

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP PROGRAMI
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI MYELİN ANTİJENLERİ İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL MS
MODELLERİNDE GLATİRAMER ASETAT'IN KEMOKİN PROFİLİ
ÜZERİNE ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Dr. Serpil BULUT
ELAĞIĞ-2008

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince, eğitimim konusunda her türlü katkı, destek ve yardımını özveri düzeyinde sağlayan, danışmanım ve değerli dostum Doç. Dr. H. Handan AKBULUT'a,

Üniversitemize İmmünoloji Anabilim Dalı'nı kazandıran ve doktora programına başlamam konusunda beni cesaretlendiren değerli hocam Doç. Dr. Vedat BULUT'a,

Deneysel çalışma konusundaki bilgi ve becerisi ile çalışmanın alt yapısını oluşturma konusunda hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan Prof. Dr. Ahmet AYAR'a,

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde katkı sağlayan Doç. Dr. Mehmet ÖZDEN'e,

İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN, öğretim üyesi Doç. Dr. Fulya İLHAN ve teknisyen Süleyman Akpınar'a,

Tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. S. Sırrı Kılıç'a,

Çalışmalarım süresince yoğun klinik yükümü paylaşma ve uygun çalışma ortamı hazırlama konusunda hiçbir fedakârlığı esirgemeyen Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Bülent Müngen ve Doç. Dr. M. Said BERİLGİN'e,

Çalışmanın laboratuvar aşamasında katkı sağlayan Nöroloji AD Arş. Gör. Dr. Hakverdi KILIÇ'a,

Ve akademik hayatımı, desteğine borçlu olduğum sevgili eşim Op. Dr. Selçuk BULUT'a,

Sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTES	V
KISALTMALAR	VI
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. MULTİPLE SKLEROZ (MS)	5
3.1.1. MS İmmünopatolojisi	7
3.1.2. Tedavi	10
3.2. GLATIRAMER ASETAT (GA)	11
3.2.1 GA'nın DOE'deki Etki Mekanizması	12
3.2.2 GA'nın MS'deki Etki Mekanizması	14
3.3. KEMOKİNLER	16
3.3.1. Kemokin Aileleri	18
3.3.1.1. CXC Kemokin Ailesi (α kemokinler)...	19
3.3.1.2. CC Kemokin Ailesi (β kemokinler)....	21
3.3.1.3. C Kemokin Ailesi (γ kemokinler).....	22
3.3.1.4- CX ₃ C Kemokin Ailesi (δ kemokinler)..	22
3.3.2. Kemokin Reseptörleri	24
3.3.3. Kemokinlerin Rol Aldığı Olaylar	26
3.3.4. SSS'de Kemokinler ve Reseptörleri	28
3.3.5. SSS'de Kemokin ve Reseptörlerinin	
Fonksiyonları	31
3.3.5.1. Nöroenflamasyon	31
3.3.5.2. Nöroprotektif Etkileri	31
3.3.5.3. Nöral Gelişime Etkileri	33
3.3.5.4. Nörotransmisyonu Etkileri	33
3.4. MULTİPLE SKLEROZ'DA KEMOKİNLER	33

3.5. GA VE KEMOKİNLER	34
4. GEREÇ ve YÖNTEM	36
4.1. İstatistiksel Değerlendirme	38
5. BULGULAR	39
6. TARTIŞMA	48
7. KAYNAKLAR	61
8. ÖZGEÇMİŞ	89

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. GA'nın DOE'deki immünolojik etkileri.....	13
Tablo 2. Kemokin aileleri ve başlıca üyeleri.....	19
Tablo 3. İnsanda SSS hastalıkları ile ilişkili kemokin ve kemokin reseptörleri.....	32
Tablo 4. Multiple Skleroz'da SSS' de rol alan kemokin ve kemokin reseptörleri.....	34
Tablo 5. Hayvanların immünizasyon şeması.....	37
Tablo 6. Grupların DOE gelişme zamanı, klinik skor ve mortalite oranları.....	39
Tablo 7. Kontrol ve çalışma gruplarının ortalama RANTES, MIP-2 ve IP-10 değerleri.....	43
Tablo 8. MOG ile oluşturulan DOE'de GA'nın, RANTES, MIP-2 ve IP-10 ekspresyonu üzerine etkisi.....	44
Tablo 9. MBP ile oluşturulan DOE'de GA'nın RANTES, MIP-2 ve IP-10 ekspresyonu üzerine etkisi.....	45
Tablo 10. PLP ile oluşturulan DOE'de GA'nın, RANTES, MIP-2 ve IP-10 ekspresyonu üzerine etkisi.....	45

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İmmün regülasyonda Th1/Th2 polarizasyonu.....	8
Şekil 2. MS immünopatogenez modeli.....	8
Şekil 3. GA'nın amino asit dizilişi ve Copolimer'in potansiyel amino asit sekansları.....	12
Şekil 4. GA ile tedavi edilen hastalarda Th2 hücre indüksiyonunun mekanizması.....	15
Şekil 5. GA'nın MS'deki etki mekanizmaları.....	15
Şekil 6. İmmün yanıtta kemokinlerin rolü.....	27
Şekil 7. T hücrelerde CCL5-CCR5 sinyalinin şematik görüntüsü.....	29
Şekil 8. Çalışma gruplarının hastalık oluşma günlerine göre dağılımı.....	41
Şekil 9. Çalışma gruplarının klinik skorlarına göre dağılımı.....	42
Şekil 10. Kontrol ve çalışma gruplarının RANTES değerlerine göre dağılımı.....	46
Şekil 11. Kontrol ve çalışma gruplarının MIP-2 değerlerine göre dağılımı.....	47
Şekil 12. Kontrol ve çalışma gruplarının IP-10 değerlerine göre dağılımı.....	47

KISALTMALAR LİSTESİ

MS	: Multiple skleroz
DOE	: Deneysel otoimmün ensefalomyelit
MBP	: Myelin basic protein
MOG	: Myelin oligodendrocyte glycoprotein
PLP	: Myelin proteolipid protein
GA	: Glatiramer asetat
RANTES	: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
MIP	: Macrophage inflammatory protein
IP-10	: Inducible protein-10
RR-MS	: Relapsing-Remitting MS
MRG	: Magnetik-rezonans görüntüleme
SP-MS	: Sekonder Progresif MS
PP-MS	: Primer Progresif MS
EDSS	: Expanded disability status scale
KBB	: Kan-beyin bariyeri
SSS	: Santral sinir sistemi
HLA	: Human leucocyte antigen
Th	: Antijen-spesifik tip yardımcı T hücre
MHC	: Major histocompatibility complex
IFN	: İnterferon
CD	: Cluster of differentiation
IL	: İnterlökin
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TGF	: Transforming growth faktör
Treg	: Düzenleyici T hücre
FDA	: United States Food and Drug Administration
ASH	: Antijen sunan hücre
NK	: Doğal öldürücü hücre (
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor

CSF	: Koloni stimüle edici faktör
NH₂	: Amino
C	: Sistein
ELR	:Glutamat, lösin, arginin
GRO	: Growth-regulated protein
MGSA	: Melanoma growth stimulatory activity factor
NAP	: Neutrophil-activating protein
ENA	: Epithelial-derived neutrophil attractant
GCP	: Granulocyte chemotactic protein
PLP	: Platelet basic protein
CTAP	: Connective tissue activating protein
β-TG	: Beta-thromboglobulin
NAP	: Neutrophil- activating peptide
MIG	: Monokine induced by IFN-γ
TIL	: Tümör infiltre eden lenfositler
SDF	: Stromal cell derived factor
DC	: Dendritik hücre
TARC	: Thymus and activation-regulated chemokine
LARC	: Liver and activation-regulated chemokine
ELC	: Epstein–Barr-virus-induced receptor ligand chemokine
SLC	: Secondary lymphoid tissue chemokine
PARC	: Pulmonary and activation-regulated chemokine
PF4	: Platelet factor-4
LPS	: Lipopolisakkarid
C5a	: Kompleman 5a
LTB4	: Lökotrien 4
GTP	: Guanosine trifosfat
DARC	: Duffy antigen receptor for chemokines
MAPKs	: Mitogen-activated protein kinases
PI3-K	: Phosphoinositide 3 kinase
NMDA	: N-Metil D-Aspartat
PTX	: Pertussis toksin

IFA	: Incomplete Freund's adjuvant
CFA	: Complete Freund's adjuvant
min	: minimum
max	: maksimum

1. ÖZET

Multiple Skleroz (MS), santral sinir sisteminin, otoimmün enflamatuar demiyelinizan bir hastalığıdır. Deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE), MS'in deneysel modeli olup, myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) ve myelin proteolipid protein (PLP) gibi farklı myelin antijenleri tarafından oluşturulabilir.

Glatiramer asetat (GA) (Copaxone®), relapsing-remitting MS tedavisinde hastalık-düzenleyici ilaç olarak yaygın kullanılan bir ajandır. GA'nın MS ve DOE'deki etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu çalışmanın amacı MOG₃₅₋₅₅, MBP₆₈₋₈₂ ve PLP₁₃₉₋₁₅₁ ile oluşturulan DOE modellerinde, GA'nın kemokin ekspresyonu üzerine etkilerini araştırmaktır. Çalışmaya alınan dişi fareler altı gruba ayrılmış ve MOG, MBP ve PLP peptitleri ile immünize edilmiştir. Kontrol grubunu normal ve non-immünize hayvanlar oluşturmuştur. GA-tedavi gruplarına (farklı antijenik peptit ile immünize üç grup) immünizasyondan 7 gün önce subkutan GA verilmiş, tüm hayvanlar post-immünizasyon 14. günde dekapite edilmiştir. RANTES/CCL5, MIP2/CXCL2-3 ve IP-10/CXCL10'un serum düzeyleri, çalışma ve kontrol gruplarında uygun ELISA kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

GA verilen grup ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, GA verilmeyen tüm gruplarda kemokin ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmiştir. GA uygulanan grupların kemokin düzeyi kontrol grubu düzeyine yakın ölçülmüştür. Bu çalışmada, GA'nın in vitro ortamlarda Th1 hücre-ilişkili kemokin ekspresyonunu inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Deneysel otoimmün ensefalomyelitis, Glatiramer acetate, kemokinler, myelin antijenleri.

2. ABSTRACT

EFFECTS OF GLATIRAMER ACETATE ON CHEMOKINE EXPRESSION IN MS MODELS IMMUNIZED WITH DIFFERENT MYELIN ANTIGENS

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system with autoimmune aetiology. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a model of MS that can be induced in several species by different myelin-related auto-antigens, such as myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), and myelin proteolipid protein (PLP).

Glatiramer acetate (GA) (Copaxone®) is a disease-modifying drug approved for the treatment of relapsing-remitting MS. The mechanism of action of GA in MS and EAE is not fully elucidated.

The objective of this study is to determine whether GA will also act on chemokine expression in EAE which induced by MOG₃₅₋₅₅, MBP₆₈₋₈₂, and PLP₁₃₉₋₁₅₁. Female mice were divided into six groups and immunized with MOG, MBP, and PLP peptides. Normal and unimmunized animals were used as control. In GA-treatment groups (three groups immunized with different antigenic peptide), GA was injected on day 7th before immunization with MBP, PLP and MOG. Animals were killed by cervical dislocation at day 14. RANTES/CCL5, MIP2/CXCL2-3 and IP-10/CXCL10 chemokines were measured using the appropriate ELISA kits in treated and non-treated groups.

We observed significantly increased expression of chemokines in all non-treatment groups immunized with different antigen according to normal controls.

In GA-treated groups, chemokine expression is almost to the baseline level observed in control animals.

Our data suggest that in vivo therapy with glatiramer acetate causes a statistically significant reduction in the expression of chemokines associated with Th1 cell homing.

Key Words: Experimental autoimmune encephalomyelitis, Glatiramer acetate, chemokines, myelin antigens.

3. GİRİŞ

3.1 MULTİPLE SKLEROZ (MS)

Multiple Skleroz (MS), genç erişkinlerde en sık nörolojik fonksiyon kaybı oluşturan bir hastalıktır. Klinik olarak, akut/subakut gelişen nörolojik defisitlerle karakterize olup, günler veya haftalar içerisinde tam veya kısmi düzelmeler ile seyreder. MS'in bu formu "Relapsing-Remitting MS (RR-MS)" olarak adlandırılır. Hastalığın bu döneminde magnetik-rezonans görüntüleme (MRG)'de beyinde kontrast tutan lezyonlar (plaklar) görülmeye başlar. Yaklaşık 10–15 yıl içerisinde hastalık seyri progresif hale dönüşür ve fonksiyonel kayıplar sürekli artış gösterir. "Sekonder Progresif MS (SP-MS)" olarak adlandırılan bu dönem, MRG'de kontrast tutan lezyonlarda azalma ile birlikte, akson kaybının ve kalıcı nörolojik defisitın göstergesi olarak "kara delikler (black holes)" ve yaygın beyin atrofisi ile karakterizedir. Olguların yaklaşık %5-10'unda MS son derece selim seyreder, yıllar sonra bile kalıcı nörolojik defisit gelişmez. "Benign MS" olarak adlandırılan ve tedaviye gerek duyulmayan bu formun yanında, %10–15 civarında hastada başlangıçtan itibaren hızlı, progresif bir seyrin görüldüğü ve immünmodülatuar tedaviye cevap vermeyen "Primer Progresif MS (PP-MS)" görülmektedir (1).

MS'de hastalık şiddeti, yıllık atak sayısı ve Krutzke ya da EDSS (expanded disability status scale) olarak bilinen nonlinear skalaya göre belirlenir. EDSS skalasındaki değerlendirme puanları 0 ile 10 arasında değişir. 0'da fonksiyonel kayıp yoktur, 10 ise hastanın MS'den öldüğü anlamına gelir. EDSS

skoru 5'in altında olan hasta ambulator olup, 6'nın üzerinde olan EDSS skoru, hastanın yürüyebilmek için destek cihazlara ihtiyacı olduğunu göstermektedir (2).

MS tanısında kullanılan en değerli tanı aracı MRG'dir. MS plaklarının kontrast tutması kan-beyin bariyeri (KBB)'nin bozulduğunu gösterir. Ancak kontrastlanmanın enflamasyonla ilişkisi konusu tartışmalıdır. Hastalık yükü MRG'de T2-ağırlıklı sekanslardaki lezyon alanları ve irreversibl hasarın göstergesi olan kara deliklere göre belirlenir (3).

MS'in etyolojisi bilinmemektedir. Genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve bozulmuş immün yanıt hastalığın oluşumuna katkıda bulunan temel faktörlerdir. İlave olarak, "human leucocyte antigen class II" (HLA-II) ve T hücre reseptörünü kodlayan genler ile muhtemel viral enfeksiyonların da patogeneze katkısı olduğu düşünülmekle birlikte spesifik bir virüs henüz tanımlanamamıştır. İmmün patogeneze ile ilişkili olarak da pro-enflamatuvar sitokin hakimiyeti ve bozulmuş immün regülatuar mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır (4).

MS gelişimi ile ilgili bilgiler, laboratuvar hayvanlarında yapılan deneysel hastalık modellerine dayanmaktadır. İn vivo olarak oluşturulan MS modeli Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) olarak adlandırılır. DOE, hem akut hem de relapsla seyreden hücre aracılı immün yanıt modeli olarak kullanılmaktadır (5). Myelin Basic Protein (MBP), Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ve Proteolipid Protein (PLP) gibi farklı myelin antijenleri ile duyarlı rat veya farelerde oluşturulan bu model, MS benzeri enflamatuvar demiyelinizan bir tabloya yol açar (6). DOE'nin başlamasından ve devamından sorumlu immünolojik mekanizmalar, T lenfositlerin myelin antijenine karşı duyarlılaşması ile başlar (5). Antijen-spesifik tip 1 yardımcı T (T helper 1, Th1)

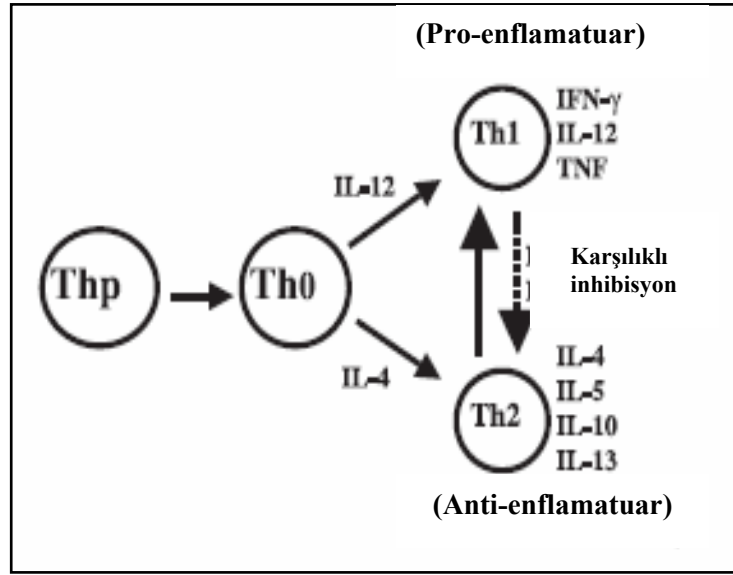
hücreler proliferasyon olarak santral sinir sistemine (SSS) girer. SSS’de T hücrelerin perivasküler infiltrasyonu histopatolojik olarak gösterilebilir. Bu immün yanıtın sonucunda SSS’de demiyelinasyon ve bunun klinik göstergesi olarak da motor paralizi ve sensoryal bozukluklar oluşur. DOE, hasta hayvandan sağlıklı hayvana antijen-spesifik T hücrelerin pasif transferi yoluyla aktarılabilir (5,6).

Patolojik olarak beyin ve spinal kordda perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ve çevresinde demiyelinasyon ve aksonal kayıp alanları vardır. Lezyon içerisinde aktive olmuş mikrogliya ve astrositler ile birlikte doku uygunluk kompleksi sınıf II molekülleri (Major histocompatibility complex class II, MHC sınıf II), adezyon molekülleri ve kemokin ekspresyonu gibi immünolojik aktif moleküller gözlenir. Myelin hasarının interferon-gama (IFN- γ) üreten CD4⁺ T hücreler aracılığı ile olduğuna inanılmaktadır (7,8).

