaştırılması, B) CD4+IFN- γ -IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+IFN- γ +IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+IFN- γ +IL-17- hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanmış ve Şekil 4.68 ve Şekil 4.69'da gösterilmiştir. Şekil 4.68.A'da CD4+IL-17+GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 6358 ve ALT grubunda ise 2884 CD4+IL-17+GM-CSF+ hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.034$). Şekil 4.68.B'de CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 55279 ve ALT grubunda ise 16357 CD4+IL-17-GM-CSF+ hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$). Şekil 4.68.C'de CD4+GM-CSF+ IFN- γ - hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 70000 ve ALT grubunda ise 23883 CD4+GM-CSF+IFN- γ - hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.014$). Şekil 4.68.D'de CD4+GM-CSF+IFN- γ + hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 4521 ve ALT grubunda ise 725 CD4+GM-CSF+IFN- γ + hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.046$). Şekil 4.69.A'da CD4+GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 73679 ve ALT grubunda ise 24214 CD4+GM-CSF+ hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.009$). Şekil 4.69.B'de CD4+IL-17+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 10677 ve ALT grubunda ise 4934 CD4+IL-17+ hücre bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.03$). Şekil 4.69.C'de GM-CSF+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 128098 ve ALT grubunda ise 39574 GM-CSF+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.002$). Şekil 4.69.D'de IL-17+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 35821 ve ALT grubunda ise 14649 IL-17+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.006$).



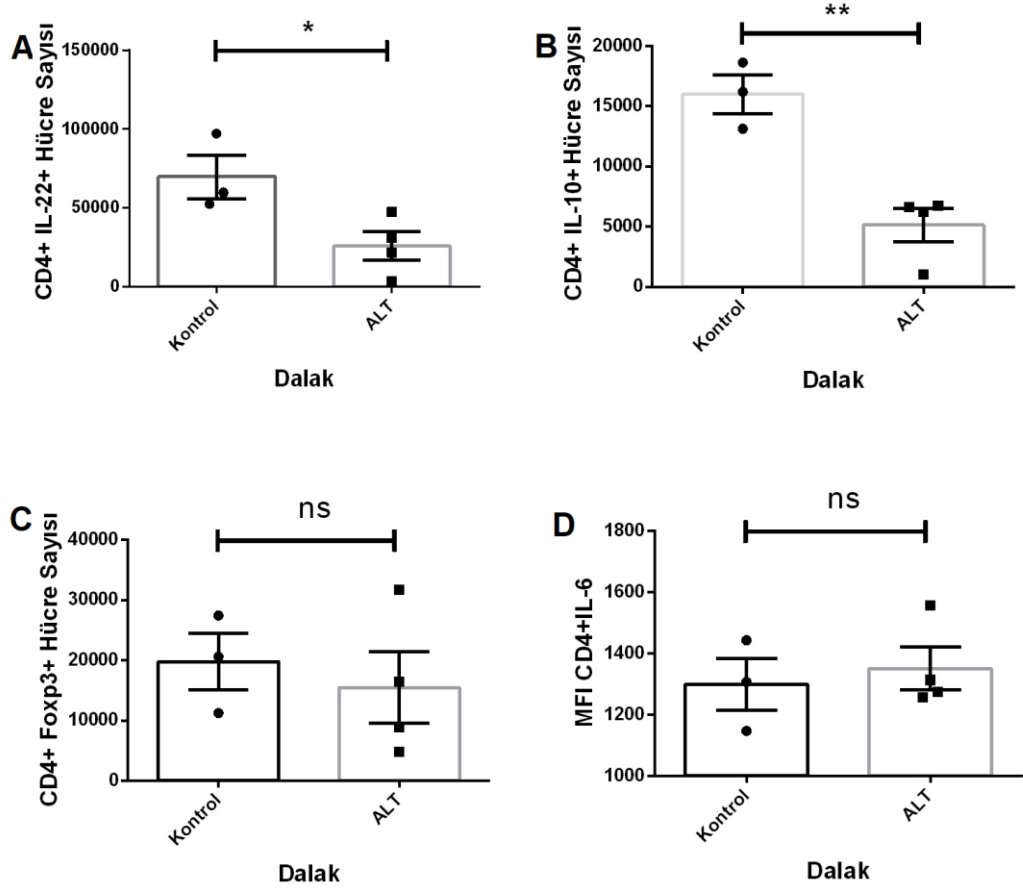
Şekil 4.68. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-17+GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17- GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+ GM-CSF+IFN- γ - hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) CD4+ GM-CSF+IFN- γ + hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$.



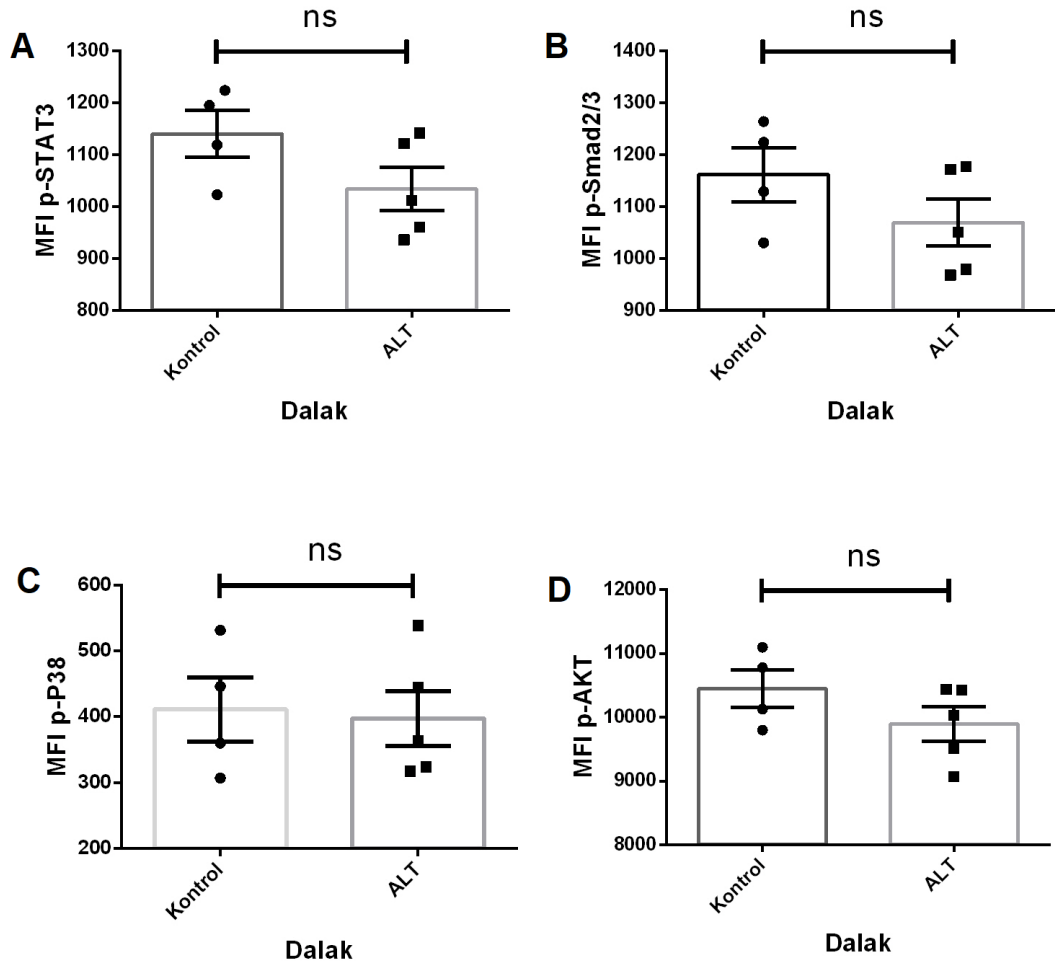
Şekil 4.69. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-17-APC, GM-CSF-PE ve IFN- γ -APC-Cy7 ile boyanması ve analizi. A) CD4+GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) GM-CSF+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) IL-17+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * p<0.05; ** p<0.01.

DLK'taki lökositler CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE, IL-22-PE p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanmış ve Şekil 4.70 ve Şekil 4.71'de gösterilmiştir. Şekil 4.70.A'da CD4+IL-22+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 69859 ve ALT grubunda ise 26089 CD4+IL-22+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.039). Şekil 4.70.B'da CD4+IL-10+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama

15900 ve ALT grubunda ise 5142 CD4+IL-10+ hücre vardır ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0039$). Şekil 4.70.C'de CD4+Foxp3+ hücre sayıları kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama 19774 ve ALT grubunda ise 15480 CD4+Foxp3+ hücre bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.70.D'de CD4+ hücrelerin IL-6 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 1299 ve ALT grubunda ise 1350 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.71.A'da hücrelerin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalaması 1140 ve ALT grubunda ise 1034 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.71.B'de hücrelerin p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalaması 1162 ve ALT grubunda ise 1069 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.71.C'de hücrelerin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalaması 411 ve ALT grubunda ise 397 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.71.D'de hücrelerin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğu kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda MFI 10450 ve ALT grubunda ise 9894 olarak bulunmuş, ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.70. DLK'tan elde edilen lökositlerin CD4-FITC, IL-10-PE-Cy7, Foxp3-*Pacific Blue*, IL-6-PE ve IL-22-PE ile boyanması ve analizi. A) CD4+IL-10+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) CD4+IL-22+ hücre sayılarının kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) CD4+Foxp3+ hücrelerin yüzdelerinin kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin CD4+IL-6+ ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.



Şekil 4.71. DLK'tan elde edilen lökositlerin p-Stat3-FITC, p-P38-APC, p-ERK1/2-APC, p-Smad2/3-PE ve p-Akt1/2-*Pacific Blue* ile boyanması ve analizi. A) Lökosit hücrelerinin p-Stat3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, B) Lökosit hücrelerinin p-Smad2/3 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, C) Lökosit hücrelerinin p-P38 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması, D) Lökosit hücrelerinin p-Akt1/2 ortalama flöresan yoğunluğunun kontrol ile ALT grubu arasında karşılaştırılması. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Merkezi sinir sisteminin inflamasyonu, MS'deki hasarın birincil nedenidir. Bu inflamasyonu başlatan spesifik elementler hala bilinmemektedir. Çalışmalar, genetik, çevresel ve bulaşıcı ajanların MS gelişimini etkileyen faktörler arasında olabileceğini göstermektedir. İnsan MS için hayvan modeli EAE üzerinde birçok immünolojik çalışma yapılmıştır. EAE çalışmalarıyla bağışıklık sistemi hakkında çok şey öğrenilmiş olsa da, deneysel ve immünolojik verileri incelerken EAE ve MS arasındaki farkların yanı sıra MS karmaşıklığı da akılda tutulmalıdır (Codarri ve ark., 2010). İmmün sistem doğal bağışıklık ve adaptif bağışıklık yanıtları olarak ikiye ayrılır. Doğuştan gelen sistem, T ve B hücrelerinin efektör fonksiyonunu etkileyerek MS'in başlatılmasında ve ilerlemede rol oynar (Gandhi ve ark., 2010). Örneğin, dendritik hücreler, TLR'ler yoluyla aktive edildiğinde, yarı olgunlaşır ve IL-10 veya TGF- β gibi inhibitör sitokinleri üretmesi için düzenleyici T hücrelerini indükler (Kasper ve Shoemaker, 2010). Dendritik hücreler olgunlaşmaya devam ettikçe, Th1, Th2 fenotipleri veya Th17 fenotiplerine farklılaşmak için CD4+ T hücrelerini polarize etmeye başlarlar (Loma ve Heyman, 2011). Adaptif cevap, antijen sunan hücreler (ASH) tarafından T lenfositlerine spesifik bir antijenin sunulmasıyla başlatılır. Bu antijen sunan hücreler arasında B hücreleri, dendritik hücreler, mikroglia ve makrofajlar bulunur. ASH ve T hücresi arasındaki etkileşim, adaptif bağışıklık cevabını başlatmak için temel bir bileşendir. CD4 + ve CD8 + fenotipi dahil olmak üzere çeşitli T hücresi subsetleri ASH'lar tarafından aktive edilebilir. Th1, Th2 ve Th17 hücreleri, spesifik interlökinlerin etkisine cevap olarak polarize olan CD4+ efektör T hücrelerdir. Th1, Th2 veya Th17'ye polarize edildiğinde, efektör T hücreleri spesifik sitokinleri salgılar. Th1 hücreleri, IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinleri ve Th2 hücreleri de, IL-4 ve IL-13 gibi anti-inflamatuvar sitokinleri salgılar. Th17 hücreleri, IL-17, IL-21, IL-22 ve IL-26 üreten bir CD4+ T hücre altkümesidir. Th1 hücreleri gibi Th17 hücreleri de MS'de inflamasyonu destekler. IL-17 sitokini/reseptörleri akut ve kronik MS plaklarında görülür. Ayrıca, IL-17 eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalar klinik şiddetin azaldığını göstermektedir (Komiya ve ark., 2006; Loma ve Heyman, 2011).

Th1 ve Th17 hücreleri, periferde aktive olduktan sonra merkezi sinir sistemine göç eder. Daha sonra demiyelinizasyon ve aksonal kayıp görülür (Gandhi ve ark., 2010). Yukarıda kısaca bahsedilen MS'te etkin rol oynayan CD4+ T hücreleri ve bunların ürettikleri sitokinlerden yola çıkılarak, bu tez çalışmasında, EAE fare modelinde, Sch-B ve ALT'nin MSS ve sekonder lenfoid organlardaki CD4+ T hücrelerine nasıl bir etkisinin olduğu ve MS tedavisindeki yeri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, Sch-B (60 mg/kg) ve ALT (15 mg/kg), farelere MOG₃₅₋₅₅ peptidi ile aktif immünizasyon enjekte edildiği gün başlanarak bir gün arayla belirlenen gruplara sırasıyla, 7 ve 19 gün verildi, fareler immünizasyondan sonra 7. günde (priming faz) ve 19. günde (efektör faz) servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve farelerin dalak, lenf nodu, beyin ve spinal kordları alınmıştır.

EAE, öncelikle MSS'nin otoimmün inflamatuvar hastalıklarının bir hayvan modeli olarak kullanılır ve birçok açıdan prototipik bir hastalık olan MS'e benzer (Farooqi ve ark., 2010; Gold ve ark., 2006). C57BL6 faresinde, MOG₃₅₋₅₅ ile immünizasyon monofazik veya kronik, sürekli bir EAE formunu indükleyebilir. EAE, omuriliğin periferik beyaz maddesindeki mononükleer inflamatuvar infiltrasyon ve demiyelinizasyonun multifokal, konfluent alanları ile tanımlanır (Constantinescu ve ark., 2011). Makrofajlar ve CD4+ T hücreleri, inflamatuvar infiltrattaki ana hücre tipleridir. İmmünizasyondan 7 gün sonra genellikle EAE oluşmaya başlar ve hastalığın zirvesinden sonra inflamasyon ve demiyelinizasyonun azalma eğilimine benzer patolojiyi göstermektedir. Bu özellikler, bu hastalık tipini, İkinci İlerleyici Multipl Skleroz (İİMS)'a benzer bir kronik inflamatuvar demiyelinizasyon modeli özelliğini göstermektedir (Bannerman ve ark., 2005). C57BL6 faresinde MOG₃₅₋₅₅ ile oluşturulan MS modelinde 7. günden itibaren klinik olarak bazı klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Bu belirtiler, EAE'in nasıl ilerlediği ve şiddeti hakkında bize bilgi vermektedir. EAE'in klinik skorlaması literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır (Beeton ve ark., 2007; Zargari ve ark., 2007). Bu çalışmada yaptığımız EAE klinik skorlama sonucunda, Sch-B ve ALT'nin EAE gelişimini azalttığı görülmüştür.