3.1.1. MS İmmünopatolojisi

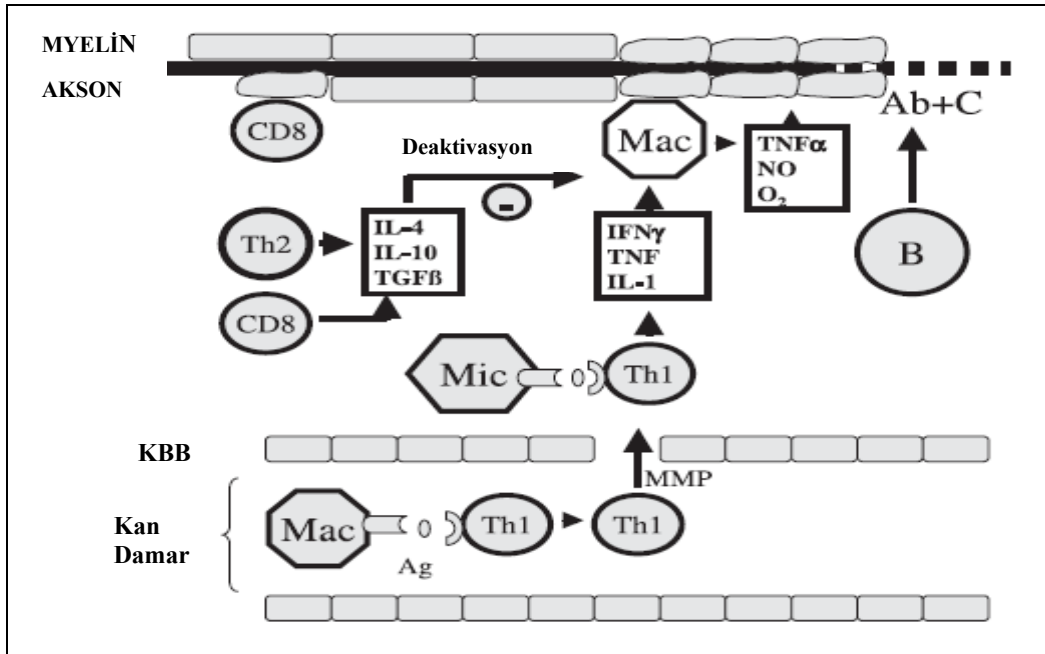
MS immünopatolojisi ile ilgili gelişmeler, son yıllarda T hücre regülasyonu ve polarizasyonu konusunda ulaşılan veriler ışığında netlik kazanmaya başlamıştır. CD4⁺ Th hücreler genel olarak salgıladıkları sitokin profiline göre Th1 (tip 1 yardımcı T, T helper 1) ve Th2 (tip 2 yardımcı T, T helper 2) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Şekil1). Th1 pro-enflamatuar, Th2 anti-enflamatuar özellikler taşır.

Th1 hücreler interlekin-2 (IL-2), IFN- γ ve tümör nekrozis faktör (TNF), Th2 hücreler ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve transforming growth faktör beta (TGF- β) salgılar (10).



Şekil 1. İmmün regülasyonda Th1/Th2 polarizasyonu (9). (Thp, T yardımcı hücre prekürsörü; Th0, naif T yardımcı hücre)

MS patogenezi konusunda yaygın olarak kabul edilen modele göre, CD4⁺ Th1 hücreler patojenik sürecin başlatılması ve sürdürülmesinde rol oynamaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. MS immünoptogenez modeli (4,14). Ab, antikor; Ag, antijen; KBB, kan-beyin bariyeri; C, kompleman; Mac, makrofaj; Mic, mikrogliya; MMP, matriks metalloproteinaz; NO, nitrik oksit; O₂, oksijen radikali.

Otoreaktif CD4⁺ T hücrelerin, makrofaj veya dendritik hücre yüzeyindeki MHC sınıf II molekülü ile sunulan otoantijen veya mikrobiyal antijen gibi bilinmeyen bir antijen ile aktive edildikleri kabul edilmektedir. Aktive CD4⁺ Th1 hücreler IL-2, IFN- γ ve TNF sekrete ederek endotel hücrelerin yüzeyindeki adezyon moleküllerini aktive eder ve T hücrelerin KBB'ni geçmesini sağlar. Aktive T hücreler bir jelatinaz olan matriks metalloproteinaz sekrete ederek KBB'nin matriks yapıdaki membranını bozar ve otoreaktif T hücrelerin SSS'ne geçmesine yardım eder (11). MS plağının geliştiği bu dönem MRG'de kontrast tutulumu ile korelasyon gösterir. SSS'ye giren otoreaktif hücreler burada mikroglialar tarafından sunulan myelin, viral veya moleküler benzerliğe bağlı çapraz-reaktif antijenlerle tekrar aktif hale gelerek, çoğalmaya başlar. Çoğalan hücreler TNF- α ve IFN- γ gibi proenflamatuar sitokinleri salarak makrofajları aktive eder. Bu fazda doku ödemi ortaya çıkar ve MRG'de T2-ağırlıklı kesitlerde lezyonun görülmesi ile karakterizedir. Aktive makrofajlar bir taraftan myelin hasarı oluştururken, aynı zamanda myelin için toksik olan TNF- α , nitrik oksit (NO) ve serbest radikaller gibi moleküller salgılar. Myelin hasarı oluşturan diğer mekanizmalar, kompleman aracılı ve antikor aracılı oligodendrosit hasarıdır. Otoreaktif CD8⁺ T hücrelerin de oligodendrositleri öldürdüğü yönünde bilgiler vardır (12). Yaygın enflamasyon akson hasarına ve irreversibl nörolojik fonksiyon kaybına yol açar. Hastalığın bu dönemi MRG'de "kara delikler"ın görülmesi ile karakterizedir (13). Hastalar sıklıkla atak sonrası düzelme gösterirler. Lezyondaki gerilemenin, düzenleyici T hücre (Treg) olarak adlandırılan ve IL-4, IL-10 ve TGF- β gibi anti-enflamatuar sitokin salgılayarak makrofaj aktivitesini önleyen regülatuar T hücreler aracılığı ile olduğu kabul edilmektedir (9).

Kemokinler, enflamasyon sırasında lökositlerin dokuya göçünden sorumlu mediatörlerdir. Bazı özel kemokin ve reseptörlerinin MS'in relaps döneminde rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted, (RANTES, CCL5) ve reseptörü olan CCR5 çifti bu konuda en iyi bilinen kemokin ve reseptör gurubudur. Lezyon gelişiminin diğer bulguları belirti vermeden önce, beyinde normal görünümlü ak maddede, kan damarlarındaki endotel hücrelerinde CCL5 sunumunun yoğunlaştığı görülmüştür (15). Bu nedenle, lezyon gelişiminden sorumlu ilk olayın, CCL5 aracılığı ile mononükleer hücrelerin dolaşımdan KBB'ye geçişinin başlatılması olduğu iddia edilmiştir. İnflamatuvar lezyondaki perivasküler lenfositlerin yüzeyindeki artmış CCR5 sunumu ile birlikte makrofajlar ve aktive mikrogliaların bulunması da bu görüşü desteklemektedir (16–18). MS'deki aksonal hasarın boyutu da infiltre olmuş lökosit miktarları ile paralel artış göstermektedir (19, 20). CCL5/CCR5 ilişkisinin yoğunluğunun, sadece lezyon oluşumunu tetiklemekle kalmadığı, aynı zamanda remiyelinasyonu baskılamak yoluyla MS seyrini olumsuz etkilediği de bildirilmiştir (21)

3.1.2. Tedavi

MS tedavisi ile ilgili gelişmeler 20. yy sonlarına dayanmaktadır. IFN'lar ve (GA), immün modülatuar ajanlar olarak 'United States Food and Drug Administration' (FDA) tarafından onaylanarak, relaps ile seyreden MS hastalarının kullanımına sunulmuştur. IFN β -1a, IFN β -1b ve GA'nın MS'de relaps oranlarını, özürlülük gelişme hızını ve hastalık progresyonunu yavaşlattığı, çift-kör, plasebo-kontrollü çalışmalarda gösterilmiştir (22–26). Daha sonra

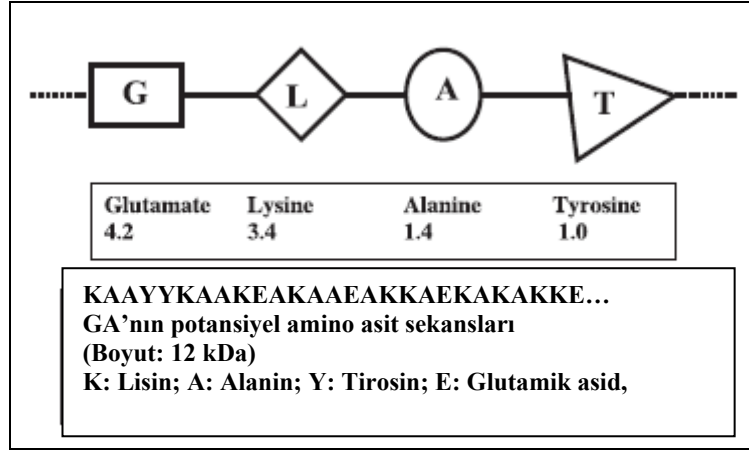
Mitoxantron immünsupresif ajan olarak, immün modülatuar tedaviye cevap vermeyen SP- MS’de kullanılmak üzere FDA onayını almıştır (27).

Son yıllarda MS patogenezi ile ilgili gelişmeler yeni tedavi stratejilerini gündeme getirmiştir. Bunlar arasında; immün sistemde hücre-hücre sinyalinde rol alan proteinlere karşı geliştirilen natalizumab (anti- α 4 integrin), daclizumab (anti-CD25), rituximab (anti-CD20) ve alemtuzumab (anti-CD52) gibi monoklonal antikolar; FTY-720, cladribine, laquinimod, fumarate, interferon tau, oral anti-CD3, vitamin D ve statinler gibi oral immünmodülatörler ve riluzole, memantine, minocycline ve lamotrigine gibi nöroprotektif ajanlar bulunmaktadır (28).

3.2 GLATIRAMER ASETAT (GA)

Glatiramer Asetat, Copolimer-1 veya Cop-1 olarak da bilinen ve jenerik adı Copaxone® olan bir immünmodülatör ajandır. Sentetik bir polipeptit olup 4 amino asit içerir; L-alanin, L-lisin, L-glutamik asit ve L-tirosin. Amino asit sekansları peptitler arasında değişmekle birlikte düzeni ve molar oranları sabittir. Copolimer uzunluğu 40-90 amino asit arasında, moleküler ağırlığı ise 4.7-10 kDa arasında değişiklik gösterir (Şekil 3), (9).

GA molekülü 1960’larda sentez edilmiştir (29). GA’nın sadece akut DOE gelişimini baskılamadığı aynı zamanda kronik relapsing DOE formunda tedavi edici etkisinin olduğu PLP₁₃₉₋₁₅₁ ve PLP₁₇₈₋₁₉₁ peptitleri ile immünize edilmiş fare çalışmalarında gösterilmiştir. Benzer sonuçlar MOG₃₅₋₅₅ ile de gösterilmiştir (30). İn vitro olarak elde edilen bu sonuçlar GA’nın MS tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir.



Şekil 3. GA'nın amino asit dizilişi ve Copolimer'in potansiyel amino asit sekansları (9).

GA'nın oral kullanımında benzer mekanizmalar aracılığı ile MS gelişimini inhibe ettiği de bildirilmiştir (31). Oral formunun MS tedavisinde kullanılması için çalışmalar devam etmektedir.

3.2.1 GA'nın DOE'deki Etki Mekanizması

MS ile ilgili deneysel çalışmalarda, DOE indüksiyonu için geliştirilen ve yapısal olarak MBP'ye benzeyen sentetik bir polimer olan GA'nın hastalık oluşumunu tetiklemediği hatta tersine inhibitör veya koruyucu etkisinin ortaya çıktığı gözlenmiştir (29,30). GA bu etkisini deney hayvanı türleri arasında fark olmaksızın göstermiştir. Daha sonra, GA ile immünize farelerin lenfoid hücrelerinin naif farelere transferi ile polimerin baskılayıcı etkisinin transfer edilebildiği görülmüştür. Tüm çalışmaların sonunda, GA'nın DOE'yi baskılayıcı etkisinin GA-spesifik supresör T hücreler aracılığı ile olduğu kanaatine varılmıştır (32).

GA ve MBP'nin aminoasit yapısındaki benzerlik nedeniyle çapraz-reaktif immün mekanizmalar araştırılmaya başlanmıştır. GA'nın MBP ile çapraz-

reaksiyon gösterdiği, lenfosit proliferasyonu ve gecikmiş hipersensitivite teknikleri kullanılarak hem hücresel hem de hümoral düzeyde gösterilmiştir (33,34). Ancak daha sonra geliştirilen teknikler, her iki molekülün çapraz-reaksiyon dışında birlikte inhibisyon oluşturduğu yönünde yeni bilgilerin ortaya çıkmasını sağlamıştır (35,36). Buna göre GA, antijen sunan hücrenin (ASH), MHC sınıf II molekülüne bağlanarak MBP ile yarişmakta ve MBP-spesifik T hücrelerin sekrete ettiği IL-2'yi inhibe etmektedir (33). GA bu etkisini özellikle MBP₈₂₋₁₀₀ imm nodominan epitopu aracılığı ile gerçekleştirmektedir (37). GA'nın MBP-spesifik T hücrelerin yanında ovalbumin-spesifik T hücreleri de baskıladığının gösterilmesi etki mekanizması açısından farklı faktörlerin söz konusu olabileceğini düşündürmüştür (38). Üstelik GA ile aminoasit sekans benzerliği göstermeyen PLP ve MOG gibi myelin proteinleri ile indüklenen hayvanlarda DOE oluşumunun GA tarafından inhibisyonu, GA'nın etkisinin çapraz-reaksiyon dışında bir mekanizma ile olduğu, muhtemelen de GA-ililişli regülatuar hücrelerin olayda rol oynadığı fikrini kuvvetlendirmiştir (39–41).

Tablo 1. GA'nın DOE'deki immünolojik etkileri

- | |
|--|
| 1. Akut ve kronik relapsing hastalığı baskılar |
| 2. Farklı türlerdeki hayvan modellerinde hastalığı baskılar |
| 3. MBP, PLP ve MOG gibi imm nojenlerden bağımsız olarak DOE'yi baskılar |
| 4. HLA sınıf II molekülüne bağlanır |
| 5. MBP'ye sellüler ve hümoral olarak çapraz-reaksiyon gösterir |
| 6. Myelin-reaktif T hücre proliferasyonu ve sitokin salınımını inhibe eder |
| 7. Anti-enflamatuar Th2 regülatuar hücreleri uyarır |

Sonuç olarak GA, DOE'deki immün-modülatör etkisini, oluşan GA-reaktif Th2 hücrelerin SSS'ne girip myelin antijenleri ile çapraz-reaksiyon göstermesi ve

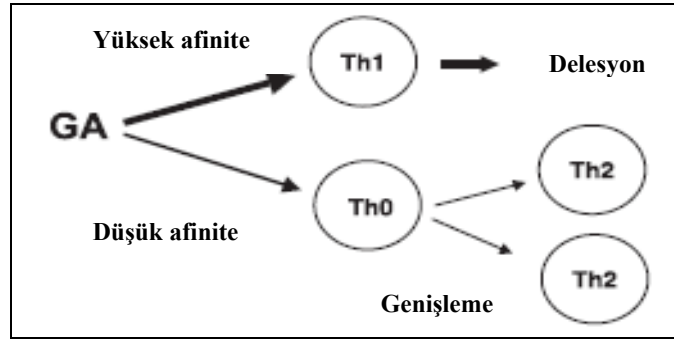
anti-enflamatuar sitokin sekresyonuna öncülük edip enflamasyonu inhibe etmesi yoluyla göstermektedir.

GA'nın DOE'deki immünolojik etkileri Tablo 1'de özetlenmiştir.

3.2.2 GA'nın MS'deki Etki Mekanizması

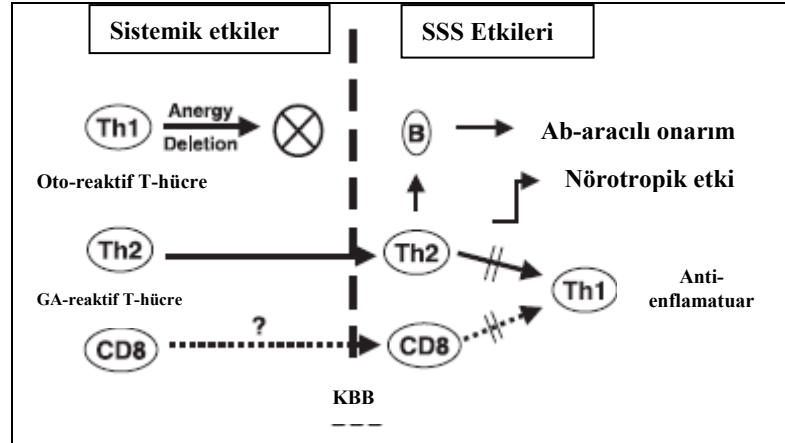
GA'nın yapısı ve nispeten küçük bir molekül olması, özellikle MHC proteinin, MS gibi otoimmün hastalıklarda ekspresyonu artan HLA-DR2 subünitine bağlanmasını sağlar (42–44). GA, T hücre reseptörü için MBP'nin 82–100 epitopu ile yarışmaya girmektedir. Bunun sonucunda myelin antijenine karşı oluşan immün hücre aktivasyonu ve enflamasyonu inhibe olur (43). MBP-reaktif T hücrelerin inhibe olması ile hücre proliferasyonu ve IFN- γ sekresyonu baskılanır. Aynı zamanda MBP₈₂₋₁₀₀-reaktif T hücrelerde anergi oluşur ve bu antijenik peptidin T hücreler tarafından tanınması GA tarafından yeniden düzenlenir (45). Tüm bu verilerin anlamı, GA'nın etkisini oto-immün T hücre aktivasyonunu etkileyerek gerçekleştirdiğidir.

Deneyisel modellerde olduğu gibi insan çalışmalarında da GA'nın etkisini immünmodülatuar Th2 hücreleri indüklemeye yoluyla gösterdiği kabul edilmiştir (Şekil 4). GA verilen MS hastalarında ilaca karşı güçlü bir lenfoproliferatif yanıt oluşmaktadır. Tedavinin birinci ayında, GA-reaktif T hücre fenotipi Th1'den Th2'ye shift yapar ve 3 ay sonunda GA'ya karşı gelişen proliferatif yanıt saptmaya başlar (46,47). İlk kez Miller tarafından gösterilen GA-reaktif T hücreler artık laboratuvar ortamında da üretilabilmektedir (45,47–52). Tedavinin birinci ayında oluşan GA-reaktif T hücreler, ilaç kesilse bile, prekürsörlerinin yoğunluğu azalmakla birlikte, 9 yıl süreyle varlığını devam ettirmektedir (53).



Şekil 4. GA ile tedavi edilen hastalarda Th2 hücre indüksiyonunun mekanizması.

GA-reaktif T hücreler SSS'ye girerek, çapraz-reaktif myelin antijenini tanır ve anti-enflamatuar sitokin salarak enflamasyonu baskılar (52,54). GA-spesifik T hücreler SSS'ye girdikten sonra, Th2 hücre tipine özgül anti-enflamatuar sitokinler olan; IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve TGF- β sekrete eder, IL-2 ve IFN- α gibi pro-enflamatuar sitokin salınımı baskılanır (55,56).



Şekil 5. GA'nın MS'deki etki mekanizmaları (57). (Ab, antikor; B, B hücre; KBB, kan beyin bariyeri; Th, T yardımcı hücre)

GA'nın etkisinin sistemik mi veya merkezi mi olduğu net değildir. Ancak, myelin-reaktif T hücrelerde anerji oluşturması ve MRG'de kontrast tutan yeni

lezyon oluşumunu baskılaması etkisinin sistemik olduğunu desteklemektedir (Şekil 5), (57).

GA-reaktif T hücrelerin nöronlar ve aksonlar üzerinde nöroprotektif etkileri olabileceği iddia edilmiştir (58,59). Bununla ilgili kanıtlar;

- GA-reaktif T hücreler SSS’de TGF- β sekrete ederek mikrogliya aktivasyonuna ve nitrik oksit, glutamat ve serbest oksijen radikallerinin temizlenmesine öncülük eder,
- GA-reaktif Th2 hücreler hasar bölgesinde yoğunlaşıp, supresör ve regülatuar etkileri ile enflamatuvar süreci durdurur,
- GA-reaktif T hücreler, “brain-derived neurotrophic factor (BDNF)” olarak bilinen ve SSS’de onarım ve koruyuculuk fonksiyonu gösteren güçlü nörotropin başta olmak üzere, nörotropin-3 ve nörotropin-4 gibi ajanların etkinliğini artırır (53,60,61),
- GA, nöroenezisi artırarak, aktif olarak nöral onarıma katılır, progenitör hücreleri aktive ederek hasarlı dokuya göç başlatır, lezyon bölgesine doğru yeni aksonal filizlenmeler ve rejenerasyon oluşur,
- GA ile tedavi edilen hastaların hemen hepsinde oluşan GA antikorları, remiyelinasyonu artırır (62),
- Uzun süre tedavi edilen hastalarda kara delik oluşumu azalır (63).

3.3. KEMOKİNLER

Sitokinler, 8–80 kDa ağırlığında küçük proteinler olup genellikle otokrin veya parakrin tarzda etkirler. 200’den fazla farklı insan sitokini tanımlanmıştır. Tüm sitokinler IL’ler, İFN’lar, coloni stimüle edici faktörler (CSF), TNF’ler,

büyüme faktörleri (growth faktörler) ve kemokinler olarak gruplandırılabilir. Ancak bazı sitokinler iki gruba da ait olabilir. Örneğin IL-8 hem interlökin hem kemokindir. IL-1 ve TNF- α gibi pek çok sitokin, benzer fonksiyonları paylaşırlar. Sitokinler, immün ve enflamatuar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerinin artırılması ile uyarılmış lenfositler, monositler, makrofajlar ve diğer bazı hücrelerde sentezlenirler. Peptid veya glikoprotein yapısında soluble maddelerdir. Sitokinler antijen için spesifik olmamakla beraber antijenin ortaya çıkan sitokin profilinin oluşmasında yönlendirici etkisi olabilir. Sentezlenmeleri ve hedef hücreleri etkilemeleri çoğunlukla bir stimülasyonu gerektirir, kendi aralarında agonist ve antagonist etkileşimler gösterebilirler. Fizyolojik açıdan sitokine hücreler arasında mesaj ileten biyolojik mediyatörler gibi bakılabilir. Aktive T lenfositleri tarafından sentezlenip salınan sitokinler lenfokin, aktive monosit ve makrofajlardan sentezlenip salınan sitokinler monokin ve lökositler arasında etkileşim yapan sitokinler interlökin adı altında toplanmışlardır (64).

Kemokin kelimesi; **kemotaktik** ve **sitokin** kelimelerinden türetilmiştir. Kemokinler kemotaksis yapan (kemoatraktan) sitokin süper ailesidir. Kemokinler 8-14 kDa ağırlığında küçük protein ailesi olup, hem normal hem de patolojik koşullarda lökosit trafiğinde rol oynarlar. Enflamatuar hücrelerin enflamasyon bölgesine çekilmesini sağlayarak, bu bölgenin hücresel içeriğini belirlerler. Genel olarak sitokinler, immün sistemin daha genel fonksiyonlarını yaparken kemokinler, daha ince işlevleri gerçekleştirirler ve submoleküler düzeyde etkilidirler (65–67). Kemokinler ve reseptörleri mükemmel bir sinyal sistemi oluştururlar. İnsanda tanımlanmış 50 den fazla kemokin vardır ve bunlar 18 farklı reseptörle bağlantı kurabilirler (68–70).

3.3.1. Kemokin Aileleri

Bütün kemokinler yapısal olarak benzerler ve monomerik formları küçüktür (71). Kemokinlerin çoğu solüsyonlarda dimerize olur. Monomerik formlar, kısa bir amino uç (NH_2), en az 3 anti-paralel beta bandı (β -pleated sheet) ve bağlayıcı luplardan oluşan bir iskelet ve karboksi uçta 20-30 amino asitten oluşan bir alfa heliks yapısı taşır. Kemokinlerin çoğu pozisyonları çok iyi korunmuş olan ve disülfid bağlarıyla bağlı 4 sistein içerir. Lenfotaktin hariç bütün kemokinlerde 2 adet disülfid bağı bulunur. Kemokinler NH_2 uca en yakın konumdaki sistein (C) çiftinin özelliklerine göre sınıflandırılır (Tablo 2), (65). Kemokin ailelerinin kendi içlerinde primer amino asit sıralamaları benzerlikler gösterir. Kemokinlerdeki yapısal farklılıklar fonksiyonel farklılıklarla birlikte gider. Kemokinler atraktan etkilerini lokal olarak ve düşük düzeylerde ekspresse oldukları zaman gösterirler ve sistemik olarak verildiklerinde lokal atraktan etkilerini antagonize ederler. Biyolojik aktiviteleri nanomolar konsantrasyonlarda gözlenir (65,72). Kemokin genlerinin çoğu lokalize edilmiştir ve bazı istisnalar olmakla birlikte değişik ailelerin genleri belli kromozomlar üzerinde kümelenmeye eğilimlidir (73). Benzer kümeleşme kemokin reseptör genlerinde de gözlenir.

Kemokinlerin büyük çoğunluğu CXCL ve CCL alt-grubunda bulunurlar. Alt gruplar fonksiyonel açıdan da önem taşır. CXC kemokinler sıklıkla nötrofil kemotaksisini sağlarken, CC kemokinler esas olarak mononükleer enflamatuar hücreler, lenfositler ve monositler için kemoatraktan etki gösterirler (65,66).

Tablo 2. Kemokin aileleri ve başlıca üyeleri

Kemokin grubu	Gen lokalizasyonu	Üyeleri
CXCL kemokinler (α kemokinler)	4. kromozom	IL-8, IP-10, SDF-1 α , β , ENA-78, MGSA/GRO α , β , γ , Mig, NAP-2, MIP-2, GCP-2, PBP, β -TG, CTAP-III, PF-4, LIX, I-TAC
CCL kemokinler (β kemokinler)	17. kromozom	RANTES, MIP-1 α , β , γ , MCP-1,2,3,4,5, Eotaksin, MIP-3 α (Exodus-1, LARC), SLC, TARC, TECK, MIP-5, PARC
CL kemokinler (γ kemokinler)	1. kromozom	Lenfotaktin
CX3CL kemokinler (δ kemokinler)	16. kromozom	Fraktalkin (Nörotalkin)

C, sistein; X, aminoasit dizisi; IL-8, interlökin-8; IP-10, inducible protein 10; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; ENA-78, Epithelial-derived neutrophil attractant; GRO- α , Growth-regulated protein alpha precursor; Mig, Monokine induced by IFN- γ ; NAP-2, Neutrophil-activating protein 2; MIP-1 α , Macrophage inflammatory protein; RANTES, Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted; MCP-2, Monocyte chemoattractant protein; GCP-2, Granulocyte chemotactic protein -2; β -TG, Beta-thromboglobulin; TARC, Thymus and activation-regulated chemokine; TECK, Thymus expressed chemokine; SLC, Secondary lymphoid tissue chemokine; CTAP-III, Connective tissue activating protein; PBP, Platelet basic protein; PF-4, Platelet factor-4; LARC, Liver and activation-regulated chemokine; LIX, Lipopolysaccharide-induced CXC chemokine; I-TAC, Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant; PARC, pulmonary and activation-regulated chemokine =CCL18;

3.3.1.1. CXC Kemokin Ailesi (α kemokinler)

Amino ucuna en yakın iki sistein arasında bir amino asit mevcuttur. Ailenin çeşitli üyelerinde bu amino asit farklıdır. Bu ailenin genleri 4. kromozomda kümelenir. İki sisteinden önce ELR (Glu-Leu-Arg; glutamat, lösin, arginin) motifinin bulunup bulunmamasına göre iki alt gruba ayrılırlar. Amino uç ile iki sistein arasında ELR yapısı olan ve ELR kısmı kemokinin amino ucuna çok yakın konumda bulunan kemokinler ELR-CXC kemokinler olarak adlandırılır ve

başta IL-8 olmak üzere genellikle kuvvetli nötrofil kemotaksisi ve aktivasyonu yaparlar. IL-8, bazofillere de kemotaktiktir ve histamin salınımını uyarır. Growth-regulated protein alpha precursor [GRO- α =Melanoma growth stimulatory activity factor (MGSA)=Neutrophil-activating protein 3, (NAP-3)=CXCL1], GRO- β , GRO- γ (sıçanda), Macrophage inflammatory protein 2 alfa (MIP-2 α), MIP-2 β , Epithelial-derived neutrophil attractant-78 (ENA-78) nötrofiller için kemoatraktandır. Granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2) IL-8'e göre 5-10 kat zayıf nötrofil spesifik kemoatraktan ve aktivatördür. PBP'nin amino ucundan 9 amino asit atılmasıyla Connective tissue activating protein-III (CTAP-III) oluşur. CTAP-III konnektif doku hücrelerinin glikozaminoglikan yapımını uyarır. Fibroblastlar için çok zayıf bir kemoatraktandır. Proteolizle amino uçtan dört amino asit daha ayrılırsa β -TG oluşur. Fibroblastlar için kemoatraktandır. Onbir amino asit daha koparsa neutrophil- activating peptide-2 (NAP-2) oluşur. NAP-2'nin nötrofil kemoatraktan etkisi IL-8'e göre 2-100 misli daha zayıftır (74,75). Platelet basic protein (PBP), CTAP-III ve β -TG'nin ise ELR kısımları amino uca uzak bir yerleşim gösterdiğinden nötrofil kemoatraktan etkileri NAP-2'den daha zayıftır. ELR motifi olmayan CXC kemokinlerin nötrofil aktive edici özellikleri çok düşüktür ve oldukça farklı işlevleri vardır. IFN- γ inducible protein (IP-10), in vitro olarak pek çok hücre tarafından yapılır. Monosit, doğal öldürücü hücre (NK) ve endotel hücre için kemotaktiktir. MIG, IFN- γ tarafından indüklenen makrofajlarca yapılır. T lenfosit, endotel ve fibroblast için kemotaktiktir. Tümör infiltre eden lenfositlere (TIL) etkilidir. Bu özellik IP-10'da da vardır. Ve TIL üzerinde aynı reseptörü (CXCR3) paylaşırlar. Stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α) in vitro T lenfosit kemoatraktanıdır. CD34⁺ hemopoetik progenitörler

için kuvvetli kemoatraktandır. Normal B lenfosit gelişimi ve normal kardiyojenez için gereklidir. SDF-1 α 'ları yetersiz farelerde ventrikül septal defekt geliştiği gözlenmiştir (74,75).

3.3.1.2. CC Kemokin Ailesi (β kemokinler)

Amino uca en yakın iki sistein komşudur. Genleri genellikle 17. kromozomda kümelenmiştir. MIP-3 α geni 2., MIP-3 β geni ise 9. kromozomda yer alır. CC kemokinlerin fonksiyonları bazı farklılıklar gösterirse de başlıca mononükleer hücelere etkilidir (monosit-makrofaj ve T lenfosit). Bazıları eozinofil ve bazofiller için kuvvetli kemotaktiktir. Bazıları NK ve dendritik hücreleri de (DC) etkiler. Genellikle nötrofiller üzerinde inaktiftirler. Eotaksinler selektif olarak eozinofil ve bazofillere etkir. Sadece CCR3'e bağlandığı bilinen eotaksin ve sadece CCR5'e bağlanan MIP-1 β dışındaki CC kemokinler çakışan bazı spesifiteler gösterir. MCP-1, CD56⁺ NK fonksiyonlarını uyarır. NK ve CD8⁺ T hücrelerden granül salınımı yapar, bazofillerden histamin salınmasını kuvvetle uyarır. RANTES, CD8⁺ T kemoatraksiyonu için en kuvvetli kemoatraktanlardan biridir ve eozinofiller tarafından da sekrete edilir. Bazofillere de etkir ve MCP-1 gibi histamin salınımına yol açar. Eozinofiller üzerinde MCP-3 ve RANTES ile aynı reseptörü kullanır (CCR3) ve reseptörü için selektivitesi yüksektir. Eotaksin-2 istirahatteki T lenfositler ve eozinofiller için atraktandır ve hematopoez üzerinde etkisi vardır. Bu ailenin oldukça yeni kemokinlerinden Thymus and activation-regulated chemokine (TARC), Liver and activation-regulated chemokine (LARC), Epstein–Barr-virus-induced receptor ligand chemokin (ELC); Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) ve Pulmonary and activation-regulated

chemokine=CCL18'in (PARC) selektif olarak lenfositleri etkilediği düşünülmektedir (76). TARC timusta yapısal olarak bulunur. LARC'ın DC göçü üzerine düzenleyici etkisi olduğu, DK-CK1 ve TECK'in ise fizyolojik lenfosit trafiğinde rolü olduğu düşünülmektedir (67). MDC, makrofajlar, monosit kaynaklı olgun DC'ler ve normal timusta fazla miktarda eksprese olur. Monosit, monosit kaynaklı DC, IL-2 ile aktive olmuş NK ve aktif T lenfositler için kemotaktiktir (77-79).

3.3.1.3. C Kemokin Ailesi (γ kemokinler)

Bu ailenin bilinen tek elamanı olan lenfotaktin diğer kemokinlerin 2. ve 4. sisteinlerine karşılık gelen 2 sisteine sahiptir ve amino uçta tek bir sistein vardır (65, 74). Geni 1. kromozomdadır. Başlıca T lenfositler tarafından yapılır ve T lenfositler için kemotaktiktir.

3.3.1.4- CX₃C Kemokin Ailesi (δ kemokinler)

Diğer kemokinlerin aksine amino ucunda bir sistein taşıyan hücre yüzey membran proteinidir (80). Kemokin kısmı yoğun biçimde müssine benzer karbonhidrat taşıyan uzun bir çubuğun sonunda yer alır. Fraktalkinin ilk iki sisteini arasında 3 aminoasit yer alır. Endotel hücre üzerindeki fraktalkin in vitro monosit ve T lenfosit adezyonunu indükler ve adezyon molekülü gibi davranır. DC olgunlaşması sırasında fraktalkin ekspresyonu artar, doku bütünlüğü, tamiri ve rejenerasyonunda rolü olabilir (81,82). Fraktalkin geni 16. kromozomdadır.

Kemokinlerin 3 boyutlu yapılarını inceleyen çalışmalarda ilk iki sistein arasına sadece 0, 1 ya da 3 aminoasit girebileceği gösterilmiştir. Bu nedenle

CX2C kemokin yoktur. Bir tetramer olan Platelet factor-4 (PF4) hariç kemokinlerin çoğu dimer şeklindedir. CXC ve CC kemokinlerin dimerizasyon modelleri farklılıklar gösterir. Tartışmalı olmakla birlikte biyolojik aktif formların sıklıkla monomerler olduğu düşünülmektedir (65,74).

Kemokinler, immün ve non-immün sistem hücreleri olmak üzere pek çok değişik hücre tarafından üretilir. Başlıca kemokin kaynakları aktif monosit-makrofaj, endotel ve T lenfositler. Nötrofil, trombosit, eozinofil, düz kas ve mast hücreleri, NK hücreler, keratinositler, hepatositler, fibroblastlar, mezenşiyal, epitelium hücresi, DC ve mezotelyal hücreler tarafından da yapılabildikleri gösterilmiştir. IL-8 ve MCP-1 hemen hemen her hücrede yapılırken, PF4, PBP, CTAP-III sadece trombositlerde bulunur. Genelde kemokinler hücrenin uyarılmasıyla yapılmaya başlanıp salgılandılar da, PF-4, PBP, CTAP-III trombositlerin alfa granüllerinde önceden depo edilir ve hücre aktive olduğunda salgılanır. CXC kemokinler daha ziyade aktif mononükleer fagosit, endotel, fibroblast ve trombosit, CC ailesi ise daha ziyade aktif T lenfositler tarafından yapılır. Bir istisna MCP-1'dir. Bu kemokin, T hücreleri ve aktif mononükleer fagosit yanı sıra endotel, fibroblast gibi doku hücreleri tarafından da üretilir. Genellikle kemokinlerin çoğunun yapımı için monosit/makrofaj, endotel ve fibroblastların çeşitli nedenlerle aktive olması gerekirse de SDF-1, MDC, TECK, TARC, SLC ve ELC'nin yapısal olarak bulunduğu bilinmektedir. Enfeksiyon, enflamasyon ve neoplastik olaylar sırasında ise pek çok kemokinin yapımı indüklenir. Kemokin yapımı lipopolisakkarid (LPS), mitojenler, T hücreleri aktive eden antijenler, viruslar, trombosit agregasyonuna yol açan nedenler, kompleman

5a (C5a), lökotrien 4 (LTB4) ve proenflamatuar sitokinlerin (IL-1, IFN- γ , TNF- α , PDGF) etkisiyle uyarılır (71,83).

3.3.2. Kemokin Reseptörleri

Kemokin reseptörleri yapısal olarak rodopsinlere benzer ve yedi adet transmembran bölgesi olan tek polipeptidden oluşurlar. Bütün kemokin reseptörleri yedi transmembran α -heliks domainli karakteristik bir yapıya sahiptir. Bu özellik trimerik Guanosine trifosfat (GTP) ile birleşmiş proteinlerde de (G protein) gösterilmiştir. Heterotrimerik GTP-bağlayan proteinler üzerinden sinyal iletimi yaparlar. Kemokin reseptörleri kemokin salınımı ile hızlı olarak azalır.

Lökositlerin yanı sıra nöral, epitelyal ve endotelyal hücrelerde de bulunurlar. Kemokin reseptörleri yapısal olarak eksprese olabildikleri gibi çeşitli uyarılarla artan ya da azalan ekspresyon gösterebilirler (75).

Hemen hemen bütün kemokin reseptörlerinin amino ucunda, 1. ve 3. ekstrasellüler lupta bir adet olmak üzere 2 sisteini vardır. Bunların disülfid bağı ile bağlanarak ligand bağlayıcı paketi oluşturdukları düşünülmektedir. CXC kemokin reseptör ailesinde % 36-77, CC kemokin reseptör ailesinde ise % 46-89 oranında aminoasit sıralanma benzerliği vardır (74,77). Duff antijen ya da Duffy antigen receptor for chemokines (DARC)'ın durumu farklıdır. DARC eritrositler üzerinde bulunan bir kan grubu antijenidir. Aynı zamanda *Plasmodium vivax* için de reseptördür. DARC, ligandına bağlanınca bir sinyal iletimi olduğu gösterilememiştir. Non-fonksiyonel bir reseptör olduğu ve bir kemokin çukuru gibi davranarak kan dolaşımında serbest sitokin difüzyonunu sınırlayıcı etki gösterdiği sanılmaktadır. Eritrositlerinde Duffy negatif olan bireylerde bile

postkapiller endotel üzerinde bulunabilir ancak burada da temizleyici (scavenger) fonksiyonu görüp görmediği belli değildir. Endotel üzerinde bulunduğunda, kemokinleri dolaşımdaki ya da diapedezdeki lökositlere sunabileceği de düşünülmektedir (84,85).

CC kemokinler için 10 farklı reseptör (CCR1, CCR2,...CCR10) ve CXC kemokinler için 6 farklı reseptör (CXCR1,...CXCR6) vardır. Kemokin reseptörlerinin sınıflandırılması da benzer şekilde yapılır; CXCR, CCR, CR ve CX3CR. Kemokin reseptörlerinin çoğu birden fazla kemokin ile bağlanabilir. Bir lökosit subpopülasyonu üzerinde de değişik kemokinlere ait reseptörler bulunabildiğinden bir kemokin birden fazla hedef hücresi bulunabilir. Böylece hücreler değişik reseptörler aracılığıyla farklı moleküllere yanıt verebilirler. Bir hücre hangi reseptörünün aktive edildiğine bağlı olarak değişik tepkiler verebilir. Pek çok kemokin benzer reaksiyonlara yol açabilir. Bir hücre sıklıkla aynı uyarı ile aynı zamanda birden fazla kemokin üretebilir. Bir hücrenin birden fazla değişik kemokin üretebilmesine *polispermizm* denilmektedir. Bu özellik başlıca mononükleer fagositler ve endotel hücrelerinde bulunur (77). Farklı tipte immün hücreler çok sayıda kemokin reseptörü eksprese edebildiği için, kemokin reseptör farmakolojisi oldukça komplekstir. Bu karmaşıklık ve selektif agonist/antagonistlerinin olmaması nedeniyle, doğal sistemlerde kemokin reseptörlerini çalışmak zordur (68).