Özellikle miyelini boyayan reaktiflerden luxol fast blue, sinir sisteminin histopatolojik incelemesinin önemli bir parçası olmuştur. Demiyelinizasyon görülen bölgelerde mavi renk ile boyanan miyelinler kaybolmaktadır (Kluver ve Barrera, 1953; Lucchinetti ve ark., 1998; Xiang ve ark., 2005). 19. gün sakrifiye edilen farelerin spinal kordları çıkartılıp luxol fast blue ile boyaması yapıldı ve elde edilen kesitler demiyelinizasyonuna

göre skorlanmıştır. Skorlama sonucunda, Sch-B ve ALT uygulanan farelerin spinal kortlarında, bu iki molekülün demiyelinizasyon miktarını kontrole göre anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Ayrıca, Sch-B ve ALT'nin MS'in şiddetini de hafiflettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, bu iki molekülün, MS için yeni tedavi ajanları olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

EAE fare modeli MS gelişimi açısından iki temel faza ayrılabilir, birincisi T hücrelerinin ASH hücrelerle karşılaşarak aktive olup drene lenf nodlarından MSS gittikleri priming faz, ikinci faz ise MSS gelen aktive T lenfositlerinin MS gelişimine sebep olan olayları başlattığı efektör fazdır. Priming fazın MS gelişimine etkisini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır (Liston ve ark., 2009; Sonar ve Lal, 2019). Sch-B ve ALT verildikten sonra, priming fazda, efektör CD4+ T hücrelerinin antijene spesifik aktivasyonu ve farklılaştığı dönemde, sekonder lenfoid organlardaki (dalak ve inguinal lenf düğümü) Th1 sitokin (IFN- γ) ve Th17 sitokin (IL-17) üreten hücrelerin frekansları ölçülmüştür. Sch-B'nin, lenf nodunda (LN) CD4+IL-17+GM-CSF- ve CD4+IL-17+IFN- γ - hücrelerin yüzdelerini kontrole göre anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Th1 hücrelerine anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Sch-B, priming fazda LN'nda Th17 hücrelerini azaltmıştır (Şekil 4.2C ve 3C'de). Sch-B, priming fazda dalaktaki Th17 hücrelerine bir etkisi olmaz iken CD4+IL-17-IFN- γ + hücrelerini anlamlı düzeyde azaltmıştır. Sonuç olarak Sch-B'nin priming fazında LN'da Th17 ile DLK'ta ise Th1 hücrelerini azaltarak EAE gelişimini hafiflettiği düşünülmüştür. ALT'nin priming fazda LN'daki Th1 ve Th17 hücrelerine bir etkisi görülmemiştir. ALT'nin priming fazda DLK'ta CD4+ T hücrelerini azaltmasına karşın Th1 ve Th17 hücreleri üzerinde anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ALT'nin priming fazında sadece DLK'ta CD4+ T hücrelerini azaltarak bir etki gösterirken CD4+ hücrelerin Th1 ve Th17 subsetleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılık kaybolmuştur. Bu örneklem sayısının azlığı ile ilişkili olabilir.

C57BL6 fareleri MOG₃₅₋₅₅ immünizasyonun 19. günü (efektör faz) sakrifiye edilerek beyin, LN ve DLK'taki hücreler akım sitometri ile kantifiye edilmiştir. Sch-B, beyinde CD4+ T hücrelerini ve Th1 ve Th17 hücrelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu sonuçlarımız, daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan Th1 ve Th17 hücrelerinin azalmasının MS şiddetinin azalmasına sebep olması sonuçlarıyla tutarlıdır (Gandhi ve ark., 2010; Komiyama ve ark., 2006; Loma ve Heyman, 2011). Ancak, efektör fazda Sch-B'nin LN'da Th1 ve Th17 hücrelerine bir etkisi olmazken DLK'ta Th1 ve Th17 hücrelerini azalttığı görülmüştür. Böylece, efektör fazda Sch-B'nin MS şiddetini

azaltması, beyindeki Th1 ve Th17 hücre sayılarının düşmesi ile ilişkili olabilir (Şekil 4.17-21). Efektör fazda, ALT'nin beyinde ve LN'da Th1 ve Th17 hücrelerinin IFN- γ ve IL-17 üretimine etkisi olmazken IL-10 üretimini artırmıştır. Öte yandan LN'da CD4+T hücresinde artış görülmüştür. ALT, DLK'ta Th1 ve Th17 hücrelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Sonuç olarak ALT'nin, beyin ve LN'daki Th1 ve Th17 hücrelerinden IL-10 üretimini artırmış, DLK'taki Th1 ve Th17 hücreleri üzerinde azaltıcı ve LN'daki CD4+ T hücreleri üzerinde artırıcı bir etkisi görülmüştür. Böylece, efektör fazda ALT'nin hem MSS de IL-10 üretimini artırarak hem de DLK'taki Th1 ve Th17 hücre sayılarını azaltarak EAE'nin gelişimini hafiflettiği düşünülmüştür.

CD4+CD25+Foxp3+ hücreleri olarak nitelendirilen Tregler MS gibi otoimmün hastalıkları baskılamak için çok önemli işlev görmektedir (Mastorodemos ve ark., 2015; Ziegler, 2006). Foxp3 transkripsiyon faktörü, ağırlıklı olarak Treg hücre soyunda ifade edilmektedir ve sitokin üretimi ve T efektör hücre aktivasyonunun hücre-hücre temasına bağlı inhibisyonu için bir ana regülatör olarak işlev görmektedir (Fontenot ve ark., 2003, 2017). Ayrıca, MS'de potansiyel bir tedavi stratejisi olarak Treg artırımının yararlı etkileri de tartışılmaktadır. Treg'ler, otoimmün cevaba aracılık eden efektör CD4+ T hücre alt kümelerini baskılayarak etki göstermektedir (Danikowski ve ark., 2017). Treg'lerde baskılayıcı ve migrasyon belirteçlerin düzensizliği MS patogeneziyle ilişkilendirilmiştir. Örneğin, Treg baskılayıcı belirteçler CTLA-4 ve CD25'te genetik anormallikler bulunurken, diğer belirteçler Foxp3 ve IL-10'un azalan ekspresyonları gösterilmiştir (Danikowski ve ark., 2017). IL-10 başlangıçta Th1 hücreleri tarafından sitokin sentezini inhibe eden bir murin Th2 sitokin olarak tanımlanmıştır (Fiorentino ve ark., 1989). Daha sonraki çalışmalarda da görüldüğü gibi IL-10 üretimi, Th0 ve Th1 hücreleri, B hücreleri ve makrofajların da IL-10 ifade ettikleri gösterildiğinden Th2 hücreleri ile sınırlı değildir. Bununla birlikte, IL-10'un etkilerinin birçoğu Th2 sitokinlerinkine benzer veya bununla örtüşmektedir ve Th2 benzeri tepkilerin uyarılması ile IL-10'un ifadesi arasında yakın bir korelasyon olduğu görülmektedir (Mosmann, 1994). IL-10'un otoimmün hastalıklarda potansiyel bir terapötik rolü olduğunu düşündürmektedir. Ratlara rekombinant IL-10 uygulanması EAE gelişimini önlemektedir (Rott ve ark., 1994). MSS içindeki IL-10 mRNA ekspresyonu artışı ile EAE'in klinik seyirinin iyileşmesi ile bir korelasyon göstermektedir (Diab ve ark., 1997; Kennedy ve ark., 1992). Bu çalışmada, primingde, Sch-B'nin LN'daki IL-10 ifadesinde ve miktarında iki kat artışa sebep olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

($p > 0.05$). Yine, primingde, ALT, LN'daki ve DLK'taki IL-10 sitokini ve Foxp3 transkripsiyon faktörü seviyelerinde anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Elde edilen sonuçlara göre Sch-B ve ALT'nin priming evresinde Treg hücrelerine etki etmediği düşünülmüştür.

Efektör fazda, Sch-B'nin beyinde Treg hücre sitokini olan IL-10 ve master regülatör transkripsiyon faktörü Foxp3'ü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür (Şekil 4.23-25). Bu sonuç, Sch-B'nin beyinde Treg hücre sayısını ve inhibitör etkisini artırdığını düşündürmektedir. Efektör fazda Sch-B, LN'da IL-10 sitokini ve Foxp3 transkripsiyon faktörünü azaltmıştır. Aynı fazda Sch-B'nin DLK'ta da IL-10 sitokini azaltırken Foxp3 transkripsiyon faktöründe bir artış görülmüştür. Sch-B, efektör fazda beyindeki Treg hücrelerinde artışa neden olarak EAE gelişimini hafifletmektedir. Efektör fazda, ALT'nin beyinde IL-10 sitokini anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür. Fakat Foxp3 transkripsiyon faktöründe anlamlı bir artış görülmemiştir. Treg hücreleri artmamasına karşın inhibitör sitokini olan IL-10'da anlamlı bir artış görülmüştür. Ancak aynı fazda ALT, LN ve DLK'taki IL-10 sitokin seviyelerini önemli oranda azaltmıştır. ALT'nin efektör fazda beyinde Treg artışına neden olmadığı fakat IL-10 sitokin seviyesinde artışa sebep olarak EAE gelişiminde hafifletici bir etkisi olabilir.

IL-22, bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından üretilir ve inflamasyon sırasında doku cevabını modüle ederek hematopoietik olmayan hücreler üzerinde etki eder (Sonnenberg ve ark., 2011; Zenewicz ve Flavell, 2011). IL-22, doğal ve adaptif bağışıklık hücreleri tarafından üretilir. Th17 hücreleri IL-22'nin önemli bir kaynağıdır, ancak sitokin ayrıca Th1 hücreleri, ayrıca doğuştan gelen NK, NKT ve $\gamma\delta$ T hücreleri, yine doğuştan gelen lenfoid grup 3 hücreler (ILC3) ve lenfoid doku indükleyici hücreler tarafından üretilir. IL-22 reseptörünü eksprese eden hücreler arasında deri, bağırsak ve akciğerin epitel hücreleri ile pankreas, karaciğer ve böbreğin asinar hücreleri bulunur (Aggarwal ve ark., 2001; Wolk ve ark., 2004). Hayvan modellerinde, IL-22'nin doku üzerindeki etkileri çeşitli ve değişkendir (Sonnenberg ve ark., 2011; Zenewicz ve Flavell, 2011). IL-22BP'nin, her ikisinin de bariyer yüzeylerini etkileyen sedef hastalığı ve inflamatuvar bağırsak hastalığı modellerinde inflamasyonu sınırlandırdığı gösterilmiştir (Huber ve ark., 2012; Lindahl ve ark., 2017). Bunun aksine, bu lokusta doğal IL-22BP ekspresyonu daha düşük olan doğal genetik varyantlı sıçanların ve tam gen delesyonu olan farelerin MS hayvan modelinde daha az ciddi hastalığa sahip olduğu da gösterilmiştir (Beyeen ve ark., 2010; Laaksonen ve ark., 2014). Priming fazda, hem Sch-B hem de ALT, LN ve

DLK'taki IL-22 sitokin miktarında bir değişime sebep olmamıştır. Sonuçta, Sch-B ve ALT'nin priming evresinde IL-22 üretimine bir etkisi görülmemiştir.

Efektör fazda, Sch-B'nin beyinde IL-22 sitokin miktarı artırdığı görülmüştür. IL-22'nin daha önceki yapılan çalışmalarda MS üzerine olumlu etkisi olabileceği gösterilmiştir (Mattapallil ve ark., 2019). Efektör fazda, Sch-B LN'da IL-22 sitokinini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmazken, DLK'ta ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Sch-B'nin LN ve DLK'ta, IL-22 sitokini üretimi üzerinde artırıcı bir etkisi görülmemektedir. Efektör fazda, ALT beyinde ve DLK'ta IL-22 sitokin üretimini anlamlı derecede artırmıştır. Sonuçta, efektör fazda ALT, EAE gelişiminde hafifletici bir etki göstermektedir ve bu parsiyel olarak IL-22 seviyesine bağlı olabilir.

IL-6, MS patolojisinde rol oynamaktadır. IL-6 eksik (Samoilova ve ark., 1998) ve STAT3 eksik fareler (Liu ve ark., 2008) EAE indüksiyonuna dirençlidir. Ek olarak, GWAS çalışmaları STAT3 genindeki varyantlar ve MS riski arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Jakkula ve ark., 2010). Ayrıca, MS hastalarından CD4+ T hücreleri üzerinde IL-6Ra ekspresyonunda bir artış vardır (Bongioanni ve ark., 2000) ve nükseden hastalarda fosforile olmuş STAT3 (pSTAT3) seviyesi yükselmiştir (Frisullo ve ark., 2006). Sch-B, priming fazda LN'da IL-6 ve pSTAT3 seviyesini oldukça düşürmüştür. Fakat kullanılan örnek sayısı az olduğundan dolayı istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemektedir (Şekil 4.6.A ve B). ALT, priming fazda LN ve DLK'ta IL-6 ve pSTAT3 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Priming fazda Sch-B ve ALT'nin IL-6 ve pSTAT3 seviyeleri üzerinde bir etkisi görülmemiştir.