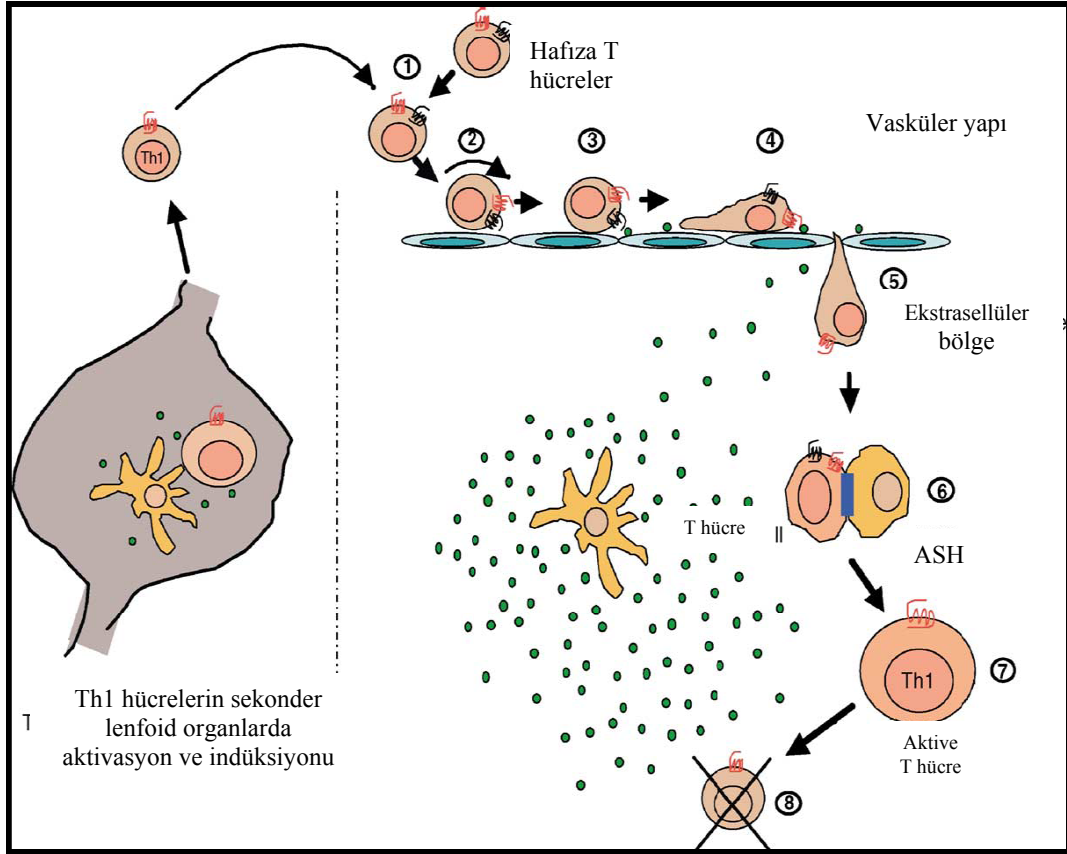
Bilinen kesin kemokin reseptörleri CCR5 ve CXCR4 HIV için koreseptör olarak etkir. Bazı aktive olmuş T lenfositler CCR5'i bağlayan kemokinler sekrete eder ve virus ile yarışarak HIV enfeksiyonunu bloklar (86).

Kemokinler yedi-transmembran reseptöre bağlanarak heterotrimerik G-proteini aktive eder. Kemokin tarafından aktive edilen G-protein, G_{ai} ailesine aittir ve pertussis toksine duyarlıdır. Kemokin reseptörünün sinyal iletimi ile cAMP inhibe olur ve intrasellüler kalsiyum düzeyinde geçici bir artış oluşur. Bundan sonra ise “mitogen-activated protein kinases” (MAPKs), “phosphoinositide 3 kinase” (PI3-K), RAC, RhoA ve CDC42H gibi küçük GTP-bağlayıcı proteinlerin aynı yönde aktivasyonu ile hücre migrasyonu için gerekli olan sitoskeletal reorganizasyon gerçekleşmiş olur (87,88).

3.3.3. Kemokinlerin Rol Aldığı Olaylar

Kemokin stimülasyonu kemotaksise neden olur. Farklı tiplerdeki lökositlerin kemotaksisi kompleks kemokin reseptör kombinasyonu ile gerçekleşmektedir. İmmün sistemin fizyolojik koşullardaki hücre trafiğini sağlayan homeostatik kemokinler ile enflamasyon sırasında uyarılmış kemokinler arasında belirgin farklar vardır. Lenfositlerin, monosit ve granülositlerin, aktivasyonun farklı dönemlerindeki farklı migrasyon özellikleri, homeostatik ve uyarılmış kemokinlerin kompleks kombinasyonları aracılığıyla bir düzen kazanır (89). Kemokinlerin kemotaksis dışında, dendritik hücre matürasyonu, hücre adezyonunu, makrofaj aktivasyonu, fagositoz, nötrofil degranülasyonu, T hücre farklılaşması ve aktivasyonu, B hücre antikor tip belirlenmesi, apoptoz, angiogenezis, proliferasyon, hematopoez, anti-tümör aktivite, morfogenez, fibrogenez ve sitokin sekresyonu gibi çok sayıda fonksiyonları da vardır (90,91).

Kemokinlerin immün yanıtındaki fonksiyon basamakları, Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. İmmün yanıtta kemokinlerin rolü (91). (1) Aktive Th1 veya bellek T hücrelerin göçü. (2) T hücrede endotel hücreleri boyunca selektin aracılı "Rolling, yuvarlanma". (3) Kemokin ilişkili integrin aracılı güçlü adezyon. (4) CCR5'in katkısıyla T hücre yapısında değişme ve endotelial bütünlüğün bozulması. (5) CCL5 konsantrasyonunda artış ile birlikte damar dışına diapedez. (6) İnflamasyon bölgesine giden hücrenin profesyonel ASH tarafından aktivasyonu. CCL5-CCR5 ilişkisi ile kostimülasyon/stimülasyon (7) Th1 hücre farklılaşması ve aktivasyonu. (8) Kemokin ilişkili apoptoz ve hücre ölümü.

Kemokinler T hücreler için kostimülatör etkiye sahiptir (91). CC kemokin ailesinden olan CCL5, T hücre proliferasyonu, IL-2 ve IFN- γ üretiminde kostimülatör rol oynar (92). IL-2 de hafıza T hücrelerde CCR5 ekspresyonunu artırır (92,93). CXCL12 (SDF-1 α)'nın da CXCR4 aracılığıyla aynı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kemokinler bu etkilerini mikromolar dozlarda göstermektedir (94,95).

Pro-enflamatuar kemokinler enflamasyon bölgesindeki T hücrelerin aktivasyonunda rol almaktadır (96). T hücrelerin CCL5 tarafından antijenden bağımsız olarak aktivasyonu, otoimmünite açısından büyük önem taşır.

Kemokin reseptörleri T hücre alt tiplerinin tanınmasında belirleyicidir: Th1'ler CCR5 ve CXCR3, Th2'ler ise CCR2 ve CCR4 eksprese ederler (97–100). CCR5'in ligandları olan CCL3, CCL4 ve CCL5, Th1 hücreler için kemotaktik özellik gösterir, Th2'leri etkilemez (101). Kemokinler T hücre polarizasyonunda da görev alırlar. CCL3, CCL4 ve CCL5 Th1 hücre tarafından eksprese edilirler ve Th1 yanıtı ile ilişkilidirler (102,103).

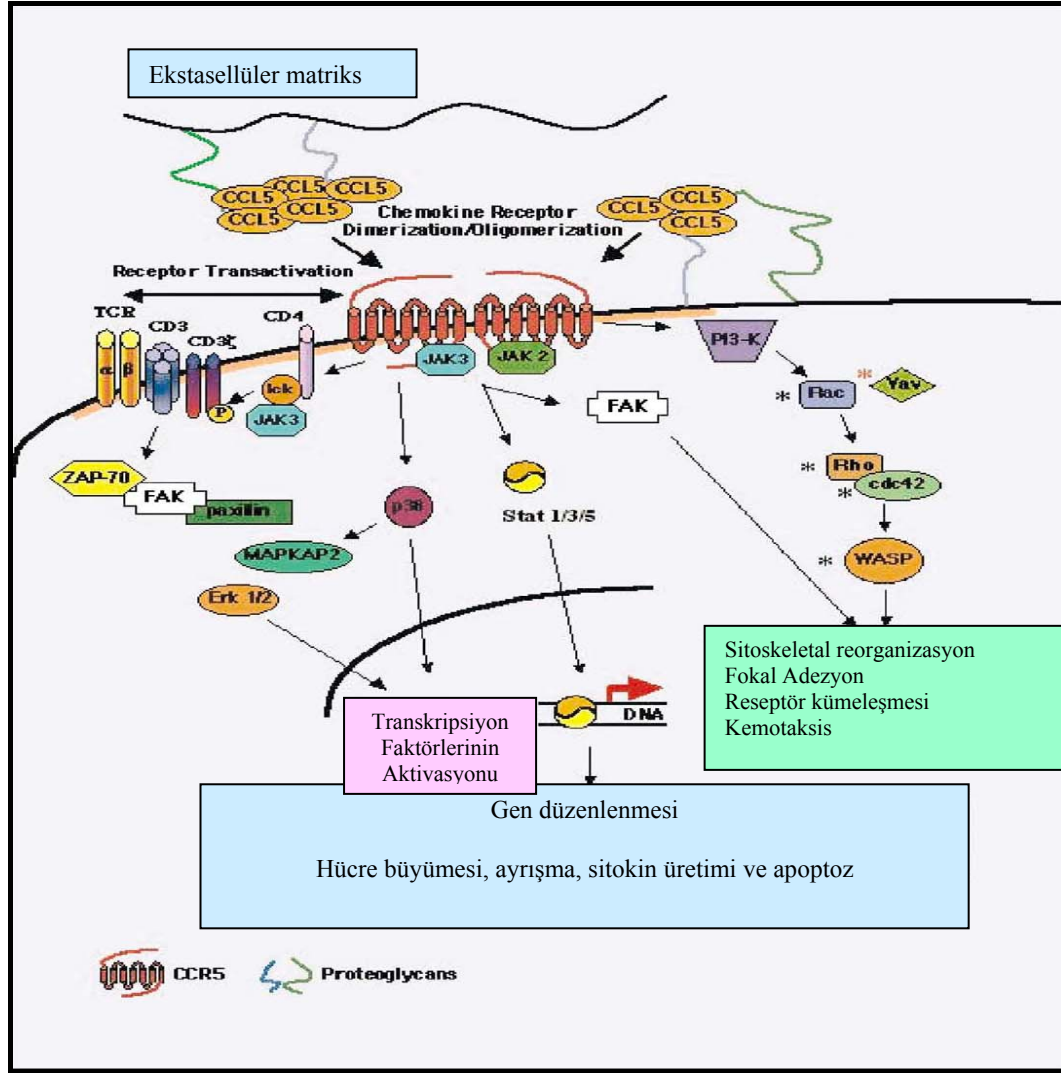
Kemokin ekspresyonu immün yanıtın devamında da rol oynar. CXCL12 apoptozu tetikleyen bir kemokindir (104). Kemokin-ilişkili hücre ölümü, enflamatuar bölgede geç dönemde ortaya çıkan bir düzenleyici mekanizmadır.

3.3.4. SSS'de Kemokinler ve Reseptörleri

Kemokin ve reseptörlerinin etkileşimi sonucunda oluşan sinyal yolunun şematik bir özeti, CCL5-CCR5 örneği ile Şekil 7'de gösterilmiştir. Yedi transmembran G-protein çifti yapısındaki kemokin reseptörünün aktivasyonu ile, oldukça kompleks olan sinyal yolu aktive olarak tirozin fosforilasyon sinyal kaskadını harekete geçirir (91,105).

Kemokinler ve reseptörlerinin beyin dokusunda eksprese olduğunu gösteren ilk çalışmalar 90'lı yılların başlarında yapılmıştır (106,107). Günümüzde SSS'nin endojen hücrelerini oluşturan astrositler, oligodendrositler, mikrogliya ve nöronlar tarafından farklı kemokinlerin sentez edildiği bilinmektedir (108–111).

Bu endojen hücrelerin tümü fonksiyonel kemokin reseptörü de eksprese etmektedirler (112,113).



Şekil 7: T hücrelerde CCL5-CCR5 sinyalinin şematik görüntüsü (91). (CCL5 ekstrasellüler matrikste veya CCL5 sekrete eden hücre yüzeyinde glikozaminoglikana bağlanır ve kemokin agregasyonunu artırır. CCR5'e bağlanan CCL5 agregatları reseptörün dimerizasyon/oligomerizasyonunu tetikler. CCL5, CCR5 ve T hücre reseptör componentinin transaktivasyonu aracılığı ile sinyal yolağını aktive eder)

SSS'de kemokin reseptör ekspresyonu, TGF- β 1 ve IFN- γ gibi enflamatuar mediatörler tarafından düzenlenmektedir. Uyarılmamış hücrelerin de reseptör

eksprese edebildiği birçok çalışmada gösterilmiştir (114,115). CX3CL1 (Fractalkine) nöronlar, CXCL12 ise astrositler tarafından normal beyin dokusunda eksprese olmaktadır (116–118).

Periferde bulunan çok sayıda kemokin ile karşılaştırıldığında, SSS'de patolojik koşullarda nispeten daha az kemokin bulunur. Sayısı az olmasına karşın SSS kemokinleri nörodejenerasyonda çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Hasarlı beyin dokusunda bulunan kemokinler; CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CXCL8 ve CXCL10'dur (108–111). Glial kemokinlerin SSS enflamasyonunda önemli rol oynadıklarını gösteren çalışmalar vardır (119–122). Dolayısıyla glial kemokin ekspresyonunu inhibe etmeye yönelik tedaviler nörodejeneratif hastalıklarda ön plana çıkmaya başlamıştır. Deneysel çalışmalarda glial kemokinlerin, sitokinler, bakteriyel toksinler, β -amilod veya viral proteinler gibi çok sayıda pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar faktörler tarafından tetiklendiği gösterilmiştir (123–126). Ancak glial kemokin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar in vivo olarak halen tam açıklık kazanamamıştır.

Nörodejeneratif durumlarda sadece glial hücreler değil, nöronlar tarafından da CCL2, CXCL10 ve CCL21 gibi sekonder lenfoid doku kemokinlerinin eksprese olduğu görülmüştür. Nöronal kemokinler genellikle glial olanlara göre daha hızlı bir şekilde eksprese olurlar. Nöronal hasar sonrasında glial kemokinler 1-3 gün içerisinde ortaya çıkarken, nöronlarda bu süre 6-12 saattir (127-131). Bu süre, nöronal-kemokinlerin daha spesifik etkileri olduğunu, dolayısıyla nöronal kemokinlerin hasar sonrası nöronlar ile glial hücreler arasında erken bir iletişim sistemi oluşturduklarını düşündürmektedir (132).

3.3.5. SSS’de Kemokin ve Reseptörlerinin Fonksiyonları

3.3.5.1. Nöroenflamasyon

Kemokinler, beyinde lokal immün yanıt ve lökosit göçünü düzenlerler. SSS’nin immün hücrelerini oluşturan astrosit ve mikroglialar farklı tipte kemokin üretirler. Glial hücrelerin KBB ile olan yakın ilişkileri nedeniyle, lökositlerin beyin infiltrasyonlarını düzenledikleri kabul edilmektedir (133). İlave olarak insanlarda beyinde küçük damar yüzeylerinde kemokinleri bağlayan bölgeler gösterilmiştir (134).

Tüm nörodejeneratif hastalıklar kemokin ekspresyonu, lokal glial hücre aktivasyonu ve lökosit göçü ile birliktedir. İnsanda SSS hastalıkları ile ilişkili kemokin ve kemokin reseptörleri, Tablo 3’de özetlenmiştir. SSS’ye hücre göçünün tipi ve oluşacak immün yanıt, patolojik sürecin tipine göre eksprese olan kemokinle direkt ilişki gösterir (135). Lökosit infiltrasyonu ile karakterize olan SSS hastalıklarının en iyi bilineni MS’dir. DOE’de, CCR2 knockout farelerde MS gelişmediği, CCL2 knockout farelerde ise makrofaj infiltrasyonunun azaldığı gösterilmiştir (120–122).

3.3.5.2. Nöroprotektif Etkileri

CX3CL1, CXCL12, CCL3 ve CCL5 ile ko-stimülasyon, nöronlarda gp-120-ilişkili apoptozu önler (136-138). Aynı zamanda CXCL8, CXCL12, CCL5 ve CCL2 gibi kemokinler, N-Metil D-Aspartat (NMDA) veya β -amiloid aracılı nöron ölümü gibi farklı hasarlara karşı da koruyucudur. Ancak nöronal kemokin reseptör subtipleri ile ilişkili çelişkili bilgiler de vardır (139–141).

Tablo 3. İnsanda SSS hastalıkları ile ilişkili kemokin ve kemokin reseptörleri (108–111,150).

SSS patolojisi	Kemokinler	Kemokin reseptörleri
Alzheimer hastalığı	MCP-1/CCL2 IP-10/CXCL10 MIP-1 β /CCL4	CCR3 CCR5 CXCR2 CXCR3
Multiple Skleroz	MCP-1/CCL2 MCP-2/CCL8 MCP-3/CCL7 RANTES/CCL5 MIP-1 α /CCL3 MIP-1 β /CCL4 IP-10/CXCL10 MIG	CCR2 CCR3 CCR5 CXCR3
HIV-1-ilişkili demans	MCP-1/CCL2	CCR5 CXCR4
HIV ensefaliti	MCP-1/CCL2 MIP-1 α /CCL3 MIP-1 β /CCL4	CCR2 CCR5 CXCR4
Menenjit	MCP-1/CCL2 MIP-1 α /CCL3 MIP-1 β /CCL4 Gro- α IL-8/CXCL8 IP-10/CXCL10	
Beyin travması	MCP-1/CCL2 IL-8/CXCL8	
Behçet hastalığı	MIP-1 α /CCL3	
Myelopati	MIP-1 α /CCL3	
Spinal kord yaralanması	MCP-1/CCL2 MIP-1 α /CCL3 Gro- α	

(IL-8, interlökin 8; IP-10, interferon- γ -inducible protein 10; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIG, monokine induced by interferon γ ; MIP, macrophage inflammatory protein; RANTES, regulated on activation, normal T cells expressed and secreted.)

3.3.5.3. Nöral Gelişime Etkileri

Nöronların kemokin reseptör ekspresyonu, nöronal öncüllerin göçünü düzenleyerek beynin gelişimine önemli katkılar sağlar. Bu deneysel olarak gösterilmiştir (142). CXCL12 ile CXCR4'ün aktive olamadığı hayvanların doğumdan hemen sonra öldüğü ya da beyin anomalisi olduğu görülmüştür (143). İnsanda da fetal sinir dokusunda, nöronal CCL2 ve astrositik CXCR3'ün gelişimsel ekspresyonu olduğu bildirilmekle birlikte, bu proteinlerin nöral gelişimdeki fonksiyonları halen araştırılmaktadır (144,145).

3.3.5.4. Nörotransmisyon Etkileri

Astrositler ve sinapslar arasındaki yakın komşuluk, son yıllarda sinaptik transmisyonunda astrositlerin rollerinin araştırılmasına ilgi çekmiştir. Astrositlerden salınan glutamat, sinaptik geçişin etkinliğini kontrol etmektedir (146). Kemokinler glutamat salınımını düzenleyici etkiye sahiptir. CXCL12'nin serebellar Purkinje hücrelerinde kalsiyum geçişini uyarırken aynı zamanda astrositin glutamat salınımını etkileyerek spontan sinaptik aktiviteyi de düzenlediği gösterilmiştir (141,147). Son yıllarda kemokinlerin sinaptik geçiş üzerine olan etkilerinde nöron elektrofizyolojisini direkt olarak etkilemelerinin de rol oynadığı bildirilmiştir (148,149).

3.4. MULTİPLE SKLEROZ'DA KEMOKİNLER

Çok sayıda terapötik ajan denenmekle birlikte, MS tedavisi halen çözülememiş bir bilmece olmaya devam etmektedir. Son yıllarda, lökositlerin

SSS'ne göçünde rol alan spesifik kemokinlere yönelik uygulamaların MS tedavisinde faydalı olacağını düşündüren gelişmeler olmuştur (5).

İnsanlarda yapılan klinik çalışmalarda, MS'in gelişimi süresince kemokin ve kemokin reseptör ekspresyonunun anlamlı düzeylerde bozulduğu gösterilmiştir (17,151–153). Multiple Skleroz'da SSS'de rol alan kemokin ve kemokin reseptörleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Multiple Skleroz'da SSS'de rol alan kemokin ve kemokin reseptörleri

Kemokinler	Kemokin Reseptörleri
MCP-1/CCL2	CCR2
MCP-2/CCL8	CCR3
MCP-3/CCL7	CCR5
RANTES/CCL5	CXCR3
MIP-1 α /CCL3	
MIP-1 β /CCL4	
IP-10/CXCL10	
MIG	

3.5. GA VE KEMOKİNLER

GA ile tedavi edilen MS hastalarında Th1 hücrelerin enflamasyon bölgesine göçünden sorumlu olan kemokin reseptörlerinin ekspresyonunda belirgin azalma olmaktadır. Özellikle bu azalma CXCR3 ve CCR5'te belirgindir. Bu iki kemokin reseptörü, MS hastalarının beyin dokusunda patojenitenin oluşmasına eşlik ettiği gösterilmiş reseptörlerdir. Tedavi sonrası CXCR3'ün IP-10 ligandı, CCR5'in de RANTES ligandı ile bağlanma kapasitesi azalmaktadır (154).

CXCR6 periferik Th1 hücrelerden eksprese olmaktadır. Hem GA-spesifik hem de MBP-spesifik T hücrelerde CXCR6 ekspresyonunun GA tedavisi ile azaldığı gözlenmiştir (154). Th2 efektör hücreler ile ilişkili CCR4'ün de tedavi ile azaldığı, lenf noduna göç ile ilişkili bir kemokin reseptörü olan CCR7 ekspresyonunun ise arttığı ve ligandı olan MIP-3 β ile daha iyi migrasyon gösterdiği görülmüştür. GA'nın kemokin reseptörleri üzerine olan etkileri CD4⁺ T hücrelerde belirgin olmakla birlikte, CD8⁺ T hücrelerinin de reseptör ekspresyonunu etkileyebilmektedir. Bu bilgiler, GA'nın MS hastalarında periferde de kemokin reseptörlerinin düzenlenmesine katkıda bulunduğunu desteklemektedir.

Son yıllarda immünoloji alanındaki gelişmeler, genç erişkinlerde en sık nörolojik fonksiyon kaybına yol açan MS'de, demiyelinasyon ile birlikte nörodejeneratif sürecin de erken dönemde immünopatogeneze rol oynadığını gösteren kanıtlar sunmuştur. Bu veriler immünomodülatör etkili terapötik ajanların hastalığın erken dönemlerinden itibaren kullanılması görüşünü gündeme getirmiştir. GA, MS'te immünomodülasyon amacıyla kullanım onayı almış bir sentetik polipeptittir. GA'nın SSS'de anti-enflamatuar ve nöroprotektif etkilerini gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte, farklı myelin antijenlerinin rol oynadığının düşünüldüğü MS tiplerinde etkisini araştıran çalışmalar nispeten azdır. Bu çalışmanın amacı; farklı myelin antijenleri (MOG, MBP ve PLP) ile oluşturulan DOE'de, GA'nın kemokin ekspresyonu üzerine etkilerini incelemek ve kemokin ekspresyonu üzerinden etkili olabilecek yeni tedavi yaklaşımlarına yönelik, literatüre katkı sağlamaktır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, 8-10 haftalık dişi Wistar cinsi farelerden oluşturulan bir kontrol (K) ve 6 çalışma grubu (Ç-1, Ç-2.....Ç-6) olmak üzere toplam 7 grup oluşturuldu. Kontrol grubuna 14, çalışma gruplarına ise 20'şer adet fare alındı. Hayvanlar 5'erli gruplar halinde, yem ve su ihtiyaçlarını karşılayabilecekleri uygun kafes ortamında, oda ısısında Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi (FÜTDAM) Hayvan Laboratuvarı'nda, muhafaza edildi. Çalışmanın etik onayı, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alındı.

Birinci grup kontrol grubu (K) olarak belirlendi. İlk 3 çalışma grubu Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 olarak adlandırıldı ve gruplara sırasıyla MOG, MBP ve PLP ile DOE indüksiyonu yapıldı. Ç-4, Ç-5 ve Ç-6 gruplarına ise önce GA uygulandı ve bundan 7 gün sonra, sırasıyla MOG, MBP ve PLP ile DOE indüksiyonu yapıldı. DOE indüksiyonu literatüre uygun olarak gerçekleştirildi (155,156).

Çalışmanın ilk günü tedavi grubunu oluşturan Ç-4, Ç-5 ve Ç-6 çalışma gruplarına 10µg/kg GA (Copaxone®; Teva Pharmaceutical Industries, Ltd. Petah Tiquava, Israel) 100 µl incomplete Freund's adjuvant (IFA-Difco) ile birlikte subkutan olarak uygulandı. Uygulamanın yedinci gününde kontrol ve çalışma gruplarına 100 µl "incomplete Freund's adjuvant (IFA-Difco)", 100 µl salin ve %50 vol/vol, 5mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37RA; Difco, Detroit, MI 48232 – 7058 USA) karışımından oluşan "complete Freund's adjuvant (CFA)" ile birlikte, Ç-1 ve Ç-4 gruplarına MOG₃₅₋₅₅ (rat, mouse synthetic peptide, Sigma-aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) 200µg/fare, Ç-2 ve Ç-5 gruplarına MBP₆₈₋₈₂ (Guinea Pig Fragment 68-82, Sigma-aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) 25 µg/fare, Ç-3 ve Ç-6 gruplarına ise PLP₁₃₉₋₁₅₁ (AnaSpec, San Jose, CA) 100 µg/fare

olacak şekilde kuyruk tabanından subkutan verildi. PLP uygulanan Ç-3 ve Ç-6 çalışma gruplarına ayrıca indüksiyonun 0. ve 1. günlerinde 200 ng/fare pertussis toksin (PTX, Sigma-Aldrich) intra-peritoneal olarak uygulandı. Çalışmada uygulanan immünizasyon şeması Tablo 5’de özetlenmiştir.

Tablo 5. Hayvanların immünizasyon şeması

	K	Ç-1	Ç-2	Ç-3	Ç-4	Ç-5	Ç-6
-7. gün					IFA+GA	IFA+GA	IFA+GA
0. gün	CFA	CFA+MOG	CFA+MBP	CFA+PLP +PTX	CFA+MOG	CFA+MBP	CFA+PLP + PTX
1. gün				PTX			PTX
14. gün	Dekap	Dekap	Dekap	Dekap	Dekap	Dekap	Dekap

Ç, Çalışma grubu; IFA, incomplete Freund’s adjuvant; GA, Glatiramer Acetate; CFA, complete Freund’s adjuvant; MOG, Myelin Oligodendrosit Glikoproteini; MBP, Myelin Basic Protein; PLP, Proteolipid Protein; PTX, Pertussis toxin; Dekap, Dekapitasyon

İmmünizasyon sonrasında hayvanlar günlük olarak değerlendirildi, vücut ağırlıkları ve klinik bulguları kaydedildi. DOE semptomlarına bağlı oluşan fonksiyonel kayıpların derecesini değerlendirmek için 0–5 skalası kullanıldı (157,158).

Klinik Skorlama;

Grade 0: Klinik olarak hastalık yok

Grade 1: Kuyruk tonusunda azalma

Grade 2: Hafif monoparezi veya paraparezi

Grade 3: Parapleji

Grade 4: Kuadriparezi

Grade 5: Ölüm

Kontrol ve çalışma grubundaki hayvanlar immünizasyondan sonraki 14. günde dekapite edilerek kanları alındı. Kemokin analizi için kanlar santrifüj edilip, elde edilen serum -80 °C’de derin dondurucuda çalışıldığı güne kadar bekletildi. Kemokin analizleri RANTES (Biosource, California, USA), MIP-2 (Biosource, California, USA) ve IP-10 (R&D Systems, Minneapolis, USA) fare kitleri kullanılarak enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile, çalışma prosedürüne uygun olarak Triturus Analyzer (Spain) tam otomatik ELISA cihazı ile yapıldı.

4.1. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 15.0 paket programı kullanıldı. Veriler Ortalama $\pm$ Standart sapma olarak sunuldu. Verilerin normallik dağılımı gösterip göstermediğini saptamak için Shapiro-Wilk testi uygulandı ve bazı grupların (MIP-2 ve IP-10 değerleri) normal dağılıma uymadığı gözlemlendi. Bu nedenle gruplar arası kemokin ölçümlerinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H testi uygulandı ve gruplar arası anlamlılık olduğu gözlemlendi. Grupların ikili karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Çalışma gruplarının post-immünizasyon mortalite oranları %20 ile %65 arasında değişme gösterdi. En fazla fare kaybı PLP ile immünizasyon yapılan Ç-3 ve Ç-6 gruplarında gözlemlendi. Tüm gruplardaki fare ölümleri akut olarak gelişti ve hiçbir hayvanda ölüm öncesi klinik bulgu gözlenmedi. Tüm klinik ve laboratuvar değerlendirmeler canlı kalan hayvanlar üzerinde yapıldı. Kontrol grubuna alınan 14 hayvan da çalışmayı tamamladı.

Çalışma gruplarının ortalama hastalık başlangıçları, ortalama klinik skorları ve mortalite oranları Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Grupların DOE gelişme zamanı, klinik skor ve mortalite oranları

Grup	Ortalama hastalık başlangıcı (gün)	Ortalama klinik skoru	Mortalite
Ç-1 (MOG)	10,14±1,16	2,35±0,84	%30 (6/20)
Ç-2 (MBP)	10,73±1,03	2,20±0,86	%25 (5/20)
Ç-3 (PLP)	9,28±1,11	3,28±0,75	%65 (13/20)
Ç-4 (GA+MOG)	12,20±0,83	0,57±0,85	%30 (6/20)
Ç-5 (GA+MBP)	12,40±0,89	0,43±0,72	%20 (4/20)
Ç-6 (GA+PLP)	9,75±0,95	1,14±1,21	%65 (13/20)

MOG ile immünize birinci çalışma grubundaki (Ç-1) hayvanlardan 3’ü immünizasyon öncesinde, 3’ü ise post-immünizasyon ilk üç gün içerisinde kaybedildi. Ç-1 çalışma grubundan 14 hayvan çalışmayı tamamladı. MBP ile immünize ikinci çalışma grubundaki (Ç-2) hayvanlardan 2’si immünizasyon öncesi, 3’ü de post-immünizasyon 4. ve 5. günlerde kaybedildi. Ç-2 çalışma

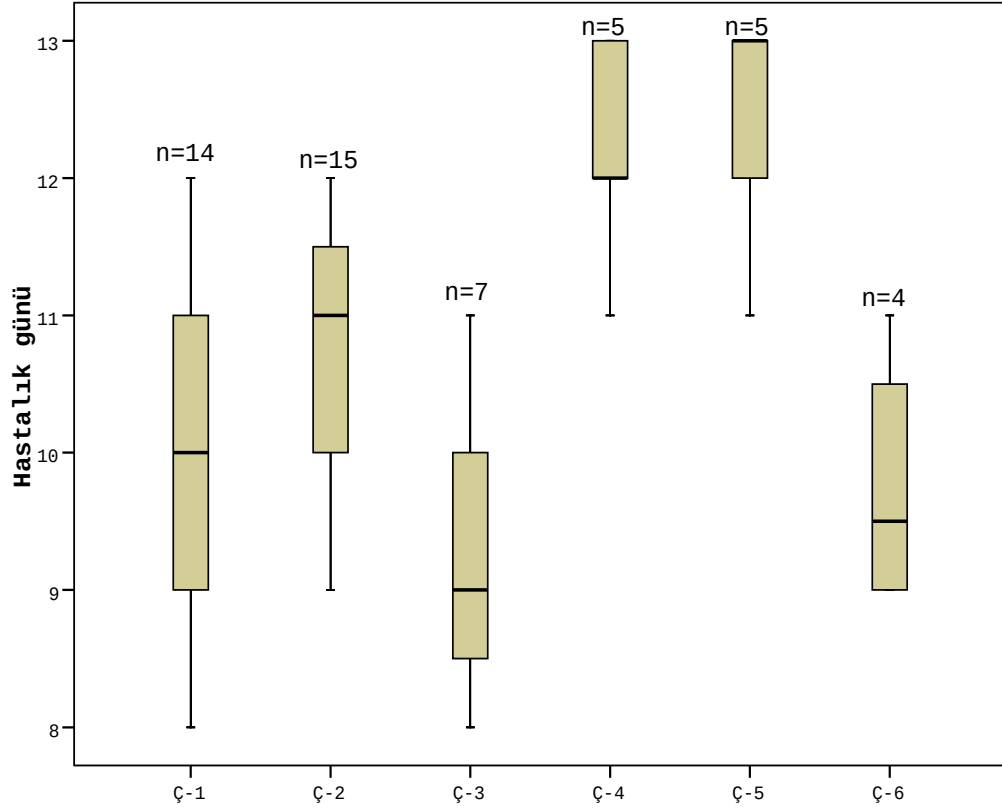
grubundaki deneklerden 15'i çalışmayı tamamladı. PLP ile immünize edilen hayvanların (Ç-3) 13'ü, post-immünizasyon 2 – 6. günler arasında kaybedildi. Çalışmayı sadece 7 fare tamamlayabildi. Kaybedilen hayvanlarda ölüm akut olarak gelişmiş olup, hiçbir hayvanda ölüm öncesi yapılan son muayenede hastalık belirtisi gözlenmemişti.

Tedavi gruplarındaki hayvan ölümleri de benzer şekilde gözlemlendi. GA+MOG uygulanan Ç-4 grubunda, 1'i GA öncesi, 2'si GA sonrası, 3'ü de MOG immünizasyonu sonrası 2. ve 3. günlerde olmak üzere toplam 6 hayvan öldü, çalışmayı 14 hayvan tamamladı. GA+MBP uygulanan Ç-5 grubunda, 2'si GA sonrası ve 2'si MBP uygulamasından sonraki 3. ve 5. günlerde olmak üzere toplam 4 hayvan kaybedildi. 16 fare çalışmayı tamamladı. Altıncı çalışma grubunda ise 13 hayvan kaybedildi, bunlardan 1'i GA uygulaması sonrası 2. günde, 12'si ise PLP uygulaması sonrasındaki 1. ve 4. günler arasında öldü. Çalışmayı 7 hayvan tamamladı. Tedavi grubunda kaybedilen hayvanların da son muayenelerinde herhangi bir hastalık semptomu gözlenmedi.

Çalışmayı tamamlayan Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 gruplarındaki hayvanların tümünde hastalık semptomları gözlemlendi. Ortalama hastalık gelişme günleri; Ç-1'de $10,14 \pm 1,16$ gün olup minimum (min) 8. ve maksimum (max) 12. günlerde hastalık geliştiği gözlemlendi. Ortalama hastalık gelişimi Ç-2'de $10,73 \pm 1,03$ (min 9. ve max 12. gün) ve Ç-3'de ise $9,28 \pm 1,11$ (min 8. ve max 11. gün) idi (Şekil 8).

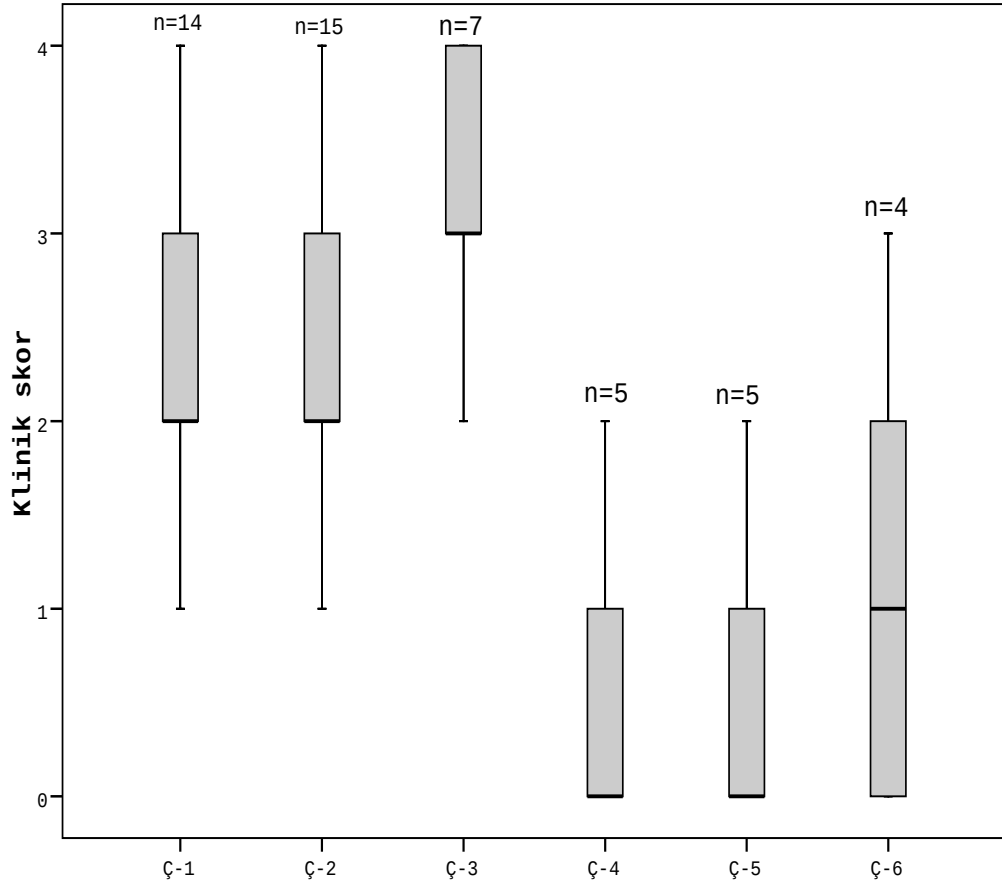
Tedavi uygulanan gruplardan Ç-4'de 5 (%35,7), Ç-5'de 5 (%31,2), Ç-6'da ise 4 (%57,1) hayvanda hastalık geliştiği gözlemlendi. Ortalama hastalık gelişme günleri Ç-4'de $12,20 \pm 0,83$ (minimum 11. ve maksimum 13. gün); Ç-5'de

12,40±0,89 (minimum 11. ve maksimum 13. gün) ve Ç-6'da ise 9,75±0,95 (minimum 9. ve maksimum 11. gün) idi (Şekil 8).