Efektör fazda, Sch-B beyinde p-Stat3 ve IL-6 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Efektör fazda, Sch-B, LN'da p-Stat3 ve IL-6 seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu azalma ile Sch-B'nin, EAE gelişiminde hafifletici bir etkisi olabileceğini göstermektedir. Efektör fazda, ALT beyinde ve DLK'ta IL-6 sitokini ve p-Stat3 seviyeleri üzerine bir etki göstermemiştir. Ancak, bu fazda ALT, LN'da IL-6 seviyesi üzerinde bir etki göstermezken, p-Stat3 seviyesini anlamlı düzeyde azaltmıştır. Efektör fazda ALT'nin p-Stat3'ü azaltması, Th17 hücrelerinin azalmasına ve EAE'in hafiflemesine sebep olabilir.

p38 MAPK esas olarak hücre stresi ve inflamatuvar hareketler (TLR ligandları veya sitokinler) ile aktive edilir. p38 MAPK, inflamasyonu ve hücre ölümünü düzenler, fakat aynı zamanda hücrenin hayatta kalmasında da bir rol oynar (Hui ve ark., 2007; Thornton ve Rincon, 2009). P38 MAPK, inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde, makrofajlar ve

DH'lerde, çoklu proinflatuar ve T hücresi polarize edici sitokinlerin (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-12, IL-6 ve IL-23) üretimini desteklemek üzere TLR'nin downstreamini aktive eder (Aicher ve ark., 1999; Kikuchi ve ark., 2003; Liu ve ark., 2009; Xie ve ark., 2003). p38 MAPK, ayrıca CD4 ve CD8 T hücrelerinin T hücresi reseptörü (THR) ve THR-proksimal kinaz Lck ve Zap-70 yoluyla antijen stimülasyonu sırasında aktive edilir (Rincon ve Davis, 2009). Aktif T hücrelerinin proliferasyonu için p38 MAPK aktivasyonu gerekli olmamakla birlikte, CD4 ve CD8 hücreleri tarafından IFN- γ üretimi için gereklidir (Merritt ve ark., 2000; Rincon ve ark., 1998). Yapılan çalışmalar, p38 MAPK'nin Th17 hücreleri tarafından IL-17'nin üretiminde rol oynadığını ortaya koymuştur (Lu ve ark., 2010a; Namiki ve ark., 2012). Hem farmakolojik p38 MAPK inhibitörlerini hem de farklı genetik olarak manipüle edilmiş fare modellerini kullanarak, p38 MAPK aktivasyonunun, *in vitro* ve *in vivo* olarak IL17'nin üretimi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Gulen ve ark., 2010; Li ve ark., 2010; Lu ve ark., 2010a; Namiki ve ark., 2012). p38 MAPK aynı zamanda TNF- α ve IL-6 gibi diğer sitokinlerin makrofajlar ve DH'lerde post-transkripsiyonel ve translasyon mekanizmaları yoluyla üretimini düzenler (Dumitru ve ark., 2000; Kontoyiannis ve ark., 1999). Priming fazda, Sch-B ve ALT verilen LN'da p-P38 MAPK ifadesinde bir fark görülmemiştir. Ancak, bu fazda ALT, DLK'ta p-P38 MAPK ifadesini anlamlı seviyede azaltmıştır. Priming fazda ALT ile p-P38 MAPK ifadesindeki azalmanın, EAE gelişimini hafifletici yönde etkilediği düşünülebilir.

Efektör fazda, Sch-B beyinde p-P38 MAPK seviyesi üzerinde bir etki göstermezken, LN'da p-P38 MAPK seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Efektör fazda, ALT ile LN ve DLK'taki p-P38 MAPK ifadelerinde bir fark görülmemiştir. Ancak bu fazda, ALT, beyindeki p-P38 MAPK seviyesini anlamlı seviyede azaltmıştır. Efektör fazda, Sch-B ve ALT'nin, p-P38 MAPK ifadelerini azaltarak, EAE gelişimini hafifletici yönde etkilediği düşünülebilir.

Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK)'ın, hücrel çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Plotnikov ve ark., 2011). ERK ve ERK'n yukarısındaki MAP kinaz/ERK kinaz (MEK) bileşenleri, bağışıklık sisteminin birçok yönünü düzenlemektedir (Bendix ve ark., 2010; Brereton ve ark., 2009; Shin ve ark., 2003). THR'den G protein Ras'a ve ayrıca kinaz kaskadının alt bileşenlerine, yani Raf, MEK ve ERK'a kadar T hücrelerinde ERK sinyalizasyonu önemlidir. Periferik T hücrelerinde, THR ile başlatılan ERK aktivasyonu için Ras yoluyla

sinyalizasyon gereklidir (Roose ve ark., 2005; Roose ve ark., 2007). ERK1 defektif fareler, EAE'ye duyarlıdır, bu da ERK1'in EAE başlangıcı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Agrawal ve ark., 2006). EAE modelinde, ERK'nin yukarı akışındaki MEK bileşeninin farmakolojik inhibisyonu hastalık şiddetini iyileştirmektedir. ERK kaskadının inhibisyonu proinflamatuvar Th17 hücrelerinin IL-17 sitokini üretiminin azalmasına yol açmaktadır (Brereton ve ark., 2009). TGF- β , Foxp3+ Treg hücrelerinin ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. TGF- β , anti-CD3 veya Ag ile uyarılmış naif CD4+ hücrelerinin, IL-6 veya IL-21 varlığında Th17 veya IL-2 varlığında Foxp3+ Treg hücrelerine farklılaşmasını sağlamaktadır (Bettelli ve ark., 2006b; Davidson ve ark., 2007; Korn ve ark., 2007; Veldhoen ve ark., 2006; Zheng ve ark., 2007a). Foxp3+ Treg hücrelerinin ve Th17 hücrelerinin gelişimi karşılıklıdır (Bettelli ve ark., 2006b). TGF- β 'ya hücrel cevap, hücre tipine ve uyarana göre değişmektedir. Lenfositlerde, TGF- β , tip I (ALK5) ve tip II reseptörlerden oluşan kognat reseptör kompleksine bağlanmaktadır. Ligand reseptör kompleksinde T β RI'yi aktive etmek için T β RII gereklidir ve aktive edilmiş T β RI Ser/Thu kinazda altındaki SMAD2 ve SMAD3 fosforillemektedir. T β RI veya T β RII eksikliği TGF- β 'ya karşı hücrel yanıtı sonlandıracaktır (Wrana ve ark., 1992). Ne Smad2'nin ne de Smad3'ün tek başına Th17 hücrelerinin Th17 farklılaşması için yeterli olmadığı anlaşılmaktadır (Lu ve ark., 2010b). Hem Smad2 hem de Smad3, *in vitro* TGF- β tarafından indüklenen Foxp3+ iTreg hücrelerinin gelişiminde kısmi bir rol oynamasına rağmen, ne Smad2 ne de Smad3 gen eksikliği, TGF- β bağımlı iTreg indüksiyonunu *in vivo* olarak deasetilaz inhibitörü trikostatin A ile ortadan kaldırmamaktadır. Hem Smad2 eksikliği hem de SMAD3 inhibitörünün kombinasyonu, SMAD2 veya SMAD3'ün bu hücre soy farklılaşması için birbirini telafi etme olasılığı hariç Th17 hücre farklılaşmasını önemli ölçüde değiştirmez. P38 MAPK esas olarak Th17 hücre farklılaşmasını ve EAE gelişimini düzenlerken, ERK MAPK Foxp3+ iTreg hücrelerinin geliştirilmesinde merkezi bir rol oynamaktadır (Lu ve ark., 2010b). Priming fazda, Sch-B ile LN'da p-ERK1/2 ifadesinde bir fark görülmemiştir. Priming fazda, ALT ile LN ve DLK'ta p-ERK1/2 ifadelerinde bir fark görülmemiştir.

Efektör fazda, Sch-B beyinde p-ERK1/2 seviyesi üzerinde bir etki göstermezken, p-Smad2/3 seviyesini arttırmıştır. Literatürde bu artışın kısmi olarak iTreg üzerine etki ettiği *in vitro* olarak gösterilmiştir (Lu ve ark., 2010a). Bu fazda, Sch-B, LN'da p-Smad2/3 seviyesini önemli düzeyde azaltmıştır. Efektör fazda, ALT'nin beyinde p-

ERK1/2 ve p-Smad2/3 seviyelerine bir etkisi olmazken LN'da p-ERK1/2 ve p-Smad2/3 seviyelerinde anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu fazda, ALT'nin DLK'ta p-ERK1/2 ve p-Smad2/3 seviyelerine bir etkisi görülmemiştir. Efektör fazda, Sch-B ve ALT'nin oluşturduğu bu azalmaların EAE gelişimini hafiflettiği düşünülmektedir.

PI3K/Akt/mTOR sinyalleme, geniş bir hücrel sinyalizasyonda yer almaktadır (Altomare ve Khaled, 2012; Brazil ve ark., 2004). İnflamasyonu düzenlemede merkezi bir rol oynar ve bu yoldaki anormallikler otoimmünitenin gelişmesiyle bağlantılı olabilir (Ghigo ve ark., 2010; Malemud, 2015). Aynı zamanda hücrel çoğalma, hayatta kalma ve farklılaşma ile de ilgilidir (Yu ve Cui, 2016). Akt-mTOR sinyalizasyonunun aktivitesi EAE'de kritik öneme sahiptir ve Akt-mTOR'un bastırılması EAE'nin tedavisinde potansiyel bir strateji olabilir (Koga ve ark., 2014; Zhao ve ark., 2012). AKT'nin CD28 aktivasyonu, proliferasyonu, glikoz alımı, sitokin ekspresyonu, CD28 kostimülasyonu ve sitokinlere yanıt olarak hücre sağkalımını düzenlediği gösterilmiştir (Kane ve Weiss, 2003). Efektör T hücreleri ve CD4+CD25+Foxp3+ Treg'lerdeki AKT aktivitesi, efektör T hücrelerinin Treg'lere cevabını ve Treg'lerin baskılayıcı aktivitesinin yanı sıra iTreg gelişimini belirlemektedir (Crellin ve ark., 2007; Haxhinasto ve ark., 2008; Qiao ve ark., 2013). Akt-2'nin, Foxo-1/Foxo-3a'ya bağımlı bir şekilde iTreg gelişiminin inhibisyonu için çok önemli olduğu gösterilmiştir. T hücrelerindeki farklı AKT izoformlarının farklı etkileri olduğu gösterilmiştir (Qiao ve ark., 2013). Akt-1 ve Akt-2, tTreg proliferasyonunu kontrol ederek farelerin EAE'ye duyarlılığını farklı şekilde düzenler. Akt-1'in hedeflenmesi, insanlarda MS için potansiyel bir terapötik yaklaşımdır (Ouyang ve ark., 2019). Priming fazda, Sch-B, LN'da p-Akt1/2 ifadesini azaltmıştır. Bu fazda, ALT'nin LN'da p-Akt1/2 ifadesi üzerinde bir etkisi görülmezken DLK'ta ise azalttığı görülmüştür. Priming fazda, Sch-B ve ALT'nin oluşturduğu bu azalmaların Treg miktar ve aktivitesini etkileyerek EAE gelişiminde iyileştirici etkisi olabileceği düşünülmektedir. Efektör fazda, Sch-B beyinde p-Akt1/2 seviyesini önemli oranda azaltırken LN'da ise önemli bir etki göstermemiştir. Efektör fazda, ALT'nin beyinde p-Akt1/2 seviyesini önemli oranda azaltırken LN ve DLK'da ise önemli bir etki göstermemiştir. Efektör fazda, Sch-B ve ALT'nin oluşturduğu bu azalmaların EAE gelişiminde iyileştirici etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

Sch-B ve ALT'nin EAE gelişimini hafiflettiği hem klinik skorlama ile hem de Luxol fast boya ile gösterilmiştir. Sch-B'nin özellikle beyinde Th1 ve Th17 hücrelerini azaltarak EAE gelişimini engellediği görülmektedir. Aynı zamanda Sch-B'nin Treg hücrelerini artırdığı ve bununla EAE gelişiminde inhibitör etki yaptığı ortaya konulmuştur. Sch-B'nin çeşitli sinyal yollarına etki ettiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada Sch-B'nin beyinde özellikle AKT1/2 üzerinde etki ettiği görülmüştür. Daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. ALT'nin ise özellikle beyinde Th1 ve Th17 hücreleri üzerinde bir etkisi görülmemesine karşın inhibitör sitokin olan IL-10 beyinde artış göstermiştir. Bu inhibitör sitokin artışının, EAE gelişimini hafiflettiği görülmektedir. Aynı zamanda Sch-B'nin LN'da CD4+ T hücrelerini de azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada bazı akım sitometri boyamalarında boyanın yetersiz olmasından dolayı birleştirilerek boyama yapılmıştır. Bunun yanında priming aşamasında yeterli hayvan olamamasından dolayı gruplarda 3'er hayvan kullanılmıştır. Bu sınırlamalardan dolayı çalışmada bazı sonuçlarda farkın oldukça yüksek ya da düşük olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu çalışmada bu iki molekülün beyinde özellikle P38 MAPK ve AKT1/2 üzerinde etki ettiği görülmüştür. Ancak bu çalışmada MS'in profilaktik aşamasında yapılmıştır. Bu çalışmanın akut dönemde de yapılarak bu iki molekülün etkinliği daha açık bir şekilde ortaya konulmalıdır. Bu iki molekülün muhtemel hedefleri ile birlikte MS'i nasıl etkilediklerine dair tam açıklık getirilebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.KAYNAKLAR

- Adorini, L., ve Penna, G. (2009). Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Human immunology* 70, 345-352.
- Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature immunology* 3, 549-557.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry* 278, 1910-1914.
- Aggarwal, S., Xie, M.H., Maruoka, M., Foster, J., and Gurney, A.L. (2001). Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 21, 1047-1053.
- Agrawal, A., Dillon, S., Denning, T.L., and Pulendran, B. (2006). ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 176, 5788-5796.
- Aicher, A., Shu, G.L., Magaletti, D., Mulvania, T., Pezzutto, A., Craxton, A., and Clark, E.A. (1999). Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *Journal of immunology* 163, 5786-5795.
- Alastair C., A.C. (2002). Multiple sclerosis. In *Multiple sclerosis*, Alastair C., ed. (Neurology Unit, University of Cambridge Clinical School, Addenbrooke's Hospital, Cambridge CB2 2QQ, UK *Lancet* 2002; 359: 1221-31), pp. 1221-1231.
- Alp, R., and Boru, U.T. (2012). The Prevalence of Multiple Sclerosis in the North Caucasus Region of Turkey: Door-to-Door Epidemiological Field Study. *Archives of Neuropsychiatry / Noropsikiatri Arsivi*. Dec2012, Vol. 49 Issue 4, p272-275. 4p. 1 Chart.
- Altomare, D.A., and Khaled, A.R. (2012). Homeostasis and the Importance for a Balance Between AKT/mTOR Activity and Intracellular Signaling. *Curr Med Chem* 19, 3748-3762.
- Amadi-Obi, A., Yu, C.R., Liu, X., Mahdi, R.M., Clarke, G.L., Nussenblatt, R.B., Gery, I., Lee, Y.S., and Egwuagu, C.E. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13, 711-718.
- Amara, N., Goven, D., Prost, F., Muloway, R., Crestani, B., and Boczkowski, J. (2010). NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGF beta 1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax* 65, 733-738.
- Ando, D.G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J.L., and Sercarz, E.E. (1989). Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cellular immunology* 124, 132-143.
- Anunziato, F., Cosmi, L., and Romagnani, S. (2010). Human and murine Th17. *Current opinion in HIV and AIDS* 5, 114-119.
- Arnason, B.G. (1999). Immunologic therapy of multiple sclerosis. *Annual review of medicine* 50, 291-302.

Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P.S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature immunology* 8, 1380-1389.

Awasthi, A., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17A directly inhibits TH1 cells and thereby suppresses development of intestinal inflammation. *Nature immunology* 10, 568-570.

Aysun Ü, U.E. (2009). Multipl Sklerozda Atak Tedavisi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Özel Dergisi*. 2009;2 :75-9.

Baba, N., Rubio, M., Kenins, L., Regairaz, C., Woisetschlager, M., Carballido, J.M., and Sarfati, M. (2012). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naive CD4(+) Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Human immunology* 73, 795-800.

Bannerman, P.G., Hahn, A., Ramirez, S., Morley, M., Bonnemann, C., Yu, S., Zhang, G.X., Rostami, A., and Pleasure, D. (2005). Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain : a journal of neurology* 128, 1877-1886.

Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Hermine, A., and Devergne, O. (2008). Human CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells Do Not Constitutively Express IL-35. *Journal of immunology* 181, 6898-6905.

Barnes, M.S., Bonham, M.P., Robson, P.J., Strain, J.J., Lowe-Strong, A.S., Eaton-Evans, J., Ginty, F., and Wallace, J.M. (2007). Assessment of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentrations in male and female multiple sclerosis patients and control volunteers. *Multiple sclerosis* 13, 670-672.

Baron, J.L., Madri, J.A., Ruddle, N.H., Hashim, G., and Janeway, C.A. (1993). Surface Expression of Alpha-4 Integrin by Cd4 T-Cells Is Required for Their Entry into Brain Parenchyma. *Journal of Experimental Medicine* 177, 57-68.

Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* 7, 929-936.

Beeton, C., Garcia, A., and Chandy, K.G. (2007). Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 224.

Begum-Haque, S., Sharma, A., Kasper, I.R., Foureau, D.M., Mielcarz, D.W., Haque, A., and Kasper, L.H. (2008). Downregulation of IL-17 and IL-6 in the central nervous system by glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 204, 58-65.

Bendix, I., Pfueller, C.F., Leuenberger, T., Glezeva, N., Siffrin, V., Muller, Y., Prozorovski, T., Hansen, W., Schulze Topphoff, U., Loddenkemper, C., *et al.* (2010). MAPK3 deficiency drives autoimmunity via DC arming. *Eur J Immunol* 40, 1486-1495.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27, 20-21.

- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006a). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.
- Bettelli, E., Carrier, Y.J., Gao, W.D., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006b). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H)17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.
- Bettelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current opinion in immunology* *19*, 652-657.
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* *200*, 79-87.
- Beyeen, A.D., Adzemovic, M.Z., Ockinger, J., Stridh, P., Becanovic, K., Laaksonen, H., Lassmann, H., Harris, R.A., Hillert, J., Alfredsson, L., *et al.* (2010). IL-22RA2 associates with multiple sclerosis and macrophage effector mechanisms in experimental neuroinflammation. *Journal of immunology* *185*, 6883-6890.
- Beyersdorf, N., Kerkau, T., and Hunig, T. (2015). CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets and therapy* *4*, 111-122.
- Boehm, T., and Swann, J.B. (2014). Origin and evolution of adaptive immunity. *Annual review of animal biosciences* *2*, 259-283.
- Bongioanni, P., Mosti, S., Romano, M.R., Lombardo, F., Moscato, G., and Meucci, G. (2000). Increased T-lymphocyte interleukin-6 binding in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* *7*, 291-297.
- Boru, U.T., Bilgic, A.B., Koseoglu Toksoy, C., Yilmaz, A.Y., Tasdemir, M., Sensoz, N.P., Oztop Cakmak, O., Duman, A., and Boluk, C. (2018). Prevalence of Multiple Sclerosis in a Turkish City Bordering an Iron and Steel Factory. *Journal of clinical neurology* *14*, 234-241.
- Boru, U.T., Tasdemir, M., Guler, N., Ayik, E.D., Kumas, A., Yildirim, S., Duman, A., Sur, H., and Kurtzke, J.F. (2011). Prevalence of multiple sclerosis: door-to-door survey in three rural areas of coastal Black Sea regions of Turkey. *Neuroepidemiology* *37*, 231-235.
- Brazil, D.P., Yang, Z.Z., and Hemmings, B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* *29*, 233-242.
- Brereton, C.F., Sutton, C.E., Lalor, S.J., Lavelle, E.C., and Mills, K.H. (2009). Inhibition of ERK MAPK suppresses IL-23- and IL-1-driven IL-17 production and attenuates autoimmune disease. *Journal of immunology* *183*, 1715-1723.
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., and Thompson, A.J. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* *83*, 1022-1024.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* *27*, 68-73.

- Calabresi, P.A., Fields, N.S., Farnon, E.C., Frank, J.A., Bash, C.N., Kawanashi, T., Maloni, H., Jacobson, S., and McFarland, H.F. (1998). ELI-spot of Th-1 cytokine secreting PBMC's in multiple sclerosis: correlation with MRI lesions. *Journal of neuroimmunology* 85, 212-219.
- Cantrell, C.L., Abate, L., Fronczek, F.R., Franzblau, S.G., Quijano, L., and Fischer, N.H. (1999). Antimycobacterial eudesmanolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa*. *Planta medica* 65, 351-355.
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A.D., De Francesco, M.A., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A., and Turano, A. (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27, 71-76.
- Chang, J.H., Cha, H.R., Lee, D.S., Seo, K.Y., and Kweon, M.N. (2010). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PloS one* 5, e12925.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986-991.
- Checker, R., Patwardhan, R.S., Sharma, D., Menon, J., Thoh, M., Bhilwade, H.N., Konishi, T., and Sandur, S.K. (2012). Schisandrin B exhibits anti-inflammatory activity through modulation of the redox-sensitive transcription factors Nrf2 and NF-kappa B. *Free Radical Bio Med* 53, 1421-1430.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology* 13, 227-242.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.
- Chen, Y., Langrish, C.L., McKenzie, B., Joyce-Shaikh, B., Stumhofer, J.S., McClanahan, T., Blumenschein, W., Churakovsa, T., Low, J., Presta, L., *et al.* (2006). Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 116, 1317-1326.
- Chen, Z., Guo, M., Song, G., Gao, J., Zhang, Y., Jing, Z., Liu, T., and Dong, C. (2016). Schisandrin B inhibits Th1/Th17 differentiation and promotes regulatory T cell expansion in mouse lymphocytes. *International immunopharmacology* 35, 257-264.
- Chiba, K., Yanagawa, Y., Masubuchi, Y., Kataoka, H., Kawaguchi, T., Ohtsuki, M., and Hoshino, Y. (1998). FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. *Journal of immunology* 160, 5037-5044.
- Chitnis, T., Najafian, N., Benou, C., Salama, A.D., Grusby, M.J., Sayegh, M.H., and Khoury, S.J. (2001). Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 108, 739-747.
- Chiu, A.W., Richert, N., Ehrmantraut, M., Ohayon, J., Gupta, S., Bomboi, G., Gaindh, D., Cantor, F.K., Frank, J.A., McFarland, H.F., and Bagnato, F. (2009). Heterogeneity in response to interferon

beta in patients with multiple sclerosis: a 3-year monthly imaging study. *Archives of neurology* 66, 39-43.

Chiu, P.Y., Leung, H.Y., Poon, M.K., and Ko, K.M. (2006a). Chronic schisandrin B treatment improves mitochondrial antioxidant status and tissue heat shock protein production in various tissues of young adult and middle-aged rats. *Biogerontology* 7, 199-210.

Chiu, P.Y., Leung, H.Y., Poon, M.K., Mak, D.H., and Ko, K.M. (2006b). Effects of schisandrin B enantiomers on cellular glutathione and menadione toxicity in AML12 hepatocytes. *Pharmacology* 77, 63-70.

Choi, J., Leung, P.S., Bowlus, C., and Gershwin, M.E. (2015). IL-35 and Autoimmunity: a Comprehensive Perspective. *Clinical reviews in allergy & immunology* 49, 327-332.

Chun, J., Choi, R.J., Khan, S., Lee, D.S., Kim, Y.C., Nam, Y.J., Lee, D.U., and Kim, Y.S. (2012). Alantolactone suppresses inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by down-regulating NF-kappa B, MAPK and AP-1 via the MyD88 signaling pathway in LPS-activated RAW 264.7 cells. *International immunopharmacology* 14, 375-383.

Chun, J., Li, R.J., Cheng, M.S., and Kim, Y.S. (2015). Alantolactone selectively suppresses STAT3 activation and exhibits potent anticancer activity in MDA-MB-231 cells. *Cancer letters* 357, 393-403.

Ciccarelli O., T.A. (2006). Mechanisms of disability and potential for recovery in multiple sclerosis. In *Neurological rehabilitation of multiple sclerosis*. A.J. Thompson, ed. (Informa UK Ltd.2006.: Informa UK Ltd.2006.).

Claudio, E., Sonder, S.U., Saret, S., Carvalho, G., Ramalingam, T.R., Wynn, T.A., Chariot, A., Garcia-Perganeda, A., Leonardi, A., Paun, A., *et al.* (2009). The Adaptor Protein CIKS/Act1 Is Essential for IL-25-Mediated Allergic Airway Inflammation. *Journal of immunology* 182, 1617-1630.

Clerici, M., Saresella, M., Trabattoni, D., Speciale, L., Fossati, S., Ruzzante, S., Cavaretta, R., Filippi, M., Caputo, D., and Ferrante, P. (2001). Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in multiple sclerosis patients with active or quiescent disease. *Journal of neuroimmunology* 121, 88-101.

Codarri, L., Fontana, A., and Becher, B. (2010). Cytokine networks in multiple sclerosis: lost in translation. *Current opinion in neurology* 23, 205-211.

Cohen, J.A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H.P., Khatri, B.O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., *et al.* (2010). Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 362, 402-415.

Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., *et al.* (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology* 11, 1093-U1097.

Collison, L.W., Delgoffe, G.M., Guy, C.S., Vignali, K.M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A.R., Garcia, K.C., Hunter, C.A., Drake, C.G., *et al.* (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature immunology* 13, 290-299.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007a). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007b). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-U519.

Comi, G., Filippi, M., Wolinsky, J.S., and Aceta, E.C.G. (2001). European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. *Annals of neurology* 49, 290-297.

Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517.

Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., and Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Brit J Pharmacol* 164, 1079-1106.

Correale, J., Ysraelit, M., and Gaitan, M. (2009). Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 132, 1146-1160.

Cree, B.A., Lamb, S., Morgan, K., Chen, A., Waubant, E., and Genain, C. (2005). An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica. *Neurology* 64, 1270-1272.

Crellin, N.K., Garcia, R.V., and Levings, M.K. (2007). Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4(+) CD25(+) T regulatory cells. *Blood* 109, 2014-2022.

Cui, L., Bu, W., Song, J., Feng, L., Xu, T., Liu, D., Ding, W., Wang, J., Li, C., Ma, B., *et al.* (2018). Apoptosis induction by alantolactone in breast cancer MDA-MB-231 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway. *Arch Pharm Res* 41, 299-313.

Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current opinion in immunology* 22, 333-340.

Danikowski, K.M., Jayaraman, S., and Prabhakar, B.S. (2017). Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Journal of neuroinflammation* 14, 117.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology* 9, 1347-1355.

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3(+) T regulatory cells. *Journal of immunology* 178, 4022-4026.

Dean, G., and Kurtzke, J.F. (1971). On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *British medical journal* 3, 725-729.

Delves, P.J., and Roitt, I.M. (2000a). The immune system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 343, 37-49.

- Delves, P.J., and Roitt, I.M. (2000b). The immune system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 343, 108-117.
- Devergne, O., Hummel, M., Koeppen, H., LeBeau, M.M., Nathanson, E.C., Kieff, E., and Birkenbach, M. (1996). A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes (vol 70, pg 1145, 1996). *Journal of virology* 70, 2678-2678.
- Diab, A., Zhu, J., Xiao, B.G., Mustafa, M., and Link, H. (1997). High IL-6 and low IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56, 641-650.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., and Vollmar, A.M. (2001). Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis. *Planta medica* 67, 557-559.
- Duda, P.W., Schmied, M.C., Cook, S.L., Krieger, J.I., and Hafler, D.A. (2000). Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 105, 967-976.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* 10, 857-U872.
- Dumitru, C.D., Ceci, J.D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J.H., Patriotis, C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kollias, G., and Tschlis, P.N. (2000). TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103, 1071-1083.
- DuPage, M., and Bluestone, J.A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nature reviews. Immunology* 16, 149-163.
- Dupuis, G., Mitchell, J.C., and Towers, G.H. (1974). Reaction of alantolactone, an allergenic sesquiterpene lactone, with some amino acids. Resultant loss of immunologic reactivity. *Canadian journal of biochemistry* 52, 575-581.
- Durelli, L., Verdun, E., Barbero, P., Bergui, M., Versino, E., Ghezzi, A., Montanari, E., Zaffaroni, M., and Grp, I.T.S. (2002). Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet* 359, 1453-1460.
- Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y., and Littman, D.R. (2004). An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nature immunology* 5, 64-73.
- Ebers, G.C. (1994). Genetics and multiple sclerosis: an overview. *Annals of neurology* 36 Suppl, S12-14.
- Ebers, G.C., Bulman, D.E., Sadovnick, A.D., Paty, D.W., Warren, S., Hader, W., Murray, T.J., Seland, T.P., Duquette, P., Grey, T., and et al. (1986). A population-based study of multiple sclerosis in twins. *The New England journal of medicine* 315, 1638-1642.
- Elian, M., Nightingale, S., and Dean, G. (1990). Multiple-Sclerosis among United-Kingdom-Born Children of Immigrants from the Indian Subcontinent, Africa and the West-Indies. *J Neurol Neurosur Ps* 53, 906-911.

- Elias, K.M., Laurence, A., Davidson, T.S., Stephens, G., Kanno, Y., Shevach, E.M., and O'Shea, J.J. (2008). Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* *111*, 1013-1020.
- Engelhardt, B., and Kappos, L. (2008). Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *Neuro-degenerative diseases* *5*, 16-22.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odoriso, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., *et al.* (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation* *119*, 3573-3585.
- Fan, G.W., Zhang, Y., Jiang, X., Zhu, Y., Wang, B., Su, L., Cao, W., Zhang, H., and Gao, X. (2013). Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via estrogen receptor and NF-kappaB-dependent pathways. *Inflammation* *36*, 1584-1591.
- Farooqi, N., Gran, B., and Constantinescu, C.S. (2010). Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *Journal of neurochemistry* *115*, 829-844.
- Fidler, J.M., DeJoy, S.Q., and Gibbons, J.J., Jr. (1986a). Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *Journal of immunology* *137*, 727-732.
- Fidler, J.M., DeJoy, S.Q., Smith, F.R., 3rd, and Gibbons, J.J., Jr. (1986b). Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice. *Journal of immunology* *136*, 2747-2754.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). 2 Types of Mouse T-Helper Cell .4. Th2 Clones Secrete a Factor That Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones. *J Exp Med* *170*, 2081-2095.
- Fisniku, L.K., Brex, P.A., Altmann, D.R., Miszkiel, K.A., Benton, C.E., Lanyon, R., Thompson, A.J., and Miller, D.H. (2008). Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* *131*, 808-817.
- Fitzgerald, D.C., Zhang, G.X., Ei-Behi, M., Fonseca-Kelly, Z., Li, H., Yu, S., Saris, C.J., Gran, B., Ciric, B., and Rostami, A. (2008). Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells (vol 8, pg 1372, 2007). *Nature immunology* *9*, 105-105.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., *et al.* (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS biology* *5*, e38.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* *4*, 330-336.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2017). Pillars Article: Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Nat. Immunol.* 2003. 4: 330-336. *Journal of immunology* *198*, 986-992.