Şekil 8. Çalışma gruplarının hastalık oluşma günlerine göre dağılımı (Ç-1, MOG; Ç-2, MBP; Ç-3, PLP; Ç-4, GA+MOG; Ç-5, GA+MBP; Ç-6, GA+PLP uygulanan çalışma grupları).

Çalışma gruplarının ortalama hastalık skorları, maksimum hastalık düzeyi olarak kabul edilen dekapitasyon günü değerlendirildi. Ortalama hastalık skorları Ç-1'de 2,35±0,84 (min 1, max 4); Ç-2'de 2,20±0,86 (min 1, max 4); Ç-3'de 3,28±0,75 (min 2, max 4) olarak gözlemlendi. Tedavi gruplarında hastalık gelişimi gözlenen hayvanlarda ortalama skor ve maksimum hastalık skorları ise; Ç-4'de 0,57±0,85 (max 2); Ç-5'de 0,43±0,72 (max 2) ve Ç-6'da 1,14±1,21 (max 3) idi (Şekil 9).



Şekil 9. Çalışma gruplarının klinik skorlarına göre dağılımı (Ç-1, MOG; Ç-2, MBP; Ç-3, PLP; Ç-4, GA+MOG; Ç-5, GA+MBP; Ç-6, GA+PLP uygulanan çalışma grupları).

Kontrol ve çalışma gruplarının RANTES, MIP-2 ve IP-10 değerleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

Kontrol grubunun RANTES değeri $314,71 \pm 81,45$ pg/mL olup, MOG ile DOE geliştirilen Ç-1 grubunda bu değerin $370,42 \pm 44,55$ pg/mL düzeylerine yükseldiği ve iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,013$). MBP ile immünize Ç-2 grubunun ortalama RANTES değeri $376,93 \pm 62,12$ pg/mL olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark $p=0,019$ düzeyinde anlamlılık göstermiştir. PLP grubunda (Ç-3)

ise RANTES düzeyi ($567,85 \pm 205,26$ pg/mL) hem kontrol hem de Ç-1 ve Ç-2 gruplarına göre daha fazla artış göstermiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık oranlarında artış görülmüştür ($p=0,004$) (Tablo 7, 8, 9, 10, Şekil 10).

Tablo 7. Çalışma ve kontrol gruplarının ortalama RANTES, MIP-2 ve IP-10 değerleri

Grup	RANTES (CCL5)	MIP-2 (CXCL-2)	IP-10 (CXCL10)
KONTROL	$314,71 \pm 81,45$ (183,00 - 522,00)	$49,10 \pm 22,14$ (25,10 - 97,10)	$71,12 \pm 7,30$ (60,00 - 84,80)
Ç-1 (MOG)	$370,42 \pm 44,55$ (307,00 - 438,00)	$60,56 \pm 12,50$ (42,70 - 90,30)	$78,85 \pm 6,89$ (64,40 - 89,10)
Ç-2 (MBP)	$376,93 \pm 62,12$ (301,00 - 507,00)	$58,59 \pm 13,43$ (34,90 - 93,60)	$78,96 \pm 5,76$ (71,60 - 89,80)
Ç-3 (PLP)	$567,85 \pm 205,26$ (321,00 - 866,00)	$141,61 \pm 69,65$ (70,00 - 260,00)	$80,87 \pm 2,54$ (78,20 - 85,40)
Ç-4 (GA+MOG)	$298,64 \pm 50,45$ (219,00 - 393,00)	$30,20 \pm 6,11$ (19,70 - 39,30)	$64,66 \pm 3,98$ (60,00 - 71,60)
Ç-5 (GA+MBP)	$258,37 \pm 39,56$ (204,00 - 349,00)	$38,40 \pm 13,51$ (22,40 - 61,80)	$66,03 \pm 3,82$ (60,90 - 77,50)
Ç-6 (GA+PLP)	$292,85 \pm 67,22$ (225,00 - 416,00)	$32,35 \pm 10,26$ (20,40 - 51,20)	$72,54 \pm 2,51$ (70,20 - 77,10)

(ort $\pm$ sd, pg/mL, parantez içleri maksimum ve minimum değerleri göstermektedir)

MIP-2 düzeyi kontrol grubunda $49,10 \pm 22,14$ pg/mL olup, çalışma gruplarında artarak Ç-1’de $60,56 \pm 12,50$ pg/mL’ye, Ç-2’de $58,59 \pm 13,43$ pg/mL’ye ve Ç-3’de ise $141,61 \pm 69,65$ pg/mL ile en yüksek değere ulaşmıştır. Kontrol ve Ç-1, Ç-2, Ç-3 gruplarının MIP-2 değerlerinin karşılaştırılmasında sırasıyla; $p=0,011$,

p=0,018 ve p=0,001 düzeylerinde anlamlı fark gözlenmiştir (Tablo 7, 8, 9, 10, Şekil 11).

Tablo 8. MOG ile oluşturulan DOE’de GA’nın, RANTES, MIP-2 ve IP-10 ekspresyonu üzerine etkisi

Grup	Kontrol	Ç-1	Ç-4
RANTES	314,71± 81,45	370,42±44,55*	298,64±50,45†
MIP-2	49,10±22,14	60,56±12,50*	30,20±6,11†
IP-10	71,12±7,30	78,85±6,89*	64,66±3,98†

*, Kontrol ve Ç-1, p<0,05; †, Ç-1 ve Ç-4, p<0,01

Kontrol grubunda 71,12±7,30 pg/mL olan IP-10 değerinin, Ç-1’de 78,85±6,89 pg/mL, Ç-2’de 78,96±5,76 pg/mL ve Ç-3’de 80,87±2,54 pg/mL olduğu gözlenmiştir. Üç çalışma grubunun da kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, Ç-1’de p=0,012; Ç-2’de p=0,005; Ç-3’de p=0,004 düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir (Tablo 7, 8, 9, 10, Şekil 12).

Glatiramer asetat’ın MOG, MBP ve PLP antijenleri ile oluşturulan DOE modellerinde kemokin ekspresyonu üzerine etkilerini incelemek için, Ç-1 ve Ç-4, Ç-2 ve Ç-5 ile Ç-3 ve Ç-6 gruplarının RANTES, MIP-2 ve IP-10 değerleri karşılaştırıldı.

MOG ile immünize grupta (Ç-1) RANTES değeri 370,42±44,55 pg/mL iken, MOG immünizasyonu öncesi GA verilen Ç-4 grubunda bu değer 298,64±50,45 pg/mL olduğu gözlemlendi. İki grup arasındaki fark p=0,001 düzeyinde olup, istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MIP-2 değeri Ç-1 grubunda 60,56±12,50 pg/mL, Ç-4’de ise 30,20±6,11 pg/mL; IP-10 değerleri ise Ç-1’de 78,85±6,89 pg/mL, Ç-4’de 64,66±3,98 pg/mL olarak bulundu. Her iki kemokin

için de Ç-1 ve Ç-4 grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyi $p=0,000$ idi (Tablo 8, Şekil 10, 11, 12).

Tablo 9. MBP ile oluşturulan DOE’de GA’nın RANTES, MIP-2 ve IP-10 ekspresyonu üzerine etkisi

Grup	Kontrol	Ç-2	Ç-5
RANTES	314,71± 81,45	376,93±62,12*	258,37±39,56†
MIP-2	49,10±22,14	58,59±13,43*	38,40±13,51†
IP-10	71,12±7,30	78,96±5,76‡	66,03±3,82†

*, Kontrol ve Ç-2, $p<0,05$; ‡, Kontrol ve Ç-2, $p<0,01$; †, Ç-2 ve Ç-5, $p<0,005$

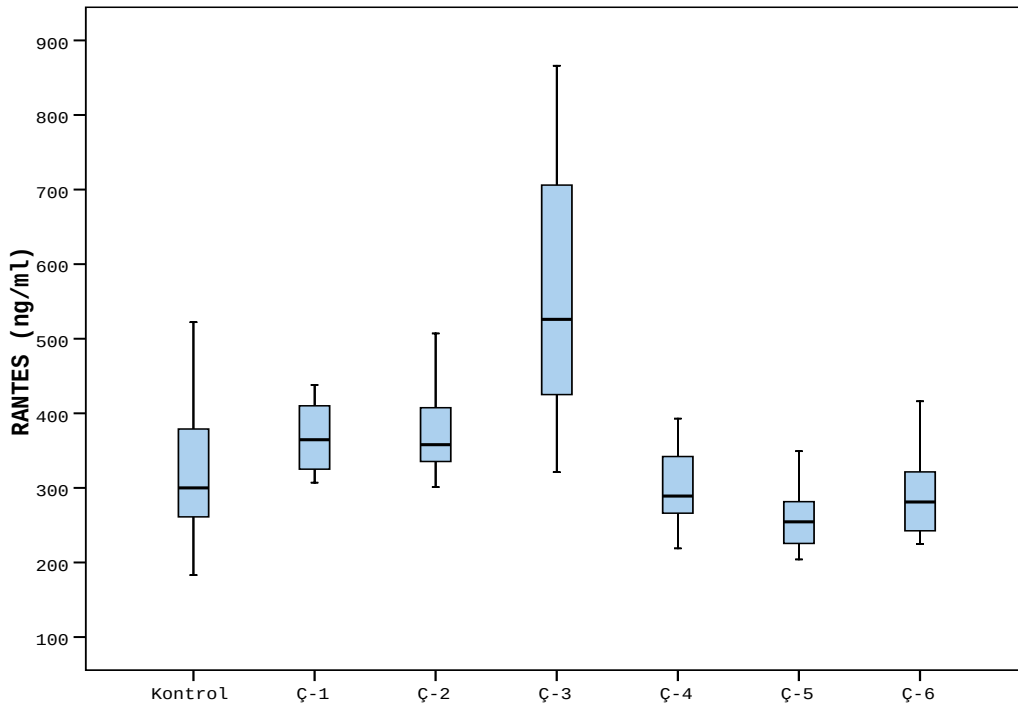
MBP ile DOE oluşturulan Ç-2 grubu ile immünizasyon öncesi GA uygulanan Ç-5 grubunun sırasıyla RANTES düzeyleri 376,93±62,12 pg/mL ve 258,37±39,56 pg/mL; MIP-2 düzeyleri 58,59±13,43 pg/mL ve 38,40±13,51 pg/mL; IP-10 düzeyleri ise 78,96±5,76 pg/mL ve 66,03±3,82 pg/mL olup, her üç kemokin değerinde tedavi grubunda gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı idi (RANTES ve IP-10 için $p=0,000$; MIP-2 için $p=0,002$) (Tablo 9, Şekil 10, 11, 12).

Tablo 10. PLP ile oluşturulan DOE’de GA’nın, RANTES, MIP-2 ve IP-10 ekspresyonu üzerine etkisi

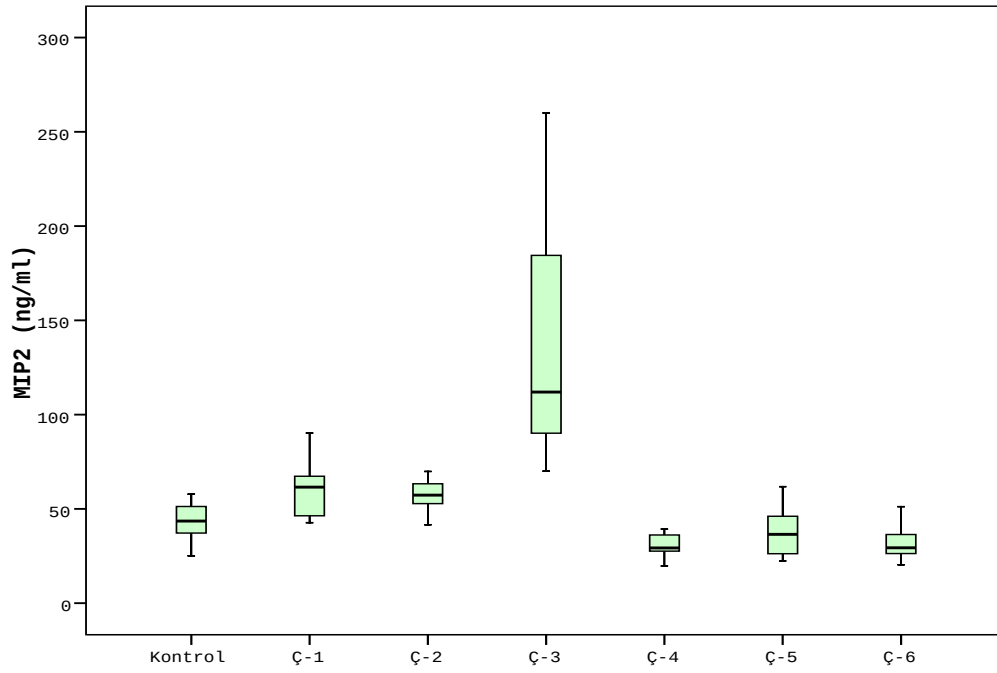
Grup	Kontrol	Ç-3	Ç-6
RANTES	314,71± 81,45	567,85±205,26*	292,85±67,22†
MIP-2	49,10±22,14	141,61±69,65*	32,35±10,26†
IP-10	71,12±7,30	80,87±2,54*	72,54±2,51†

*, Kontrol ve Ç-3, $p<0,005$; †, Ç-3 ve Ç-6, $p<0,05$

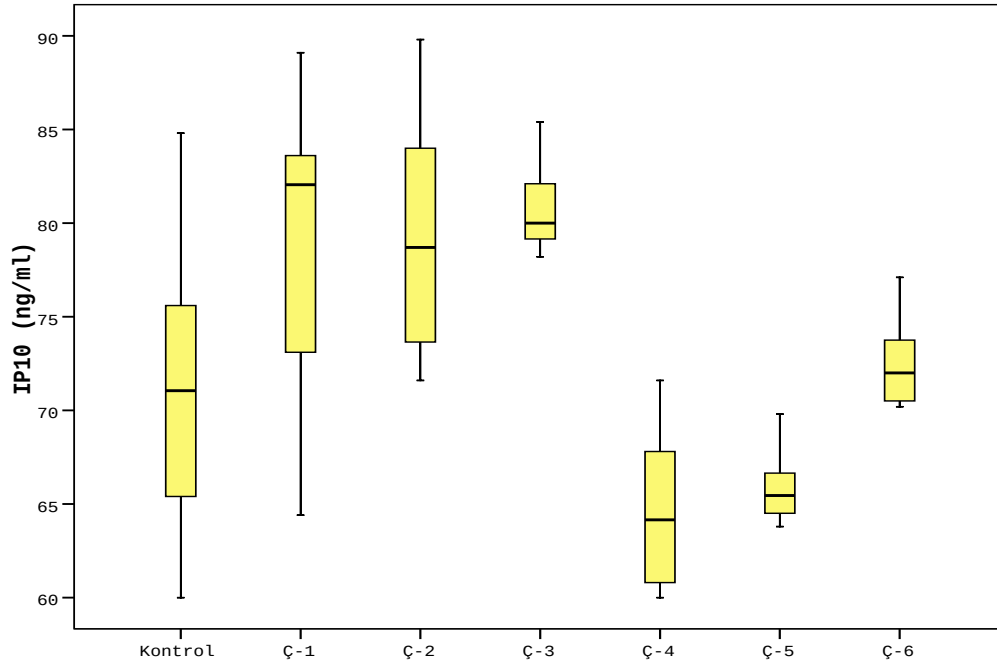
DOE immünizasyonu için PLP uygulanan grupta (Ç-3) kontrol grubuna göre kemokin ekspresyonunda gözlenen aşırı artışın, GA uygulandığında (Ç-6) kontrol değerleri düzeyine gerilediği gözlemlendi. Ç-3 grubunda $567,85 \pm 205,26$ pg/mL olan RANTES düzeyi, Ç-6'da $292,85 \pm 67,22$ pg/mL olup, iki grup arasındaki fark anlamlı idi ($p=0,006$). MIP-2 düzeyi Ç-3'de $141,61 \pm 69,65$ pg/mL, Ç-6'da $32,35 \pm 10,26$ pg/mL ($p=0,002$); IP-10 ise Ç-3'de $80,87 \pm 2,54$ pg/mL, Ç-6'da $72,54 \pm 2,51$ pg/mL ($p=0,002$) olup, gruplar arası fark anlamlı düzeye ulaştı (Tablo 10, Şekil 10, 11, 12).



Şekil 10. Çalışma ve kontrol gruplarının RANTES değerlerine göre dağılımı. (Ç-1, MOG; Ç-2, MBP; Ç-3, PLP; Ç-4, GA+MOG; Ç-5, GA+MBP; Ç-6, GA+PLP uygulanan çalışma grupları)



Şekil 11. Çalışma ve kontrol gruplarının MIP-2 değerlerine göre dağılımı. (Ç-1, MOG; Ç-2, MBP; Ç-3, PLP; Ç-4, GA+MOG; Ç-5, GA+MBP; Ç-6, GA+PLP uygulanan çalışma grupları)



Şekil 12. Çalışma ve kontrol gruplarının IP-10 değerlerine göre dağılımı. (Ç-1, MOG; Ç-2, MBP; Ç-3, PLP; Ç-4, GA+MOG; Ç-5, GA+MBP; Ç-6, GA+PLP uygulanan çalışma grupları)

6. TARTIŞMA

Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit, SSS'nin CD4⁺ Th1 hücre-aracılı enflamatuvar demiyelinizan bir hastalığı olup, insanda MS patogenezi ile ilgili mekanizmaları çalışmak için kullanılan bir modeldir (159,160). DOE farelerde farklı miyelin antijenleri kullanılarak oluşturulabilmektedir. Ayrıca antijen ile uyarılmış T hücrelerin adoptif transferi yoluyla da normal farelere transfer edilebilir (161,162). Aktive T hücrelerin SSS'ye girişinde doku adezyon molekülleri ile kemokinler önemli rol oynamaktadır (162-165).

Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit'in özellikle kronik relapsing seyri, RR-MS kliniği ile benzerlik gösterir. Erken dönemdeki aktif fazda hem DOE hem de MS'de SSS'de yaygın perivasküler enflamatuvar birikimler görülür. Bu enflamatuvar bölgelerin oluşum mekanizmaları halen araştırılmaktadır. Bu süreçte kemoatraktan sitokinler olan kemokinlerin önemli rol oynadıkları yönünde ciddi kanıtlar vardır (108,166). Kemokin ekspresyonu hastalığın klinik ve histolojik bulgularının ortaya çıkmasını takiben oluşmaktadır (168). MS'in aktif fazı süresince hem TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-12 gibi Th1 sitokin düzeyleri hem de CC ve CXC kemokin ailesi üyelerinin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (18,151,169-172). Deneysel çalışmalarda, otoimmün enflamasyon sırasında kemokin üretiminin, proenflamatuvar sitokinler tarafından düzenlendiği ve immün demiyelinasyonda önemli katkıları olduğu gösterilmiştir (173–177). Yine çok sayıda klinik çalışmada, MS hastalarının kan, beyin omurilik sıvısı ve beyin dokusundaki lezyonlarında kemokinlerden özellikle MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, RANTES/CCL5 ve IP-10/CXCL10'un önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (178).

Multiple Skleroz progresif demiyelinasyon ve akson kaybına bağlı özürlölük oluşturan bir SSS hastalığı olarak kabul edildiğinden, son yıllarda immünmodölator ajanların tedavide kullanımı ön plana çıkmıştır. Günümüzde bu amaçla kullanılan ajanlardan birisi olan GA ile yapılan in vitro ve klinik çalışmalar, bu sentetik polipeptitin MS hastalık seyrinde relaps ve özürlölük oranları ile birlikte MRG'de lezyon yükünü azalttığını göstermektedir (23,57,179–183). MS'deki etki mekanizmaları ve immün parametreler üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalara rağmen, halen GA'nın sitokin ve kemokin ekspresyonu üzerine olan etkileri ile ilgili bilgiler oldukça azdır (184).

Glatiramer asetat'ın MS'te kullanımı ile ilgili çok sayıda klinik çok-merkezli çalışma vardır. Bornstein ve ark. (185) 1982'de yaptığı çalışmada subkutan (SC) 20 mg kullanımının güvenli olduğunu ve iyi tolere edildiğini göstermiştir. Yine aynı yazarların 1987 yılında yaptığı çift-kör, plasebo kontrollü çalışmada ise, GA'nın RR-MS'li hastalarda relaps oranlarını geriletteğini, aynı zamanda özürlölük skorlarında ciddi düzeylerde gerileme oluşturduğunu bildirmiştir (182). Bu alışma aynı zamanda GA'nın hastalığın erken döneminde başlanması ve uzun süre kullanımı ile daha iyi klinik sonuçlar alınacağı görüşünü de desteklemektedir. Bu bulgular yeni çalışmaların yapılması konusunda önemli bir kaynak olarak kabul görmüştür.

90'lı yılların başında Jhonson ve ark. (23) EDSS skoru 0 ile 5 arasında değişen RR-MS'li, 2 yıl süre ile 20 mg (SC) GA kullanan hastaları plasebo grubu ile karşılaştırmış ve yıllık relaps oranlarında %29 azalma olduğunu, ilaç bırakma oranları açısından ise hastalar ile plasebo grubu arasında fark olmadığını bildirmişlerdir.

Yıllık relaps oranlarındaki azalma farklı çalışmalarda birbirine yakın sonuçlar göstermiştir. Bu oranlar %32, %21 ve %33 şeklinde değişiklik göstermektedir (57,181,186). Tedavi değerlendirme çalışmalarında daha uzun süreli sonuçlar için araştırmalar devam etmektedir.

Magnetik Resonans Görüntüleme’de tespit edilen lezyonlara GA’nın etkisini inceleyen çalışmalarda, kontrast tutan lezyonların zaman içerisinde azaldığı gösterilmiştir (186). Açık-etiketli bir çalışmada ise, kontrast tutulumu ile birlikte, beyin atrofisi ve T2 / T1 lezyon volümlerinde de olumlu değişiklikler olduğu bildirilmiştir (187). Bu çalışmalar halen devam etmekte ve periyodik olarak sonuçlar yayımlanmaktadır.

Glatiramer asetat’ın hastalık aktivitesi üzerine olan etkilerinin MRG ölçümleri ile belirlendiği en geniş çalışma Avrupa/Kanada çok merkezli, çift-kör, plasebo-kontrollü çalışmadır (57). RR-MS’li hastalarda, 9 aylık çalışma sonucunda, kontrast tutan total lezyon sayısında kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir. Aynı zamanda lezyon volümleri ve yeni gelişen T2 lezyon sayısında da anlamlı azalma olduğu görülmüştür. İlacın MRG üzerine olan etkilerinin tedavinin altıncı ayından sonra belirgin hale geldiği ve zaman içerisinde arttığı aynı zamanda doku hasarının tedavi olan hastalarda daha az oluşarak “kara delik” olarak adlandırılan ve geri dönüşümsüz aksonal kaybın göstergesi olan lezyonların gelişme oranlarını azalttığı bildirilmiştir (57,63).

Glatiramer asetat’ın MS atak profilaksisinde gösterdiği anlamlı klinik sonuçlar, özellikle immün sistem üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacına yönelik deneysel çalışmaların yapılmasına öncülük etmiştir. Jee ve ark. C57BL/6 farelerde MOG₃₅₋₅₅ ile oluşturduğu DOE modelinde, 8 hayvandan 7’sinde orta

veya şiddetli klinik tablo gelişmiştir (ortalama klinik skor: $2,5 \pm 0,34$) (155). GA ile tedavi edilmeyen grupta hastalık başlangıcı ortalama 16. günde gözlenmiştir. Tedavi grubundaki 9 hayvandan 3'ünde klinik bulgu ortaya çıkmış ancak daha hafif seyretmiştir (ortalama klinik skor: $1,22 \pm 0,31$). Bizim MOG₃₅₋₅₅ grubumuzda sağ kalan hayvanların tümünde hastalık gözlenmiş, tedavi grubunda ise 14 hayvanın 5'inde hastalık gözlenmiştir. Tedavisiz grubun ortalama klinik skoru $2,35 \pm 0,84$ iken GA verilen grubun ortalama klinik skoru $0,57 \pm 0,85$ olarak ortaya çıkmıştır. Aynı çalışmada GA'nın etkisinin oluşmasında Th2 hücrelerin katkısını araştırmak amacıyla IL-4 ve IL-10 eksik fare modelleri kullanılmıştır. GA verilen Th2 sitokin-eksik farelerde DOE'nin hem oluşması hem de şiddeti kontrollerden daha düşük oran göstermiştir. Bu bulgular, GA'nın DOE'deki koruyucu ve terapötik etkilerinin Th2 sitokinlerden bağımsız olduğu, IL-4 ve/veya IL-10 sekrete eden T hücrelerin yokluğunda GA-ilişkili T hücrelerin myelin-spesifik hücreleri kontrol edebildiği ve otoreaktif etkilerini baskılayabildiği şeklinde yorumlanmıştır (155).

Glatiramer asetat'ın DOE ve MS'deki etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. DOE'deki baskılayıcı etkisi kullanılan hayvan türünden, hastalığın ve kullanılan indükleyici antijenin tipinden bağımsızdır (29). Muhtemel mekanizmalardan birisi, GA'nın farklı tipteki myelin antijenlerinin T hücreye sunulmasını baskılamasıdır (33,39,41). GA'nın aminoasit yapısının MBP ile benzerlik göstermesi, çapraz-reaktif immün mekanizmaların tedavi edici etkiden sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (33,34). Ancak daha sonra yapılan çok sayıda çalışmada, GA ve MBP'nin çapraz-reaksiyondan ziyade inhibitör etki oluşturduğu gözlenmiştir (35,36). Ayrıca GA, sadece MBP-spesifik T hücreleri

değil, diğer T hücre serilerini de baskılamakta, MOG ve PLP ile oluşturulan DOE modellerinde de etkisini göstermektedir (40,188). Bizim çalışmamızda DOE gelişimi için MOG, MBP ve PLP gibi farklı miyelin antijenleri kullanılmış ve her üç antijenik grupta da GA'nın terapötik etkisinin benzer düzeylerde ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, GA-reaktif T hücrelerin SSS'ye girerek anti-enflamatuar sitokin salınımını artırdığı ve bunu miyelin antijeninin tipinden bağımsız olarak yaptığı görüşünü destekleyen sonuçlar bildirmiştir (36,49,189,190). GA ile tedavinin miyelin-reaktif T hücrelerde anerji oluşturması ve MRG'de yeni kontrast tutan lezyon sayısında azalmaya yol açması, etkisinin sistemik olduğunu desteklemektedir (57).

MOG ile optik nörit oluşturulan ratlarda, MOG indüksiyonu ile birlikte GA verildiğinde retinal ganglion hücrelerinde ve optik sinirde enflamasyondan bağımsız olarak nöroprotektif etkinin varlığı bildirilmiştir. Enflamatuar patolojinin oluşumundan sonraki 21-34 gün süresince GA uygulandığında, demiyelinasyonun önlenmesi yanında hasarlı aksonun remiyelinasyonuna da katkı sağladığı gösterilmiştir (43).

Glatiramer asetat-spesifik T hücrelerin bir grubunun stimülasyonu ile IL-2, IL-5, IFN- γ gibi pro-enflamatuar sitokin sekresyonu olurken, diğer grup tarafından ise IL-4, IL-10 ve TGF- β gibi anti-enflamatuar sitokin sekresyonu oluşmaktadır. GA'nın en önemli etkilerinden birisi bu GA-spesifik T hücrelerin Th1'den Th2 şifine yol açmasıdır (43,51). Tedavinin devamlılığı ile bu hücreler kronik olarak aktif hale geçmekte ve KBB'ni aşarak SSS'deki enflamatuar hasar bölgesine göçmektedir. SSS'ye giren hücreler artık GA ile aktive olamazlar,

Çünkü GA SSS'ye giremez ancak, SSS'deki myelin yıkım ürünleri gibi lokal antijenler tarafından reaktif edilirler (43).

Glatiramer Asetat'ın terapötik etki mekanizmaları arasında, GA-spesifik T hücrelerin BDNF düzeyini artırarak, SSS'deki onarım sürecine katkı sağlaması da bulunmaktadır. MS'li hastalarda enflamasyon bölgesinde BDNF ve reseptörü TrkB ile yakın ilişkisi gösterilmiştir (43,191). MS hastalarında GA'nın CD4⁺CD25⁺ regülatuar T hücre fonksiyonlarını da düzelttiği bildirilmiştir (192–194). Son yıllarda GA ile tedavi edilen MS hastalarının BOS'larında GA-reaktif Th2 hücrelerin BDNF salgıladığı gösterilmiştir (195,196).

Direkt olarak dendritik hücreleri etkileyen GA, enflamatuvar medyatör salınımını da inhibe eder. Bu medyatörler arasında, T hücreler için çok önemli bir polarizasyon faktörü olan ve lipopolisakkarid (LPS) ile CD40 ligandı gibi nonspesifik stimulusların varlığında Th1 polarizasyonunu tetikleyen IL-12p70 de bulunmaktadır. GA, IL-12p70 blokajı yolu ile bu polarizasyonu önlemektedir (43).

Glatiramer asetat'ın MS'deki etki mekanizmalarından birisinin GA-spesifik Th2 hücre oluşması kabul edildiğinden ve bu hücrelerin in vivo oluşumu için bir sreye ihtiyaç duyulacağından, tedavi grubundaki farelerin GA enjeksiyonu, literatürdeki benzer çalışmalar göz önünde tutularak immünizasyondan yaklaşık bir hafta kadar önce ve tek doz olarak yapılmıştır (54,156,197–200). GA, 100 l IFA içerisinde verildiğinde, oluşan bu kombinasyon immün yanıt oluşumuna katkı sağlayarak, günlük GA uygulanma ihtiyaını ortadan kaldırmaktadır. Yapılan alışmalarda GA'nın DOE gelişimini önlemek için ortalama dozunun 250 g/fare yani ortalama 10 g/kg olduğunu

göstermiştir (156). Bu çalışmada da GA dozu, literatüre uygun olarak 10 µg/kg olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda, MS'in immüno-patogenezindeki heterojen özellikler nedeniyle, farklı myelin antijenleri ile oluşturulan DOE modellerinde GA'nın CC ve CXC kemokin ekspresyonu üzerine baskılayıcı etkileri olduğu görülmüştür (Şekil 10, 11, 12). MOG ve MBP ile DOE oluşturulan hayvanlarda kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren RANTES, MIP-2 ve IP-10 düzeyleri, GA verilen grupta anlamlı derecede azalmış, hatta kontrol düzeylerinin de altına inmiştir (Tablo 8, 9). Aynı zamanda GA verilen hayvanlarda hastalık görülme oranı da azalmış, oluşan hastalık skorları da ilaç almayan gruba oranla daha düşük gözlenmiştir (Tablo 6).

PLP ile DOE oluşturulan grupta, özellikle MIP-2 ve RANTES'de olmak üzere incelenen kemokin düzeylerinin, kontrol ile karşılaştırıldığında, diğer gruplara göre çok daha yüksek oranlarda artış gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 10). Yine, PLP uygulanan çalışma gruplarında hayvan ölüm oranı da diğer gruplardan daha fazla olmuştur. Kemokin ekspresyonu ve ölüm oranlarındaki artış, PLP immunizasyonu ile birlikte hayvanlara uygulanmış olan pertussis toksinine, kemokin aktivasyonunda rol alan G-proteinin aşırı duyarlılığı ile açıklanabilir (87,88). GA ile birlikte PLP uygulanması, RANTES, MIP-2 ve IP-10 düzeylerinde kontrol düzeylerine yakın azalmaya neden olmuştur (Tablo 10). MS tedavisinde kullanılan diğer bir immünmodülatör ajan olan interferon-beta ile yapılan çalışmalarda da, pro-enflamatuar sitokin ve kemokin ekspresyonunun tedavi ile azaldığı gösterilmiştir (151,201–204).

Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit’de birçok kemokinin ekspresyonunda artış olduğu bildirilmektedir. Glabinski ve ark. (205) PLP immünizasyonu ile oluşturdıkları kronik relapsing DOE modelinde, ilk atak sırasında spinal kordda RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 ve MIP-1 β /CCL4 ekspresyonunun arttığını ve bu CCL grubu kemokinlerin remisyon ve ikinci atak süresince de yüksek kaldığını göstermişlerdir. Yine ilk atak sırasında MIP-1 α /CCL3, MIP-2/CXCL2 ve T cell activation-3 (TCA-3)/CCL1 düzeyleri de kontrollerden yüksek seyretmiştir. Ancak MIP-2/CXCL2 ile TCA-3/CCL1 düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Kemokin ekspresyonları kinetik olarak incelendiğinde; TCA-3/CCL1, MCP-1/CCL2, MIP-1 β /CCL4 ve MIP-2/CXCL2 ilk atağın 2. gününde pik yaparken, RANTES/CCL5, 1. ve 4. günlerde olmak üzere iki pik değer göstermiştir. Kemokin düzeyleri 7. günde kontrol değerleri düzeyine inmiştir. Akut fazda kemokin düzeylerindeki bu artış yazarlar tarafından, bu kemokinlerin otoimmün SSS hastalıklarının patogenezinde rol almaları ile açıklanmıştır (205). Bizim çalışmamızda PLP uygulanan grupta en belirgin artış gösteren kemokin MIP-2 olup, en az artış IP-10’da gözlenmiştir. GA+PLP verilen farelerde her iki kemokin de kontrol grubu düzeyinde ölçülmüştür.

Akut fazda, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3 ve MIP-1 β /CCL4’ün yüksek düzeyde eksprese olduğunu gösteren benzer çalışmalar da vardır (107,206-210). Relaps döneminde de MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, MIP-1 α /CCL3 ve GRO- α /CXCL1 kemokin düzeyleri kontrollere göre yüksek gözlenmiştir (211). DOE’nin hem akut hem de kronik relapsing formlarında benzer sonuçları gösteren bu çalışmalarla birlikte, anti-MIP-1 α /CCL3 ve anti-MCP-1/CCL2 antikorlarının DOE’de iyileşme sağladığının gösterilmesi,

kemokinlerin otoimmün SSS hastalıklarının patogeneğinde rol aldıkları görüşünü güçlendirmektedir (213,214).

Santral sinir sisteminde kemokin artışına öncülük eden mekanizmalar halen araştırılmaktadır. Kemokinlerin DOE'de SSS parankimine enflamatuar hücre göçünü artırdığı ancak başlatmadığı bildirilmiştir (168). Bu, DOE'nin erken dönemindeki kemokin artışının, diğer enflamasyon mediatörleri ile tetiklendiği görüşünü desteklemektedir. Bu erken mediatörler de muhtemelen pro-enflamatuar sitokinlerdir. SSS'nin kültüre edilen hücrelerinde, pro-enflamatuar sitokin stimülasyonunu takiben kemokin üretiminin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Mikroglialar IL-1 β , TNF- α veya LPS'ler ile stimüle edildiklerinde MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3 ve MIP-1 β /CCL4 ekspresyonuna başlamaktadır (214). IFN- γ ile kültüre edilen astrositler MCP-1/CCL2 eksprese ederler (215). Beyin endotel hücreleri ise TNF- α uyarısı ile MCP-1/CCL2 üretmeye başlarlar (216).

Nitekim kronik relapsing DOE modelinde ilk atak sırasında SSS'de kemokin pikinden bir gün önce TNF- β ve lenfotoksin- β (LT- β)'nin maksimum düzeyde ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (205). Bu gözlemler bazı enflamatuar sitokinlerin SSS'de kemokin üretimini stimüle ederek enflamatuar hücrelerin kandan beyin parankimine göçünü başlattığı görüşünü desteklemektedir.

CC kemokin ligandlarından CCL3, CCL4 ve CCL5 ile kemokin reseptörlerinden CCR2, CCR3 ve CCR5'in MS'den düzelme döneminde SSS dokusunda yükseldiğini gösteren çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda ilginç olarak, BOS'da MCP-1/CCL2 ve IP-10/CXCL10 düzeylerinde zıt değişiklikler gözlenmiştir. CCL2 düzeyi kontrollerden daha düşük bulunurken, IP-10'un akut MS'te belirgin olarak arttığı görülmüştür. IP-10'un, tip-1 sitokin olan ve MS ile

DOE progresyonundan sorumlu IFN- γ tarafından artırılan bir kemokin olduğu bilinmektedir (17,151-153).

CCL3, CCL4 ve CCL5'in reseptörlerinden biri olan CCR5, SSS'ye T hücre girişinde anahtar rol oynayan bir reseptör olup, MS'de arttığı görülmüştür (153). İnterferon- β 'nın MS'deki terapötik etkilerinden birisinin CCR5 aktivitesini azaltma yolu ile olabileceğı düşünölmektedir (204,217).

RANTES, CC (beta) kemokin ailesinden pro-enflamatuar kemokin olup, monosit, lenfosit, glial hücre, endotelyal hücreler tarafından eksprese edilir (218–220). Son yıllarda TNF- α stimölasyonu ile astrositlerden de salındığı gösterilmiştir (221,222). Bu veri, TNF- α 'nın MS lezyonlarında bulunan aktive monosit ve makrofajlar tarafından da üretilmesi nedeniyle oldukça önemlidir (223). RANTES; lenfosit, monosit ve makrofajlar için güçlü kemoatraktan etkiye sahip olup, MS'li beyin dokusunda bulunduğı gösterilmiştir (219,220,224). RANTES, insan otoimmün demiyelinasyonunda enflamatuar yanıtın düzenlenmesinde kompleks bir role sahiptir. Glial hücreler RANTES oluşumunda temel kaynağı oluştururlar (221,225,226).

Li ve ark. (227), TNF- α ve GA'nın insan astrositik hücrelerinde RANTES sekresyonu üzerine zıt etkileri olduğunu göstermişlerdir. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B), Rel gen ailesinden nükleer bir protein olup RANTES'i kodlayan genin regölasyonunda rol almaktadır. GA, RANTES üzerine olan etkisini, NF- κ B-ilişkili mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştirmektedir (228–230). Bizim RANTES ekspresyonu ile ilgili bulgularımız Li'nin sonuçları ile uyumlu olup, GA verilen grupta RANTES düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 10).

Interferon (IFN) beta 1b ile tedavi edilen RR-MS hastalarında RANTES'in sentez ve ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir (217). İn vitro bir çalışmada IFN beta 1a'nın RANTES ve MIP-1 α mRNA sentezini ve bunların reseptörü olan CCR5'i inhibe ettiği ve böylece kemokin-aracılı T hücre trafiğini bozarak terapötik etkisini gösterdiği bildirilmiştir (204). Bizim çalışmamızda da farklı miyelin antijenlerinin tetiklediği RANTES düzeylerinin GA uygulanan hayvanlarda suprese olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç GA'nın immünmodülatuar etkilerinden birisinin RANTES üretim ve ekspresyonunun regülasyonu aracılığı ile oluşabileceği şeklinde açıklanabilir.