- Frisullo, G., Angelucci, F., Caggiula, M., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A.K., Sancricca, C., Mirabella, M., Tonali, P.A., and Batocchi, A.P. (2006). pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *J Neurosci Res* 84, 1027-1036.
- Frohman, E.M., Racke, M.K., and Raine, C.S. (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine* 354, 942-955.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., and Bromberg, J.S. (2004). TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 1614-1627.
- Fujihashi, T., Hara, H., Sakata, T., Mori, K., Higuchi, H., Tanaka, A., Kaji, H., and Kaji, A. (1995). Anti-human immunodeficiency virus (HIV) activities of halogenated gomisin J derivatives, new nonnucleoside inhibitors of HIV type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39, 2000-2007.
- Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews. Immunology* 9, 556-567.
- Gandhi, R., Laroni, A., and Weiner, H.L. (2010). Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 221, 7-14.
- Ghigo, A., Damilano, F., Braccini, L., and Hirsch, E. (2010). PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays* 32, 185-196.
- Giridharan, V.V., Thandavarayan, R.A., Sato, S., Ko, K.M., and Konishi, T. (2011). Prevention of scopolamine-induced memory deficits by schisandrin B, an antioxidant lignan from *Schisandra chinensis* in mice. *Free Radic Res* 45, 950-958.
- Gold, R., Linington, C., and Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain : a journal of neurology* 129, 1953-1971.
- Gray, O.M., McDonnell, G.V., and Hawkins, S.A. (2008). Factors in the rising prevalence of multiple sclerosis in the north-east of Ireland. *Multiple sclerosis* 14, 880-886.
- Groves, A., Kihara, Y., and Chun, J. (2013). Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. *Journal of the neurological sciences* 328, 9-18.
- Gulen, M.F., Kang, Z., Bulek, K., Youzhong, W., Kim, T.W., Chen, Y., Altuntas, C.Z., Sass Bak-Jensen, K., McGeachy, M.J., Do, J.S., *et al.* (2010). The receptor SIGIRR suppresses Th17 cell proliferation via inhibition of the interleukin-1 receptor pathway and mTOR kinase activation. *Immunity* 32, 54-66.
- Gutcher, I., and Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of clinical investigation* 117, 1119-1127.
- Harrington, L.E., Mangan, P.R., and Weaver, C.T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current opinion in immunology* 18, 349-356.

- Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., *et al.* (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *Journal of immunology* 179, 4313-4317.
- Hauser, S.L. (2008). Multiple lessons for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 359, 1838-1841.
- Hauser, S.L., Chan, J.R., and Oksenberg, J.R. (2013). Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Annals of neurology* 74, 317-327.
- Hauser SL, J.S., English JD, Engstrom JW. (2009). *Harrison Neurology in Clinic Medicine.* (İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri).
- Haxhinasto, S., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4(+)Foxp3(+) cells. *J Exp Med* 205, 565-574.
- Hebenstreit, D., Horejs-Hoeck, J., and Duschl, A. (2005). JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 18, 243-249.
- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R., and Kastelein, R.A. (2003). IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 23, 513-522.
- Hikino, H., Kiso, Y., Taguchi, H., and Ikeya, Y. (1984). Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits. *Planta medica* 50, 213-218.
- Hollenbach, J.A., and Oksenberg, J.R. (2015). The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of autoimmunity* 64, 13-25.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003a). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003b). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Howard, J., Trevick, S., and Younger, D.S. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurologic clinics* 34, 919-939.
- Howland, K.C., Ausubel, L.J., London, C.A., and Abbas, A.K. (2000). The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *Journal of immunology* 164, 4465-4470.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., Ogarra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of Th1 Cd4+ T-Cells through Il-12 Produced by Listeria-Induced Macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Murphy, A.J., *et al.* (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 491, 259-+.
- Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E., and Wagner, E.F. (2007). p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell cycle* 6, 2429-2433.

İliçin G, B.K., Süleymanler G, Ünal S, (2012). Multipl skleroz ve demiyelinizan hastalıklar. , Vol 3. Baskı. (İstanbul, Güneş Tıp Kitabevleri.).

Ip, S.P., and Ko, K.M. (1996). The crucial antioxidant action of schisandrin B in protecting against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice: a comparative study with butylated hydroxytoluene. *Biochemical pharmacology* 52, 1687-1693.

Islam, T., Gauderman, W.J., Cozen, W., and Mack, T.M. (2007). Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology* 69, 381-388.

Ito, A., Matejuk, A., Hopke, C., Drought, H., Dwyer, J., Zamora, A., Subramanian, S., Vandembark, A.A., and Offner, H. (2003). Transfer of severe experimental autoimmune encephalomyelitis by IL-12- and IL-18-potentiated T cells is estrogen sensitive. *Journal of immunology* 170, 4802-4809.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17(+) T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009a). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of immunology* 183, 7169-7177.

Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009b). Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *Journal of immunology* 183, 7169-7177.

Jakkula, E., Leppä, V., Sulonen, A.M., Varilo, T., Kallio, S., Kemppinen, A., Purcell, S., Koivisto, K., Tienari, P., Sumelahti, M.L., *et al.* (2010). Genome-wide Association Study in a High-Risk Isolate for Multiple Sclerosis Reveals Associated Variants in STAT3 Gene. *Am J Hum Genet* 86, 285-291.

Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.

Jia, R., Zhang, H., Yang, Z., Zhao, H., Liu, F., Wang, H., Miao, M., Wang, Q., and Liu, Y. (2017). Protective effects of Schisandrin B on cigarette smoke-induced airway injury in mice through Nrf2 pathway. *International immunopharmacology* 53, 11-16.

Johnson, K.P. (2007). Natalizumab (Tysabri) treatment for relapsing multiple sclerosis. *The neurologist* 13, 182-187.

Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., *et al.* (2001). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 57, S16-S24.

Julia S., C.C., Giulia M., Stefano P. (2015). Multiple Sclerosis. In *Neurobiology of Brain Disorders* (Department of Clinical Neurosciences, John van Geest Centre for Brain Repair, Wellcome Trust–MRC Stem Cell

Institute and NIHR Biomedical Research Centre, University of Cambridge, Cambridge, UK), pp. 497-520.

- Kampman, M.T., Wilsgaard, T., and Mellgren, S.I. (2007). Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *Journal of neurology* 254, 471-477.
- Kane, L.P., and Weiss, A. (2003). The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunological reviews* 192, 7-20.
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., and Grusby, M.J. (1996a). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
- Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., and Grusby, M.J. (1996b). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177.
- Kappos, L., Radue, E.W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., *et al.* (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 362, 387-401.
- Kasper, L.H., and Shoemaker, J. (2010). Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology* 74 Suppl 1, S2-8.
- Kennedy, M.K., Torrance, D.S., Picha, K.S., and Mohler, K.M. (1992). Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *Journal of immunology* 149, 2496-2505.
- Khan, M., Li, T., Ahmad Khan, M.K., Rasul, A., Nawaz, F., Sun, M., Zheng, Y., and Ma, T. (2013). Alantolactone induces apoptosis in HepG2 cells through GSH depletion, inhibition of STAT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *BioMed research international* 2013, 719858.
- Khosnam, M., and Freedman, M.S. (2012). Disease-specific therapy of idiopathic inflammatory demyelinating disorders. *Expert review of neurotherapeutics* 12, 1113-1124.
- Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., and Onoe, K. (2003). Differential role of mitogen-activated protein kinases in CD40-mediated IL-12 production by immature and mature dendritic cells. *Immunology letters* 89, 149-154.
- Kim, M., Song, K., and Kim, Y.S. (2017a). Alantolactone improves palmitate-induced glucose intolerance and inflammation in both lean and obese states in vitro: Adipocyte and adipocyte-macrophage co-culture system. *International immunopharmacology* 49, 187-194.
- Kim, M., Song, K., and Kim, Y.S. (2017b). Alantolactone Improves Prolonged Exposure of Interleukin-6-Induced Skeletal Muscle Inflammation Associated Glucose Intolerance and Insulin Resistance. *Frontiers in pharmacology* 8, 405.
- Kim, Y.M., Sachs, T., Asavaroengchai, W., Bronson, R., and Sykes, M. (2003). Graft-versus-host disease can be separated from graft-versus-lymphoma effects by control of lymphocyte trafficking with FTY720. *Journal of Clinical Investigation* 111, 659-669.
- Kingwell, E., Marriott, J.J., Jette, N., Pringsheim, T., Makhani, N., Morrow, S.A., Fisk, J.D., Evans, C., Beland, S.G., Kulaga, S., *et al.* (2013). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC neurology* 13, 128.
- Kluver, H., and Barrera, E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 12, 400-403.

Ko, K.M., Chen, N., Leung, H.Y., Leong, E.P., Poon, M.K., and Chiu, P.Y. (2008). Long-term schisandrin B treatment mitigates age-related impairments in mitochondrial antioxidant status and functional ability in various tissues, and improves the survival of aging C57BL/6J mice. *BioFactors* 34, 331-342.

Ko, K.M., and Lam, B.Y. (2002). Schisandrin B protects against tert-butylhydroperoxide induced cerebral toxicity by enhancing glutathione antioxidant status in mouse brain. *Molecular and cellular biochemistry* 238, 181-186.

Koch-Henriksen, N., and Sorensen, P.S. (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet. Neurology* 9, 520-532.

Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology* 10, 595-602.

Koga, T., Hedrich, C.M., Mizui, M., Yoshida, N., Otomo, K., Lieberman, L.A., Rauen, T., Crispin, J.C., and Tsokos, G.C. (2014). CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM-alpha underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *The Journal of clinical investigation* 124, 2234-2245.

Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 169, 4712-4716.

Komada, H., Imai, A., Hattori, E., Ito, M., Tsumura, H., Onoda, T., Kuramochi, M., Tani, M., Yamamoto, K., Yamane, M., *et al.* (2006). Possible activation of murine T lymphocyte through CD98 is independent of interleukin 2/interleukin 2 receptor system. *Biomedical research* 27, 61-67.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 177, 566-573.

Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., and Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10, 387-398.

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-U489.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27, 485-517.

Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A.L., Awasthi, A., Dardalhon, V.A., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G.L., Kaplan, M.H., Waisman, A., *et al.* (2008). IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3(+) regulatory T cells. *P Natl Acad Sci USA* 105, 18460-18465.

Kortesoja, M., Karhu, E., Olafsdottir, E.S., Freysdottir, J., and Hanski, L. (2019). Impact of dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* on the redox status and activation of human innate immune system cells. *Free radical biology & medicine* *131*, 309-317.

Kragt, J., van Amerongen, B., Killestein, J., Dijkstra, C., Uitdehaag, B., Polman, C., and Lips, P. (2009). Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Multiple sclerosis* *15*, 9-15.

Krebs, D.L., and Hilton, D.J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells* *19*, 378-387.

Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renaud, J.C., and Becher, B. (2007). IL-22 is expressed by TH17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* *179*, 8098-8104.

Krieger, S.C., and Sumowski, J. (2018). New Insights into Multiple Sclerosis Clinical Course from the Topographical Model and Functional Reserve. *Neurologic clinics* *36*, 13-25.

Laaksonen, H., Guerreiro-Cacais, A.O., Adzemovic, M.Z., Parsa, R., Zeitelhofer, M., Jagodic, M., and Olsson, T. (2014). The multiple sclerosis risk gene IL22RA2 contributes to a more severe murine autoimmune neuroinflammation. *Genes and immunity* *15*, 457-465.

Lafaille, J.J., VandeKeere, F., Hsu, A.L., Baron, J.L., Haas, W., Raine, C.S., and Tonegawa, S. (1997). Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *Journal of Experimental Medicine* *186*, 307-312.

Lam, P.Y., and Ko, K.M. (2012). Schisandrin B as a Hormetic Agent for Preventing Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine* *201*, 233-240.

Lassmann, H. (2008). Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* *274*, 45-47.

Lassmann, H. (2014). Multiple sclerosis: lessons from molecular neuropathology. *Experimental neurology* *262 Pt A*, 2-7.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* *26*, 371-381.

Lawrence, N.J., McGown, A.T., Nduka, J., Hadfield, J.A., and Pritchard, R.G. (2001). Cytotoxic Michael-type amine adducts of alpha-methylene lactones alantolactone and isosalantolactone. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *11*, 429-431.

Lee, B.K., Park, S.J., Nam, S.Y., Kang, S., Hwang, J., Lee, S.J., and Im, D.S. (2018). Anti-allergic effects of sesquiterpene lactones from *Saussurea costus* (Falc.) Lipsch determined using in vivo and in vitro experiments. *J Ethnopharmacol* *213*, 256-261.

- Lee, C.C., and Kung, J.T. (2012). Marginal Zone B Cell Is a Major Source of Il-10 in *Listeria monocytogenes* Susceptibility. *Journal of immunology* 189, 3319-3327.
- Lee, T.H., Jung, C.H., and Lee, D.H. (2012). Neuroprotective effects of Schisandrin B against transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 4239-4245.
- Lee, T.S., and Chau, L.Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8, 240-246.
- Lemire, J.M., and Archer, D.C. (1991). 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 87, 1103-1107.
- Leong, P.K., Chen, N., and Ko, K.M. (2012). Mitochondrial decay in ageing: 'Qi-invigorating' schisandrin B as a hormetic agent for mitigating age-related diseases. *Clin Exp Pharmacol P* 39, 256-264.
- Leong, P.K., and Ko, K.M. (2016). Schisandrin B: A Double-Edged Sword in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev*.
- Li, H., and Rostami, A. (2010). IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 5, 198-209.
- Li, L., Kim, J., and Boussiotis, V.A. (2010). IL-1beta-mediated signals preferentially drive conversion of regulatory T cells but not conventional T cells into IL-17-producing cells. *Journal of immunology* 185, 4148-4153.
- Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* 203, 2271-2279.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., and O'Shea, J.J. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *P Natl Acad Sci USA* 98, 15137-15142.
- Lim, H.S., Jin, S.E., Kim, O.S., Shin, H.K., and Jeong, S.J. (2015). Alantolactone from *Saussurea lappa* Exerts Antiinflammatory Effects by Inhibiting Chemokine Production and STAT1 Phosphorylation in TNF-alpha and IFN-gamma-induced in HaCaT cells. *Phytotherapy research : PTR* 29, 1088-1096.
- Lim, S.S., Kim, J.R., Lim, H.A., Jang, C.H., Kim, Y.K., Konishi, T., Kim, E.J., Park, J.H., and Kim, J.S. (2007). Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in *Inula helenium*. *Journal of medicinal food* 10, 503-510.
- Lin, Q., Qin, X., Shi, M., Qin, Z., Meng, Y., Qin, Z., and Guo, S. (2017). Schisandrin B inhibits LPS-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells by activating Nrf2. *International immunopharmacology* 49, 142-147.

Lindahl, H., Martini, E., Brauner, S., Nikamo, P., Gallais Serezal, I., Guerreiro-Cacais, A.O., Jagodic, M., Eidsmo, L., Stahle, M., and Olsson, T. (2017). IL-22 binding protein regulates murine skin inflammation. *Experimental dermatology* 26, 444-446.

Lindell, D.M., Berlin, A.A., Schaller, M.A., and Lukacs, N.W. (2008). B Cell Antigen Presentation Promotes Th2 Responses and Immunopathology during Chronic Allergic Lung Disease. *PLoS one* 3.

Liston, A., Kohler, R.E., Townley, S., Haylock-Jacobs, S., Comerford, I., Caon, A.C., Webster, J., Harrison, J.M., Swann, J., Clark-Lewis, I., *et al.* (2009). Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *Journal of immunology* 182, 3121-3130.

Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140, 845-858.

Liu, G.T. (1985). Hepato-Pharmacology of Fructus schisandrae. In *Advances in Chinese Medical Materials Research*, C. HM, ed. (Singapore: World Scientific Publishing Co., pp. 257-268.), pp. 257-268.

Liu, W., Liu, Y., Wang, Z., Yu, T., Lu, Q., and Chen, H. (2015). Suppression of MAPK and NF-kappa B pathways by schisandrin B contributes to attenuation of DSS-induced mice model of inflammatory bowel disease. *Die Pharmazie* 70, 598-603.

Liu, W., Ouyang, X., Yang, J., Liu, J., Li, Q., Gu, Y., Fukata, M., Lin, T., He, J.C., Abreu, M., *et al.* (2009). AP-1 activated by toll-like receptors regulates expression of IL-23 p19. *The Journal of biological chemistry* 284, 24006-24016.

Liu, X., Lee, Y.S., Yu, C.R., and Egwuagu, C.E. (2008). Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *Journal of immunology* 180, 6070-6076.

Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., Riethmacher, D., Si-Tahar, M., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2008). In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 205, 1381-1393.

Loma, I., and Heyman, R. (2011). Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Curr Neuropharmacol* 9, 409-416.

Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F. (1993). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *The Journal of experimental medicine* 178, 537-547.

Lu, L., Wang, J., Zhang, F., Chai, Y., Brand, D., Wang, X., Horwitz, D.A., Shi, W., and Zheng, S.G. (2010a). Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *Journal of immunology* 184, 4295-4306.

Lu, L., Wang, J., Zhang, F., Chai, Y., Brand, D., Wang, X.H., Horwitz, D.A., Shi, W., and Zheng, S.G. (2010b). Role of SMAD and Non-SMAD Signals in the Development of Th17 and Regulatory T Cells. *Journal of immunology* 184, 4295-4306.

- Lublin, F.D., and Reingold, S.C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 47, 707-717.
- Lucchinetti, C.F., Brueck, W., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (1998). Multiple sclerosis: lessons from neuropathology. *Semin Neurol* 18, 337-349.
- Luk, K.F., Ko, K.M., and Ng, K.M. (2008). Separation and purification of schisandrin B from *Fructus schisandrae*. *Ind Eng Chem Res* 47, 4193-4201.
- Ma, X.J., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.E., Dzialo, R., and Trinchieri, G. (1996). The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *Journal of Experimental Medicine* 183, 147-157.
- Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., and Allen, J.E. (2004). Helminth parasites - masters of regulation. *Immunological reviews* 201, 89-116.
- Malemud, C.J. (2015). The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? *Future Med Chem* 7, 1137-1147.
- Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nature immunology* 9, 641-649.
- Maryam, A., Mehmood, T., Zhang, H., Li, Y.M., Khan, M., and Ma, T.H. (2017). Alantolactone induces apoptosis, promotes STAT3 glutathionylation and enhances chemosensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells to doxorubicin via oxidative stress. *Scientific reports* 7.
- Mastorodemos, V., Ioannou, M., and Verginis, P. (2015). Cell-Based Modulation of Autoimmune Responses in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Therapeutic Implications. *Neuroimmunomodulat* 22, 181-195.
- Mattapallil, M.J., Kielczewski, J.L., Zarate-Blades, C.R., St Leger, A.J., Raychaudhuri, K., Silver, P.B., Jittayasothorn, Y., Chan, C.C., and Caspi, R.R. (2019). Interleukin 22 ameliorates neuropathology and protects from central nervous system autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 102, 65-76.
- McAllister, F., Henry, A., Kreindler, J.L., Dubin, P.J., Ulrich, L., Steele, C., Finder, J.D., Pilewski, J.M., Carreno, B.M., Goldman, S.J., *et al.* (2005). Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *Journal of immunology* 175, 404-412.
- McDonnell, G.V., and Hawkins, S.A. (1999). High incidence and prevalence of multiple sclerosis in south east Scotland: evidence of a genetic predisposition. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 66, 411.
- McFarland, H.F., and Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology* 8, 913-919.

- McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature immunology* 10, 314-324.
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A., and Anderton, S.M. (2005a). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4(+)CD25(+) regulatory cells within the central nervous system. *Journal of immunology* 175, 3025-3032.
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A., and Anderton, S.M. (2005b). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *Journal of immunology* 175, 3025-3032.
- Merrill, J.E. (1992). Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines in Multiple-Sclerosis and Central-Nervous-System Acquired-Immunodeficiency-Syndrome. *J Immunother* 12, 167-170.
- Merritt, C., Enslin, H., Diehl, N., Conze, D., Davis, R.J., and Rincon, M. (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells. *Molecular and cellular biology* 20, 936-946.
- Micallef, M.J., Ohtsuki, T., Kohno, K., Tanabe, F., Ushio, S., Namba, M., Tanimoto, T., Torigoe, K., Fuji, M., Ikeda, M., *et al.* (1996). Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: Synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *European journal of immunology* 26, 1647-1651.
- Miller, A., Shapiro, S., Gershtein, R., Kinarty, A., Rawashdeh, H., Honigman, S., and Lahat, N. (1998). Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *Journal of neuroimmunology* 92, 113-121.
- Miller, D.H., Khan, O.A., Sheremata, W.A., Blumhardt, L.D., Rice, G.P., Libonati, M.A., Willmer-Hulme, A.J., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., O'Connor, P.W., and International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial, G. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 348, 15-23.
- Milo, R., and Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews* 9, A387-394.
- Milo, R., and Miller, A. (2014). Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews* 13, 518-524.
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., *et al.* (1993). Interleukin-13 Is a New Human Lymphokine Regulating Inflammatory and Immune-Responses. *Nature* 362, 248-250.
- Mitchell, J.C., Fritig, B., Singh, B., and Towers, G.H. (1970). Allergic contact dermatitis from *Frullania* and *Compositae*. The role of sesquiterpene lactones. *The Journal of investigative dermatology* 54, 233-239.
- Monin, L., and Gaffen, S.L. (2018). Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10.
- Mosmann, T.R. (1994). Properties and functions of interleukin-10. *Advances in immunology* 56, 1-26.

- Mosmann, T.R., Schumacher, J.H., Street, N.F., Budd, R., O'Garra, A., Fong, T.A., Bond, M.W., Moore, K.W., Sher, A., and Fiorentino, D.F. (1991). Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺ T cells. *Immunological reviews* 123, 209-229.
- Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., and Reiner, S.L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910.
- Mullen, A.C., Hutchins, A.S., High, F.A., Lee, H.W., Sykes, K.J., Chodosh, L.A., and Reiner, S.L. (2002). Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nature immunology* 3, 652-658.
- Munger, K.L., Zhang, S.M., O'Reilly, E., Hernan, M.A., Olek, M.J., Willett, W.C., and Ascherio, A. (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62, 60-65.
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology* 2, 933-944.
- Murray, T.J. (2009). Robert Carswell: the first illustrator of MS. *International MS journal* 16, 98-101.
- Namiki, K., Matsunaga, H., Yoshioka, K., Tanaka, K., Murata, K., Ishida, J., Sakairi, A., Kim, J., Tokuhara, N., Shibakawa, N., *et al.* (2012). Mechanism for p38alpha-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of biological chemistry* 287, 24228-24238.
- Nancy J. H., D.E.N. (April 2006). Young Adults With Multiple Sclerosis: Management in the Home. *Home Health Care Management & Practice* 18, 186-195.
- Nikolic, I., Vujicic, M., Stojanovic, I., Stosic-Grujicic, S., and Saksida, T. (2014). Carbon monoxide-releasing molecule-A1 inhibits Th1/Th17 and stimulates Th2 differentiation in vitro. *Scandinavian journal of immunology* 80, 95-100.
- Nurieva, R., Yang, X.X.O., Martinez, G., Zhang, Y.L., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., and Dong, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480-U488.
- O'Connor, R.A., and Anderton, S.M. (2008). Multi-faceted control of autoaggression: Foxp3⁺ regulatory T cells in murine models of organ-specific autoimmune disease. *Cellular immunology* 251, 8-18.
- O'Connor, R.A., Malpass, K.H., and Anderton, S.M. (2007). The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3(+) regulatory T cells. *Journal of immunology* 179, 958-966.
- Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., *et al.* (1995). Cloning of a New Cytokine That Induces Ifn-Gamma Production by T-Cells. *Nature* 378, 88-91.
- Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C.C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., and Yanagihara, T. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *International immunology* 10, 703-708.

- Olson, B.M., Sullivan, J.A., and Burlingham, W.J. (2013). Interleukin 35: a key mediator of suppression and the propagation of infectious tolerance. *Front Immunol* 4.
- Ontaneda, D., Fox, R.J., and Chataway, J. (2015). Clinical trials in progressive multiple sclerosis: lessons learned and future perspectives. *The Lancet. Neurology* 14, 208-223.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y.M., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.
- Orton, S.M., Herrera, B.M., Yee, I.M., Valdar, W., Ramagopalan, S.V., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., and Canadian Collaborative Study, G. (2006). Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *The Lancet. Neurology* 5, 932-936.
- Ouyang, S., Zeng, Q., Tang, N., Guo, H., Tang, R., Yin, W., Wang, A., Tang, H., Zhou, J., Xie, H., *et al.* (2019). Akt-1 and Akt-2 Differentially Regulate the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Controlling Proliferation of Thymus-Derived Regulatory T Cells. *Journal of immunology* 202, 1441-1452.
- Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Huang, Y.M., Kivisakk, P., and Link, H. (2000a). Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)- and IL-10-secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment. *Clin Exp Immunol* 120, 147-153.
- Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Pashenkov, M., Fredrikson, S., and Link, H. (2000b). Multiple sclerosis: Pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN-beta. *Journal of neuroimmunology* 108, 236-243.
- P., C.T. (2010). Exploring the pathogenic potential of myelin reactive Th1 and Th17 cells in central nervous system autoimmune disease. In *Immune Cell Entry to Central Nervous System* (University of Edinburgh, University of Edinburgh).
- P., P. (2009.). *The Immune System.* , 3rd ed: Garland Science; edn (3rd ed: Garland Science; : 3rd ed: Garland Science;).
- Palanichamy, A., Jahn, S., Nickles, D., Derstine, M., Abounasr, A., Hauser, S.L., Baranzini, S.E., Leppert, D., and von Budingen, H.C. (2014). Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *Journal of immunology* 193, 580-586.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P. (1987a). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1, 893-895.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., and Johnson, K.P. (1987b). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37, 1097-1102.
- Panossian, A., and Wikman, G. (2008). Pharmacology of Schisandra chinensis Bail.: An overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol* 118, 183-212.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., Vega, F., *et al.* (2002). A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R beta 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of immunology* 168, 5699-5708.

- Park, C.O., and Kupper, T.S. (2015). The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med* 21, 688-697.
- Paty, D.W., Li, D.K.B., Grp, U.M.M.S., and Grp, I.M.S.S. (2001). Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 57, S10-S15.
- Pedersen, L.B., Nashold, F.E., Spach, K.M., and Hayes, C.E. (2007). 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *Journal of neuroscience research* 85, 2480-2490.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* 37, 273-283.
- Peters, M., Muller, A.M., and Rose-John, S. (1998). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: Direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 92, 3495-3504.
- Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J.F., Phillips, J.H., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R.A. (2004). WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *Journal of immunology* 172, 2225-2231.
- Pflanz, S., Timans, J.C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., *et al.* (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* 16, 779-790.
- Pierrot-Deseilligny, C., and Souberbielle, J.C. (2017). Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple sclerosis and related disorders* 14, 35-45.
- Plotnikov, A., Chuderland, D., Karamansha, Y., Livnah, O., and Seger, R. (2011). Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Molecular and cellular biology* 31, 3515-3530.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., *et al.* (2011). Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Annals of neurology* 69, 292-302.
- Powrie, F., Fowell, D., McKnight, A.J., and Mason, D. (1991). Lineage relationships and functions of CD4+ T-cell subsets in the rat. *Research in immunology* 142, 54-58.
- Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., *et al.* (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature immunology* 13, 170-180.
- Pugliatti, M., Sotgiu, S., and Rosati, G. (2002). The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery* 104, 182-191.
- Qiao, G.L., Zhao, Y.X., Li, Z.P., Tang, P.Q., Langdon, W.Y., Yang, T.L., and Zhang, J. (2013). T Cell Activation Threshold Regulated by E3 Ubiquitin Ligase Cbl-b Determines Fate of Inducible Regulatory T Cells. *Journal of immunology* 191, 632-639.
- RA., R. (2009). *Demiyelinizan hastalıklar. (İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. : İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.)*.

- Rasul, A., Khan, M., Ali, M., Li, J., and Li, X. (2013). Targeting apoptosis pathways in cancer with alantolactone and isoalantolactone. *TheScientificWorldJournal* 2013, 248532.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J* 22, 659-661.
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H.M., and Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods* 293, 127-142.
- Rice, G.P., Hartung, H.P., and Calabresi, P.A. (2005). Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 64, 1336-1342.
- Rickel, E.A., Siegel, L.A., Yoon, B.R.P., Rottman, J.B., Kugler, D.G., Swart, D.A., Anders, P.M., Tocker, J.E., Comeau, M.R., and Budelsky, A.L. (2008). Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities. *Journal of immunology* 181, 4299-4310.
- Rincon, M., and Davis, R.J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunological reviews* 228, 212-224.
- Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M.S., Penix, L.A., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (1998). Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *The EMBO journal* 17, 2817-2829.
- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S.B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., and O'Garra, A. (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NF kappa B. *Immunity* 7, 571-581.
- Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J., and Weiss, A. (2005). A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Molecular and cellular biology* 25, 4426-4441.
- Roose, J.P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T., and Weiss, A. (2007). Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. *Molecular and cellular biology* 27, 2732-2745.
- Rose-John, S. (2001). Coordination of interleukin-6 biology by membrane bound and soluble receptors. *Progress in Basic and Clinical Immunology* 495, 145-151.
- Rosenberg, L.S., Carvlin, M.J., and Krugh, T.R. (1986). The antitumor agent mitoxantrone binds cooperatively to DNA: evidence for heterogeneity in DNA conformation. *Biochemistry* 25, 1002-1008.
- Rott, O., Fleischer, B., and Cash, E. (1994). Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 24, 1434-1440.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 161, 72-87.

- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* *155*, 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Toda, M., Asano, M., Itoh, M., Morse, S.S., and Sakaguchi, N. (1996). T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* *9*, 211-220.
- Samoilova, E.B., Horton, J.L., Hilliard, B., Liu, T.S., and Chen, Y. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *Journal of immunology* *161*, 6480-6486.
- Sandoval-Montes, C., and Santos-Argumedo, L. (2005). CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukocyte Biol* *77*, 513-521.
- Sawant, D.V., Hamilton, K., and Vignali, D.A. (2015). Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* *35*, 499-512.
- Schulz, E.G., Mariani, L., Radbruch, A., and Hofer, T. (2009). Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* *30*, 673-683.
- Seo, J.Y., Lim, S.S., Kim, J.R., Lim, J.S., Ha, Y.R., Lee, I.A., Kim, E.J., Park, J.H., and Kim, J.S. (2008). Nrf2-mediated induction of detoxifying enzymes by alantolactone present in *Inula helenium*. *Phytotherapy research : PTR* *22*, 1500-1505.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* *261*, 609-612.
- Sharpe, G., Price, S.E., Last, A., and Thompson, R.J. (1995). Multiple sclerosis in island populations: prevalence in the Bailiwicks of Guernsey and Jersey. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* *58*, 22-26.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., *et al.* (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* *507*, 366-370.
- Shi, Y., Bao, Y.L., Wu, Y., Yu, C.L., Huang, Y.X., Sun, Y., Zheng, L.H., and Li, Y.X. (2011). Alantolactone inhibits cell proliferation by interrupting the interaction between Cripto-1 and activin receptor type II A in activin signaling pathway. *Journal of biomolecular screening* *16*, 525-535.
- Shin, R.K. (2014). *Multiple Sclerosis; Diagnosis.* , Vol (Vol. 3, pp. 148–152). (Baltimore: Elsevier.: Baltimore: Elsevier.).
- Shin, T., Ahn, M., Jung, K., Heo, S., Kim, D., Jee, Y., Lim, Y.K., and Yeo, E.J. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* *140*, 118-125.

- Simons, M., Misgeld, T., and Kerschensteiner, M. (2014). A unified cell biological perspective on axon-myelin injury. *The Journal of cell biology* 206, 335-345.
- Simpson, S., Jr., Blizzard, L., Otahal, P., Van der Mei, I., and Taylor, B. (2011). Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82, 1132-1141.
- Soilu-Hanninen, M., Airas, L., Mononen, I., Heikkila, A., Viljanen, M., and Hanninen, A. (2005). 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler J* 11, 266-271.
- Sonar, S.A., and Lal, G. (2019). The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Frontiers in immunology* 10, 710.
- Song, M.Y., Wang, J.H., Eom, T., and Kim, H. (2015). Schisandra chinensis fruit modulates the gut microbiota composition in association with metabolic markers in obese women: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Nutr Res* 35, 655-663.
- Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature immunology* 12, 383-390.
- Sorensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S.X., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., *et al.* (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Journal of Clinical Investigation* 103, 807-815.
- Stephens, L.A., Malpass, K.H., and Anderton, S.M. (2009). Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3(+) Treg. *European journal of immunology* 39, 1108-1117.
- Stoll, S., Jonuleit, H., Schmitt, E., Muller, G., Yamauchi, H., Kurimoto, M., Knop, J., and Enk, A.H. (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *European journal of immunology* 28, 3231-3239.
- Stritesky, G.L., Yeh, N., and Kaplan, M.H. (2008). IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *Journal of immunology* 181, 5948-5955.
- Sun, D., Li, Q., Li, H., Li, Y., and Piao, Z. (2014). Quantitative analysis of six lignans in fruits with different colours of Schisandra chinensis by HPLC. *Natural product research* 28, 581-585.
- Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E., and Littman, D.R. (2000). Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 288, 2369-2373.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X.K., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Taga, T. (1997). The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann Med* 29, 63-72.
- Taga, T., and Kishimoto, T. (1997). gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual review of immunology* 15, 797-819.

- Takamiya, R., Ohtsubo, K., Takamatsu, S., Taniguchi, N., and Angata, T. (2013). The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF-beta secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway. *Glycobiology* 23, 178-187.
- Taraban, V.Y., Rowley, T.F., Kerr, J.P., Willoughby, J.E., Johnson, P.M., Al-Shamkhani, A., and Buchan, S.L. (2013). CD27 costimulation contributes substantially to the expansion of functional memory CD8(+) T cells after peptide immunization. *European journal of immunology* 43, 3314-3323.
- Terzi, M., Birinci, A., Cetinkaya, E., and Onar, M.K. (2007). Cerebrospinal fluid total tau protein levels in patients with multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica* 115, 325-330.
- Tetsuya K., Vijayasree V. G., and T., a.R.A. (2012). Schisandrin B, a Lignan from Schisandra chinensis Prevents Cerebral Oxidative Damage and Memory Decline Through Its Antioxidant Property. *When Things Go Wrong – Diseases and Disorders of the Human Brain* 10.5772/34332, 256-264.
- Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., and Ihle, J.N. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, 171-174.
- Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International journal of biological sciences* 5, 44-51.
- Trapp, B.D., and Stys, P.K. (2009). Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology* 8, 280-291.
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T-H-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology* 10, 864-U873.
- Tripathi, S.K., and Lahesmaa, R. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of T-helper lineage specification. *Immunological reviews* 261, 62-83.
- Tube, N.J., Pagan, A.J., Taylor, J.J., Nelson, R.W., Linehan, J.L., Ertelt, J.M., Huseby, E.S., Way, S.S., and Jenkins, M.K. (2013). Single Naive CD4(+) T Cells from a Diverse Repertoire Produce Different Effector Cell Types during Infection. *Cell* 153, 785-796.
- Tubridy, N., Behan, P.O., Capildeo, R., Chaudhuri, A., Forbes, R., Hawkins, C.P., Hughes, R.A., Palace, J., Sharrack, B., Swingler, R., *et al.* (1999). The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology* 53, 466-472.
- Turk Boru, U., Alp, R., Sur, H., and Gul, L. (2006). Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey. *Neuroepidemiology* 27, 17-21.
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18, 415-428.
- Usui, T., Preiss, J.C., Kanno, Y., Yao, Z.J., Bream, J.H., O'Shea, J.J., and Strober, W. (2006). T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *Journal of Experimental Medicine* 203, 755-766.

van der Mei, H.C., Kamminga-Rasker, H.J., de Vries, J., Busscher, H.J., White, D.J., Date, R., Day, T., White, C.D., and Williams, M.K. (2003). The influence of a hexametaphosphate-containing chewing gum on the wetting ability of salivary conditioning films in vitro and in vivo. *The Journal of clinical dentistry* 14, 14-18.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* 9, 1341-1346.

Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C., and O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Journal of immunology* 172, 5986-5993.

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 199, 971-979.

Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 8, 523-532.

Wang, B., and Wang, X.M. (2009). Schisandrin B protects rat cortical neurons against Abeta1-42-induced neurotoxicity. *Die Pharmazie* 64, 450-454.

Wang, J.P., Raung, S.L., Hsu, M.F., and Chen, C.C. (1994). Inhibition by gomisin C (a lignan from *Schizandra chinensis*) of the respiratory burst of rat neutrophils. *British journal of pharmacology* 113, 945-953.

Wang, X., Lan, Y.L., Xing, J.S., Lan, X.Q., Wang, L.T., and Zhang, B. (2018). Alantolactone plays neuroprotective roles in traumatic brain injury in rats via anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-apoptosis pathways. *American journal of translational research* 10, 368-380.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology* 25, 821-852.

Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., and O'Shea, J.J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 282, 34605-34610.

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21, 241-254.

Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., and Massague, J. (1992). Tgf-Beta Signals through a Heteromeric Protein-Kinase Receptor Complex. *Cell* 71, 1003-1014.

Wright, J.F., Bennett, F., Li, B.L., Brooks, J., Luxenberg, D.P., Whitters, M.J., Tomkinson, K.N., Fitz, L.J., Wolfman, N.M., Collins, M., *et al.* (2008). The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *Journal of immunology* *181*, 2799-2805.

Wright, J.F., Guo, Y., Quazi, A., Luxenberg, D.P., Bennett, F., Ross, J.F., Qiu, Y., Whitters, M.J., Tomkinson, K.N., Dunussi-Joannopoulos, K., *et al.* (2007). Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *The Journal of biological chemistry* *282*, 13447-13455.

Wu, Y.F., Cao, M.F., Gao, Y.P., Chen, F., Wang, T., Zumbika, E.P., and Qian, K.X. (2004). Down-modulation of heat shock protein 70 and up-modulation of Caspase-3 during schisandrin B-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *World journal of gastroenterology* *10*, 2944-2948.

Xia, Z.W., Xu, L.Q., Zhong, W.W., Wei, J.J., Li, N.L., Shao, J., Li, Y.Z., Yu, S.C., and Zhang, Z.L. (2007). Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor-1. *The American journal of pathology* *171*, 1904-1914.

Xia, Z.W., Zhong, W.W., Xu, L.Q., Sun, J.L., Shen, Q.X., Wang, J.G., Shao, J., Li, Y.Z., and Yu, S.C. (2006). Heme oxygenase-1-mediated CD4(+)CD25(high) regulatory T cells suppress allergic airway inflammation. *Journal of immunology* *177*, 5936-5945.

Xiang, Z.M., Nesterov, E.E., Skoch, J., Lin, T., Hyman, B.T., Swager, T.M., Bacskai, B.J., and Reeves, S.A. (2005). Detection of myelination using a novel histological probe. *J Histochem Cytochem* *53*, 1511-1516.

Xie, J., Qian, J., Wang, S., Freeman, M.E., 3rd, Epstein, J., and Yi, Q. (2003). Novel and detrimental effects of lipopolysaccharide on in vitro generation of immature dendritic cells: involvement of mitogen-activated protein kinase p38. *Journal of immunology* *171*, 4792-4800.

Y. Çelik, Ö.Birgili, and Kiyat., A. (2011). Prevalence of Multiple Sclerosis in the Metropolitan Area of Edirne City, Turkey. *Balkan Med J* 2011; 28: 193-196 • DOI: 10.5174/tutfd.2010.04089.0 28: 193-196

Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008a). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* *454*, 350-352.

Yang, X.O., Chang, S.H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.H., Schluns, K.S., Broaddus, R.R., Zhu, Z., and Dong, C. (2008b). Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *The Journal of experimental medicine* *205*, 1063-1075.

Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., *et al.* (2008c). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* *29*, 44-56.

Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry* *282*, 9358-9363.

- Yang, X.X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008d). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29-39.
- Yasukawa, K., Ikeya, Y., Mitsuhashi, H., Iwasaki, M., Aburada, M., Nakagawa, S., Takeuchi, M., and Takido, M. (1992). Gomisin A inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 49, 68-71.
- Yu, J.S.L., and Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 143, 3050-3060.
- Z., T. (2007). Multipl sklerozlu hastanın hemşirelik bakımı. Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi;11(2):, 25-32.
- Zang, Y., Hong, J., Robinson, R., Li, S., Rivera, V.M., and Zhang, J.Z. (2003). Immune regulatory properties and interactions of copolymer-I and beta-interferon 1a in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 137, 144-153.
- Zargari, M., Allameh, A., Sanati, M.H., Tiraihi, T., Lavasani, S., and Emadyan, O. (2007). Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. *Neurosci Lett* 412, 24-28.
- Zenewicz, L.A., and Flavell, R.A. (2011). Recent advances in IL-22 biology. *International immunology* 23, 159-163.
- Zeng, K.W., Zhang, T., Fu, H., Liu, G.X., and Wang, X.M. (2012). Schisandrin B exerts anti-neuroinflammatory activity by inhibiting the Toll-like receptor 4-dependent MyD88/IKK/NF-kappaB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced microglia. *European journal of pharmacology* 692, 29-37.
- Zhang, D., Liu, B., Cao, B., Wei, F., Yu, X., Li, G.F., Chen, H., Wei, L.Q., and Wang, P.L. (2017a). Synergistic protection of Schisandrin B and Glycyrrhizic acid against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting TGF-beta 1/Smad2 pathways and overexpression of NOX4. *International immunopharmacology* 48, 67-75.
- Zhang, D.H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., and Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *The Journal of biological chemistry* 272, 21597-21603.
- Zhang, L., Zhang, Y., Zhong, W., Di, C., Lin, X., and Xia, Z. (2014). Heme oxygenase-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute murine colitis by regulating Th17/Treg cell balance. *The Journal of biological chemistry* 289, 26847-26858.
- Zhang, X.M., Koldzic, D.N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R.F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2004). IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells. *International immunology* 16, 249-256.
- Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, S.F., Yu, Z.L., Wang, X.Y., Zhu, P.L., Chu, Z.S., Pan, S.Y., Xie, M., and Ko, K.M. (2017b). Biochemical mechanism underlying hypertriglyceridemia and hepatic steatosis/hepatomegaly induced by acute schisandrin B treatment in mice. *Lipids in health and disease* 16, 8.

Zhao, Y.G., Wang, Y., Guo, Z., Gu, A.D., Dan, H.C., Baldwin, A.S., Hao, W., and Wan, Y.Y. (2012). Dihydroartemisinin ameliorates inflammatory disease by its reciprocal effects on Th and regulatory T cell function via modulating the mammalian target of rapamycin pathway. *Journal of immunology* 189, 4417-4425.

Zheng, S.G., Wang, J.H., Wang, P., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2007a). IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4(+)/CD25(-) cells to CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T cells and for expansion of these cells. *Journal of immunology* 178, 2018-2027.

Zheng, W.P., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.

Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351-356.

Zheng, Y., Collins, S.L., Lutz, M.A., Allen, A.N., Kole, T.P., Zarek, P.E., and Powell, J.D. (2007b). A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *Journal of immunology* 178, 2163-2170.

Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, I., Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., *et al.* (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological reviews* 238, 247-262.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 28, 445-489.

Zhu, J.F., Cote-Sierra, J., Guo, L.Y., and Paul, W.E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 19, 739-748.

Zhu, N., Cai, C., Zhou, A., Zhao, X., Xiang, Y., and Zeng, C. (2017). Schisandrin B Prevents Hind Limb from Ischemia-Reperfusion-Induced Oxidative Stress and Inflammation via MAPK/NF-kappaB Pathways in Rats. *BioMed research international* 2017, 4237973.

Ziegler, S.F. (2006). FOXP3: of mice and men. *Annual review of immunology* 24, 209-226.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı: Mustafa ÇAKIR

Doğum Yılı: 1985

Tel: +90 5078454901

email: cakirmustafa32@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 38039 Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Lisans : Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi/Biyoloji

2010

Yüksek Lisans : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D 2016

İŞ DENEYİMLERİ

2014- Halen : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D Araştırma

Görevlisi

2013–2014 : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D Araştırma

Görevlisi

A. SCI,SSCI,İHSCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. Schisandrin B and Alantolactone ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, Eken A., **Çakır M.**, Karayığit M. Ö. , Altuntaş H, J Immunol May 1, 2020, 204 - 160.12;
2. IL-22 and Reg3γ Overexpression Affects Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Severity, Eken A. , Yetkin M. F. , Okuş F. Z. , **Çakır M.** , Karayığit M. Ö. , Erdem Ş., et al., Journal Of Immunology, cilt.202, no.1, ss.19312, 2019
3. Fingolimod Alters Tissue Distribution and Cytokine Production of Human and Murine Innate Lymphoid Cells, Eken A. , Yetkin M. F. , Vural A. , Okus F. Z. , Erdem S., Azizoglu Z. B. , **Çakır M.** et al., Frontiers In Immunology, cilt.10, 2019
4. Fingolimod impacts innate lymphoid cell biology, Eken A. , Yetkin M. F. , Okuş F. Z. , Erdem Ş., **Çakır M.**, Altuntaş H. , et al., Journal Of Immunology, cilt.200, ss.4110, 2018
5. The combination of thymoquinone and paclitaxel shows anti-tumor activity through the interplay with apoptosis network in triple-negative breast cancer. Şakalar Ç, İzgi K, İskender B, Sezen S, Aksu H, **Çakır M**, Kurt B, Turan A, Canatan H. Tumour Biol. 2016 Apr;37(4):4467-77. doi: 10.1007/s13277-015-4307-0. Epub 2015 Oct 26
6. Myrtucommulone-A Induces both Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Cancer Cells.,Izgi K, Iskender B, Jauch J, Sezen S, **Cakir M**, Charpentier M, Canatan H, Sakalar C., J Biochem Mol Toxicol. 2015 Jun 2. doi: 10.1002/jbt.21716

B. HAKEMLİ DERGİ/ KONGRE / SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİM KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. The Effect of Schisandrin B on the Development of Multiple Sclerosis, **Çakır M.**, Karayiğit M. Ö. , Eken A. , Altuntaş H.,Proceedings, cilt.40, ss.15, 2019
2. The Effect of Alantolactone on the Development of Multiple Sclerosis, **Çakır M.**, Karayiğit M. Ö. , Eken A. , Altuntaş H.,Proceedings, cilt.40, ss.16, 2019
3. Comparison of peripheral blood th17 cells and associated cytokines in fingolimod-receiving and untreated multiple sclerosis patients Fingolimod alan ve almayan multiple skleroz hastalarının periferik kanında th17 hücrelerinin karşılaştırılması, Eken A. , Yetkin M. F. , Okus F. Z. , Erdem Ş., **Çakır M.**, Haliloğlu Y., et al.,Turkish Journal of Immunology, cilt.7, ss.69-75, 2019
4. S1P1 receptor antagonists Fingolimod and SEW2871 affect human group 1 and 3 innate lymphoid cell biology, A. Eken, M.F. Yetkin, F.Z. Okus, S. Erdem, **M. Cakir**, M.S. Kutuk, A. Vural, I. Kara, H. Donmez Altuntas, M. Mirza, H. Canatan , ECTRIMS Online Library.10/11/18; 228605; P762
5. Fingolimod impacts innate lymphoid cell biology, Eken A. , Yetkin M. F. , Okuş F. Z. , Erdem Ş., **Çakır M.** , Vural A. , et al. The Journal of Immunology, Teksas, Amerika Birleşik Devletleri, 4 - 08 Mayıs 2018, cilt.200
6. Sphingosine 1 Fosfat Reseptörü-1 Agonistleri Fingolimod Ve SEW2871 İnnate Lenfoid Hücrelerin Biyolojisini Etkilemektedir, Eken A. , Yetkin M. F. , Okus F. Z. , Erdem S., **Çakır M.**, Vural A. , et al. Kıbrıs, 10.Klinik Nöroimmünoloji Sempozyumu, 2018 Nisan 1-4,, 1 - 04 Nisan 2018
7. Fingolimod ve SEW2871 insan Th17 hücresi gelişimini etkilemektedir, Yetkin M. F. , Eken A. , Okuş F., **Çakır M.** , Özdarendeli A. , Altuntaş H. , et al. 10.Klinik Nöroimmünoloji Sempozyumu, Girne, Kıbrıs (Kkct), 1 - 05 Nisan 2018, ss.34
8. Sphingosine 1 phosphate 1 receptor agonists Fingolimod and SEW2871 impact innate lymphoid cell biology. Eken A. , Yetkin M. F. , Okuş F. Z. , Erdem S., **Çakır M.** , Küçük M. S. , et al. The World Immune Regulation Meeting XII (WIRM XII) kongresi, Davos, İsviçre, 14 - 17 Mart 2018, ss.46
9. Direct and indirect effects of S1P1 Agonist SEW2871 on human Th17 cell generation and functions, Eken A. , Okuş F., Yetkin M. F. , **Çakır M.** , Özdarendeli A. , Altuntaş H. , et al. Erciyes Tıp Genetik Günleri, Kayseri, Türkiye, 11 - 15 Mayıs 2017
10. S1P1 Agonist SEW2871 Inhibits human Th17 cell generation and functions, Eken A. , Okus F. Z. , Yetkin M. F. , **Çakır M.** , Özdarendeli A. , Mirza M. IMMUNOLOGY 2017,

Washington Dc, Amerika Birleşik Devletleri, 12 - 16 Mayıs 2017, cilt.198, S1P1 Agonist SEW2871 Inhibits human Th17 cell generation and functions

11. S1P1 Agonisti SEW2871'in insan Th17 hücresi gelişim ve fonksiyonlarını doğrudan ve dolaylı etkilemektedir, Eken A. , Okuş F., Yetkin M. F. , **Çakir M.** , Özdarendeli A. , Altuntaş H. , et al. XXIV. Ulusal İmmunoloji Kongresi, İstanbul, Türkiye, 27 - 30 Nisan 2017

12. Thymoquinone Confers Higher Cytotoxicity against Triple Negative Breast Cancer Compared to Estrogen Receptor Positive Breast Cancer through Modulation of TNF Receptor Superfamily Genes and P65 Activity., **Çakir M.**, Sakalar Ç., Sezen S., Aksu H., Kurt B., Canatan H, 24TH Biennial Congress of The European Association For Cancer Research, EACR-24 Manchester,UK

13. Myrtucommulone-A Induces Both Extrinsic And Intrinsic Apoptotic Pathways In Cancer Cells. İzgi K., İskender İzgi B., Jauch J., Sezen S., **Çakir M.** , Charpentier M., Canatan H., and Sakalar C., EACR-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 18-19 Mayıs 2015, no.OP-04, pp.45-45

14. Turan A. , Sakalar Ç., Kaya S., Aksu H., **Çakir M.** , Kurt B., Sezen S., Canatan H., "Production Of A Monoclonal Antibody Specific For Amhr2 For The Use In Ovarian Cancer Immunotherapy ", EACR-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 18-19 Mayıs 2015, no.PP-018, pp.75-75

15. Turan A. , Sakalar Ç., Kaya S., Aksu H., **Çakir M.** , Kurt B., Sezen S., Canatan H., "Over Kanserinde Üretilen AMHR2'nin Ekstrasellüler Bir Peptidini Hedef Alan Bir Monoklonal Kanser immünterapide Kullanılmak Üzere Üretilmesi", Aşı Bilimi Kongresi, İzmir, Türkiye, 28-30 Nisan 2015, SB-15, pp-30.

16. Sezen S., Sakalar Ç., Aksu H., Kurt B., **Çakir M.**, Canatan H. "Timokinon'un İn Vitro İnsülin Direnç Modelinde İnsülin Sinyal Yolağına Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması" 01-03 Haziran 2016 Türk Moleküler Tıp Derneği Ulusal Moleküler Tıp Sempozyumu'nda

17. Kılıç G., Sakalar Ç., Kurt B., **Çakir M.**, Kılıç E., Özgöçmen S. "Aksiyal spondiloartitli hastaların COX-1 ve COX-2 gen polimorfizmleri ve non streoid antiinflamatuvar ilaçlar arasındaki ilişkinin araştırılması." 7. TRASD Uluslar Arası Katılımlı Türk Romatoloji Kongresi 23-27 Mart 2016

18. Kılıç E., Sakalar Ç., Aksu H., **Çakir M.**, Kılıç G., Özgöçmen S. . "Aksiyal spondiloartitli hastaların periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde sitokin üretimi "
7. TRASD Uluslar Arası Katılımlı Türk Romatoloji Kongresi 23-27 Mart 2016
19. Sakalar Ç., Aksu H., Turan A. , Kaya S., **Çakir M.** , Kurt B., Sezen S., Canatan H.," A Novel Peptide-Specific Monoclonal Antibody with a Potential Use for Immunotherapy Recognizes AMHR2 expressed by Ovarian Cancer Cells" 24TH Biennial Congress of The European Association For Cancer Research, EACR-24 Manchester,UK
20. İskender İzgi B., Sakalar Ç., İzgi K., Turan A. , Sezen S., Aksu H., **Çakir M.**, Kurt B., Canatan H., "The Combination Of Thymoquinone And Paclitaxel Shows Anti-Tumor Activity Both In Vitro And In Vivo Through The Modulation Of Genes Involved In Apoptosis, Cell Cycle, Tumor Suppression And Growth Factor-Cytokine Activity", EACR-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 18-19 Mayıs 2015, no.OP-02, pp.43-43

ÖDÜLLER

- 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı 2019.2 Dönem Bursu, Deneysel Multipl Skleroz Fare Modelinde Schisandrin B ve Alantolakton'un İmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması, 12 aylık burs Amerika Bursu.
- 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı, 2017. 2 Dönem Bursu, Deneysel Multipl Skleroz Fare Modelinde Schisandrin B ve Alantolakton'un İmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması, 3 yıllık Proje Bursu.
- " Bazı Meme Kanseri ve Lösemi Hücre Hatlarında Timokinon ve Bazı Kemoterapötik Ajan Kombinasyonlarının TNF Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" adlı tez projem TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu Programı tarafından desteklenmiştir.
- Turan A. , Sakalar Ç., Kaya S., Aksu H., **Çakir M.** , Kurt B., Sezen S., Canatan H.,"Production Of A Monoclonal Antibody Specific For Amhr2 For The Use In Ovarian Cancer Immunotherapy ", EACR-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 18-19 Mayıs 2015, "Poster Bildiri İkincilik Ödülü"(2. MOKAD Best Poster Award)
- Kılıç G., Sakalar Ç., Kurt B., **Çakir M.**, Kılıç E., Özgöçmen S. "Aksiyal spondiloartitli hastaların COX-1 ve COX-2 gen polimorfizmleri ve non streoid

antiinflamatuvar ilaçlar arasındaki ilişkinin araştırılması." 7. TRASD Uluslar Arası Katılımlı Türk Romatoloji Kongresi 23-27 Mart 2016 " En İyi Bildiri ÖDÜLÜ "

6. Kılıç E., Sakalar Ç., Aksu H., **Çakir M.**, Kılıç G., Özgöçmen S. . "Aksiyal spondiloartitli hastaların periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde sitokin üretimi "

7. TRASD Uluslar Arası Katılımlı Türk Romatoloji Kongresi 23-27 Mart 2016 " En İyi İkinci Bildiri ÖDÜLÜ"

7. Turan A., Sakalar Ç., Aksu H., **Çakir M.** , Kurt B., Sezen S., Canatan H.," Over kanserinde üretilen AMHR2'nin peptidini hedef alan bir Monoklonal Antikoru Kanser İmmünterapide Kullanılmak üzere Üretilmesi" Gevher Nesibe Teşvik Ödülleri 16 mart 2015 KAYSERİ "Deneysel ve Laboratuvar Çalışmasında Öğretim Üyesi Katagorisi, 2.lik Ödülü"

8. 01-03 Haziran 2016 tarihleri arasında Türk Moleküler Tıp Derneği tarafından İstanbul'da düzenlenen Ulusal Moleküler Tıp Sempozyumu'nda S.Sezen, Ç. Şakalar, H. Aksu, B. Kurt, **M. Çakir**, H. Canatan, "Timokinon'un İn Vitro İnsülin Direnç Modelinde İnsülin Sinyal Yolağına Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması" başlıklı çalışmaları ile "Poster Bildiri Birincilik Ödülü"ne layık görülmüşlerdir.

9. Sezen S., Sakalar Ç., Aksu H., Kurt B., **Çakir M.**, Canatan H. "Timokinon'un İn Vitro İnsülin Direnç Modelinde İnsülin Sinyal Yolağına Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması" başlıklı çalışmaları ile "Poster Bildiri Birincilik Ödülü"ne layık görülmüştür. 01-03 Haziran 2016 Türk Moleküler Tıp Derneği Ulusal Moleküler Tıp Sempozyumu'nda

YER ALDIĞI PROJELER

1. Alantolakton ve Schisandrin B'nin İmmünomodülatör Etkinliğinin Mürin Multiple Skleroz Modellerinde ve İnsan İmmün Hücrelerinde İncelenmesi, TUSEB-2020-Yi-02 - Yenilikçi İlaç Geliştirme Stratejik Ar-Ge Proje Çağrısı, Araştırmacı

2. Graft Versus Host Hastalığı Fare Modelinde Schisandrin B'nin Immunomodulator Etkinliğinin Araştırılması, TÜBİTAK 220S237, Araştırmacı, Değerlendirmede

3. Graft Versus Host Hastalığı Fare Modelinde Alantolaktonun Immunomodulator Etkinliğinin Araştırılması, Erciyes BAP, Araştırmacı, Değerlendirmede

- 4.SARSCov2 Kovid19 Tanı ve Terapisinde Kullanılmak Üzere Spike S Antijenini Hedef Alan Monoklonal Antikorlar Geliştirilmesi, KAP-2020- 10450, Araştırmacı, Değerlendirmede
- 5.Deneysel Multipl SklerozMS Fare Modelinde Schisandrin B ve Alantolaktonun İmmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması, TDK-2018-7885, Araştırmacı
6. Kanser Hücrelerinde Timokinona karşı Moleküler Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi ve Fare Meme Kanser Modelinde Timokinon ile Preklinik Kemoterapi Modeli Geliştirilmesi. TOA-2016-6685, Araştırmacı
7. Timokinon (Thymoquinone) ve Trastuzumab Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücre Hattına Karşı Terapotik Etkinliğinin Ve Moleküler Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi TYL-2015-6311, Araştırmacı
8. Deneysel Multipl Skleroz Fare Modelinde Mirtukomulon-A'nın İmmünomodülatör ve Tedavi Edici Etkinliğinin Test Edilmesi TYL-2015-6252 , Araştırmacı
9. AMHR2 Reseptörünün EAPPNRRTCFFEAPGVRGS ve NLTQDRAQVEMQGCRDSDEP Peptitlerini Hedef Alan Monoklonal Antikorların Üretilmesi TYL-2015-5782, Araştırmacı,
10. AMHR2 Reseptörünün CNANYSHLPPPGSPGTPGSQ ve MQGCRDSDEPGCESLHCDPS Peptitlerini Hedef Alan Monoklonal Antikorların Üretilmesi TYL-2015-5861, Araştırmacı
11. G Maddesi ve Thymoquinone'nun Diyabet Fare Modelinde Pankreas Beta Hücrelerinin Yenilenmesi Üzerine Etkilerinin Histolojik Olarak ve Gen Ekspresyon Düzeyinde İncelenmesi TOA-2014-4877, Araştırmacı
12. "Meme kanser hücre hatlarında Thymoquinone (TQ) ve transkripsiyon faktörü Fork Head BoxM1 (FOXM1) siRNA'nin sinerjistik etkisinin Src-FAK yolağı üzerine araştırılması", TÜBİTAK Projesi, 214S660, Bursiyer.
13. "Kısrak Endometriumunda Gebeliğe Bağlı Olarak microRNA Ekspresyon Profilinin Araştırılması.", TÜBİTAK-TOVAG-1110733, 2012, Bursiyer.