MBP ile oluşturulan DOE modelinde ortamda IFN- γ bulunmadığında, özellikle IP-10/CXCL10 oluşmadığı, oysa MCP-1/CCL2 ve GRO- α /CXCL1'in ise arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada hayvanlara sistemik olarak IFN- γ verildiğinde ise özellikle hepatik kemokin ekspresyonunun arttığı ancak serebral kemokin düzeylerinin çok az etkilendiği görülmüştür (231). Benzer bir başka çalışmada aynı hayvan modelinde RANTES/CCL5 ve I-TAC/CXCL11 düzeyleri çok düşük olmasına karşın hayvanlarda ciddi DOE geliştiği gösterilmiştir. Nötrofil-çekici bir kemokin olan MIP-2/CXCL1-2 ve TCA-3/CCL1 anlamlı derecelerde artış göstermiştir (232,233).

MOG ile oluşturulan DOE modelinde ise, CCR1 ve CCR2 eksik farelerin hastalık oluşumuna daha dirençli olduğu, SSS'ye T hücre girişinin azaldığı, CCL5 ve CCL2 düzeylerinin değişmediği görülmüştür. Yine bu hayvanlarda antijen-uyarılı proliferasyon ve IFN- γ düzeyinde azalma olmaktadır (212,213).

IFN- γ eksik farelerde MOG ile oluşturulan DOE'de RANTES/CCL5, IP-10/CXCL10 ve MIP-1 α /CCL3'de belirgin, MCP-1/CCL2 ve MIP-2/CXCL1-

2’de ise ılımlı düzeyde inhibisyon gözlenmiştir (174). Bu veriler bazı kemokinlerin ekspresyonlarının IFN- γ bağımlı olduğunu düşündürmektedir. TNF- α yokluğunda ise MIP-1 α /CCL3 ve MIP-2/CXCL2 hiç gözlenmemekte, RANTES/CCL5 ve IP-10/CXCL10 ise belirgin azalmaktadır (174). IL-4 eksik farelerde ise RANTES/CCL5 ve MIP-1 α /CCL3 %50–60 oranında azalmakta iken IL-10 knockout farelerde benzer düzeyde azalma RANTES/CCL5, IP-10/CXCL10, MIP-1 α /CCL3 ve MIP-2/CXCL2’te gözlenmektedir (174).

Otoimmün hastalıklarda koruyucu fonksiyonları olan anti-enflamatuar sitokinler etkilerini kısmen de olsa kemokin düzeylerini baskılayarak göstermektedirler (205). Glabinski ve ark.’nın (205) çalışmalarında TGF- β 1 pikinin kemokin pikinden bir gün sonra ortaya çıktığı görülmektedir. Üstelik TGF- β 1, klinik skoru yüksek olan hastalarda düzeyi artan tek sitokindir. Bu bulgu TGF- β ’nın farklı bir immün düzenleyici rolü olabileceğini düşündürmektedir. Sistemik olarak uygulanması semptomları iyileştirmektedir. TGF- β antikoru varlığında ise hastalık kötüleşmektedir (38, 234). Bu veriler TGF- β ’nın DOE progresyonunda baskılayıcı etkisi olduğunu göstermektedir ve muhtemelen bu etkisini TGF- β 1 sekrete eden CD4⁺ ve/veya CD8⁺ supresif T hücreler aracılığı ile yapmaktadır (235). Kolera toksin B subüniti ile konjüge MBP’nin düşük dozda oral olarak uygulandığı DOE’de, TGF- β sekrete eden supresif regülatuar T hücrelerin uyarılması ile koruyucu etki oluşturduğu bildirilmiştir (236). TGF- β ’nın koruyucu etkisinin ortaya çıkmasında kemokin düzeyini baskılaması etkili olabilir (205).

Kemokinler ve reseptörleri immün sistem fonksiyonları üzerine ikili etkiye sahiptir. Bir yandan normal gelişim sürecinde hematopoetik kök hücrelerin

fizyolojik göçünde rol alırlarken (ör. SDF-1 ve CXCR4 gibi), diğer yandan enflamatuar ve otoimmün hastalıklarda enflamatuar hücre göçünü kontrol ederler (237). Bu nedenle, patolojik durumlarda fonksiyon gören kemokin ve reseptörlerinin bilinmesi, bu enflamatuar ajanların spesifik antikör veya reseptör antagonistleri ile etkilerinin direkt olarak bloke edilmesi yoluyla tedavi stratejilerinin oluşmasına katkı sağlayabilecektir. Ancak, bugüne kadar tanımlanmış 50'den fazla kemokin ve 20 civarında kemokin reseptörü mevcut olup bu reseptörler birden fazla kemokin ile reseptör-ligand bağlantısı oluşturmaktadır. Bu durum, aynı ailenin homeostatik ve enflamatuar üyelerinin birlikte bloke edilmesine bağlı yan etki oluşumuna yol açabilecektir (237). Devam eden ve yapılacak deneysel ve klinik çalışmalar, MS gibi kronik hastalıklarda rol oynayan kemokin ve reseptörlerinin daha iyi tanınmasına, hücre dışı bağlantıları veya hücre içi sinyal yolları üzerine etkili ajanların tespiti ile daha spesifik ve güvenli terapötik ajanların tedaviye sunulmasına yardımcı olacaktır.

Bizim çalışmamızda, MOG, MBP ve PLP ile DOE oluşturulan deney hayvanlarında, RANTES/CCL5, MIP-2/CXCL2 ve IP-10/CXCL10 kemokin ekspresyonunun GA ile baskılandığı, GA'nın hem hastalık gelişme oranını azalttığı hem de hastalık gelişen farelerde klinik skorların daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamız, MS'in deneysel modeli olarak kabul edilen DOE'de, farklı miyelin antijenleri ile hastalık indüksiyonu yapılan ve GA'nın her üç myelin antijeninin de tetiklediği enflamatuar kemokin salınımını inhibe ettiğini gösteren bir deneysel çalışma olarak, devam etmekte olan tedavi araştırmalarına katkıda bulunmayı amaçlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343: 938–952.
2. Krutzke JF. (2000). Natural history and clinical outcome measures for multiple sclerosis studies. Why at the present time does EDSS scale remain a preferred outcome measure to evaluate disease evolution? *Neurol Sci* 21: 339–341.
3. Flippi M, Dousset V, McFarland HF, Miller DH, Grossman RI. (2002). Role of magnetic resonance imaging in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: consensus report of the White Matter Study Group. *J Magn Reson Imaging* 15: 499–504.
4. Noseworthy JH. (1999) Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399: A40–A47.
5. Godessart N, Kunkel SL. (2001) Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 13: 670–675.
6. Sorensen TL, Ransohoff RM, Strieter RM, Sellebjerg F. (2004). Chemokine CCL2 and Chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 11: 445–449.
7. Swanborg RH. (1988). Experimental allergic encephalomyelitis. *Methods Enzymol* 162: 413–421.
8. Swanborg RH. (2001). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev* 184: 129–135.
9. Dhib-Jalbut S. (2003). Glatiramer acetate (Copaxone®) therapy for multiple sclerosis. *Pharmacol Therap* 98: 245–255.
10. Chervinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. (1987). Two types of Mouse hepler T cell clone: III. Further differences in lymphokine synthesis

- between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 166: 1229–1244.
11. Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 21: 75–80.
 12. Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP. (1998). MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 160: 3056–3059.
 13. Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. (1999). Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 12: 295–302.
 14. Martin R, Sturzebecher CS, McFarland HF. (2001). Immunotherapy of multiple sclerosis: where are we? Where should we go? *Nat Immunol* 2: 785–788.
 15. Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroffe MN. (1998). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 84: 238–249.
 16. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. (1999). CCR5(+) and CCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6873–6878.
 17. Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN. (2000). Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 108: 192–200.
 18. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM. (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 103: 807–815.

19. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123: 1174–1183.
20. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Eng J Med* 338: 278–285.
21. Van Veen T, Nielsen J, Berkhof J, Barkhof F, Kamphorst W, Bö L, Ravid R, Verweij CL, Huitinga I, Polman CH, Uitdehaag BMJ. (2007). CCL5 and CCR5 genotypes modify clinical, radiological and pathological features of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 190: 157–164.
22. Jacobs LD and Multiple Sclerosis Colaborative Research Group (MSCRG). (1995). A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-remitting multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. *Mult Scler* 1: 118–135.
23. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB. (1995). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45: 1268–1276.
24. Panitch H, and EVIDENCE Study Group. (2002). The evidence of interferon dose response: European-North American comparative efficacy (EVIDENCE) study: 48 week data. *Neurology* 58(suppl. 3): A86.
25. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. (1998). Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352: 1498–1504.

26. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. (1993). Interferon β -1b is effective in relapsing/remitting multiple sclerosis: 1. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43: 655–661.
27. Gonsette RE. (1996). Mitoxantrone immunotherapy in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1: 329–332.
28. Weiner HL. (2008). A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 255(Suppl 1): 3–11.
29. Arnon R. (1996). The development of Cop 1 (Copaxone), an innovative drug for the treatment of multiple sclerosis: personal reflections. *Immunol Lett* 50: 1–15.
30. Arnon R, Sela M, Teitelbaum D. (1996). New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol* 243: S8–S13.
31. Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. (1999). Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3842–3847.
32. Lando Z, Teitelbaum D, Arnon R. (1979). Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice unresponsive to EAE. *J Immunol* 123: 2156–2160.
33. Teitelbaum D, Aharoni R, Arnon R, Sela M. (1988). Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer Cop 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9724–9728.
34. Teitelbaum D, Aharoni R, Sela M, Arnon R. (1991). Cross-reactions and specificities of monoclonal antibodies against myelin basic protein and against the synthetic copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9528–9532.

35. Burns J, Littlefield K. (1991). Failure of copolymer 1 to inhibit the human T-cell response to myelin basic protein. *Neurology* 41: 1317–1319.
36. Lisak RP, Zweiman B, Blanchard N, Rorke LB. (1983). Effect of treatment with copolymer 1 (Cop-1) on the in vivo and in vitro manifestations of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *J Neurol Sci* 62: 281–293.
37. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. (1999). Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 634–639.
38. Racke MK, Cannella B, Albert P, Sporn M, Raine CS, McFarlin DE. (1992). Evidence of endogenous regulatory function of transforming growth factor-beta 1 in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol* 4: 615–620.
39. Ben-Nun A, Mendel I, Bakimer R, Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, Kerlero de Rosbo N. (1996). The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic: effect of copolymer 1 on MOG-induced disease. *J Neurol* 243: S14-S22.
40. Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Gurevich E, Pecht I, Brautbar C, Kwon OJ, Brenner T, Arnon R, Sela M. (1994). Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells-specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4872–4876.
41. Teitelbaum D, Fridkis-Hareli M, Arnon R, Sela M. (1996). Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses. *J Neuroimmunol* 64: 209–217.
42. Fridkis-Hareli M, Strominger JL. (1998). Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. *J Immunol* 160: 4386–4397.

43. Blanchette F, Neuhaus O. (2008). Glatiramer acetate. Evidence for a dual mechanism of action. *J Neurol* 255(Suppl 1): 26–36.
44. Fridkis-Hareli M, Neveu JM, Robinson RA, Lane WS, Gauthier L, Wucherpfennig KW, Sela M, Strominger JL. (1999). Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis- and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules. *J Immunol* 162: 4697–4704.
45. Gran B, Tranquill LR, Chen M, Bielekova B, Zhou W, Dhib-Jalbut S, Martin R. (2000). Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology* 55: 1704–1714.
46. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JL, Hafler DA. (2000). Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 105: 967–976.
47. Ragheb S, Abramczyk S, Lisak D, Lisak R. (2001). Long-term therapy with glatiramer acetate in multiple sclerosis: effect on T-cells. *Mult Scler* 7: 43–47.
48. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S, Lahat N. (1998). Treatment of multiple sclerosis with copolymer 1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 92: 113–121.
49. Chen M, Gran B, Costello K, Johnson K, Martin R, Dhib-Jalbut S. (2001). Glatiramer acetate induces a Th2-biased response and cross-reactivity with myelin basic protein with MS. *Mult Scler* 7: 209–219.
50. Dabbert D, Rosner S, Kramer M, Scholl U, Tumani H, Mader M, Weber F. (2000). Glatiramer acetate (copolymer 1)-specific, human T cell lines reactive against myelin basic protein. *Neurosci Lett* 289: 205–208.
51. Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Then Berg F, Dose T, Wekerle H, Hohlfeld R. (2000). Multiple sclerosis: comparison of copolymer 1-reactive T

- cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T hepler 1 to T hepler 2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7452–7457.
52. Qin Y, Zhang DQ, Prat A, Pouly S, Antel J. (2000). Characterization of T cell lines derived from glatiramer acetate-treated multiple sclerosis patients. *L Neuroimmunol* 108: 201–206.
 53. Chen M, Conway K, Johnson K, Martin R, Dhib-Jalbut S. (2002). Sustained immunologic effect of Glatiramer acetate in patients with multiple sclerosis treated for over 6 years. *J Neurol Sci* 201: 71–77.
 54. Aharoni R, Teitelbaum D, Leitner O, Meshorer A, Sela M, Arnon R. (2000). Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11472–11477.
 55. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R. (1993). T suppressor hybridomas and interleukin–2-dependent lines induced by copolymer 1 or by spinal cord homogenate down-regulate experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 23: 17–25.
 56. Arnon R. (2007). Does glatiramer acetate induce neurogenesis experimental autoimmune encephalomyelitis? *J Neurol* 254(Suppl 1): I41–I46.
 57. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS. (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. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol* 49: 290–297.
 58. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen JR, Schwartz M. (2000). T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7446–7451.

59. Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruia G, Wheeler LA, Schwartz M. (2001). Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3398–3403.
60. Ziemssen T, Kuempfel T, Klinkert W, Neuhaus O, Hohlfeld R. (2002). Glatiramer acetate-specific T-cell lines produce brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after activation upon antigen challenge in vitro: a novel mechanism of action. *Neurology* 58(Suppl 3): A326.
61. Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, Arnon R. (2005). The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factor in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19045–19050.
62. Ure DR, Rodriguez M. (2002). Polyreactive antibodies to glatiramer acetate promote myelin repair in murine model of demyelinating disease. *FASEB J* 16: 1260–1262.
63. Filippi M, Rovaris M, Rocca MA, Sormani MP, Wolinsky JS, Comi G. (2001). Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into “black holes”. *Neurology* 57: 731–733.
64. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (2000). Cytokines. In: *Cellular and Molecular Immunology*, AK Abbas, Lichtman AH, Pober JS. (eds.) W.B Saunders, Philadelphia. pp 235–269.
65. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15: 675–705.
66. Luster F. (1998). Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Eng J Med* 338: 436–445.
67. Baggiolini M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565–568.

68. Biber K, Zuurman MW, Dijkstra IM, Booddeke WGM. (2002). Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Curr Opin Pharma* 2: 63–68.
69. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. (2000). International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52: 145–176.
70. Zlotnik A, Yoshie O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2: 121–127.
71. Strieter RM, Standiford J, Hultnagle GB, Colletti LM, Luk CS, Kunkel SL. (1996). The good, the bad, the ugly. The role of chemokines in models of human disease. *J Immunol* 156: 3583–3586.
72. Baggiolini M, Loetscher P. (2000). Chemokines in inflammation and immunity *Immunology Today* 21(9): 418–420.
73. Schluger NW, Rom WN. (1997). Early responses to infection chemokines as mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol* 9: 504–508.
74. Rollins BJ. (1997). Chemokines. *Blood* 90: 909–928.
75. Wenzel UO, Stahi RAK. (1999). Chemokines, renal disease and HIV infection. *Nephron* 81: 5–16.
76. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. (1997). Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukocyte Biol* 62: 634–644.
77. Mantovani A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunology Today* 20: 254–257.
78. Nelson PJ, Krensky AM. (1998). Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol* 10: 265–270.

79. Kanazawa N, Nakamura T, Tashiro K, Muramatsu M. (1999). Fractalkine and macrophage-derived chemokine: T cell-attracting chemokines expressed in T cell area dendritic cell. *Eur J Immunol* 29: 1928–1932.
80. Bazen JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640–644.
81. Schall T. (1997). Fractalkine - a strange attractor in the chemokine landscape. *Immunology Today* 18 (4): 147.
82. Papadopoulos EJ, Sasasetti C, Seki H, Yamada N. (1999). Fractalkine, a CX3C chemokine is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 29: 2551–2559.
83. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. (1997). Cytokines. In: *Medical Immunology*, Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). USA, Appleton-Lange. pp: 146-168.
84. Horuk R. (1994). The interleukin-8 receptor family: from chemokines to malaria. *Immunology Today* 15: 169–174.
85. Horuk R, Martin A, Hesselgesser J, Baba M. (1996). The Duffy antigen receptor for chemokines: structural analysis and expression in the brain. *J Leuk Biol* 59: 29–38.
86. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembran, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872–877.
87. Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18: 501–511.
88. Thelen M. (2001). Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2: 129–134.
89. Moser B, Loetscher P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2: 123–128.

90. Mackay CR. (2001). Chemokines immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2: 95–101.
91. Wong MM, Fish EN. (2003). Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 15: 5–14.
92. Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. (1996). Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J Immunol* 156: 2095–2103.
93. Makino Y, Cook DN, Smithies O, Hwang OY, Neilson EG, Turka LA. (2002). Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin Immunol* 102: 302–309.
94. Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4⁺ T cell activation. *J Immunol* 2000;164:5010–5014.
95. Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. (1995). Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 269: 1727–1730.
96. Dairaghi DJ, Soo KS, Oldlam ER, Premack BA, Kitamura T, Bacon KB. (1998). RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression. *J Immunol* 160: 426–433.
97. Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 393: 400–403.
98. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101: 746–754.
99. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277: 2005–2007.

- 100.** Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 1999;11:81-88.
- 101.** Siveke JT, Hamann A. (1998). T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 160: 550–554.
- 102.** Schrum S, Probst P, Fleischer B, Zipfel PF. (1996). Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J Immunol* 157: 3598–3604.
- 103.** Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. (1997). Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol* 158: 4129–4136.
- 104.** Colamussi ML, Secchiero P, Gonelli A, Marchisio M, Zauli G, Capitani S. (2001). Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1alpha) induces CD4+ T cell apoptosis via the functional up-regulation of the Fas (CD95)/Fas ligand (CD95L) pathway. *J Leukoc Biol* 69: 263–270.
- 105.** Morris AJ, Malbon CC. (1999). Physiological regulation of G-protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79: 1373–1430.
- 106.** Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C. (1992). Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149: 2358–2366.
- 107.** Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, Shick HE, Major JA, Estes MI, Thomas TM, Tuohy VK. (1993). Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J* 7: 592–600.

108. Bacon KB, Harrison JK. (2000). Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol* 104: 92–97.
109. Ransohoff RM, Tani M. (1988). Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends Neurosci* 4: 154–159.
110. Hesselgesser J, Horuk R. (1999). Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 1: 13–26.
111. Mennicken F, Maki R, de Souza EB. (1999). Chemokines and chemokine receptors in the CNS: possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci* 2: 73–78.
112. Dorf ME, Berman MA, Tanabe S, Heesen M, Luo Y. (2000). Astrocytes express functional chemokine receptors. *J Neuroimmunol* 111: 109–121.
113. Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao Z, Murphy D, Jaffer S, Choe W, Chen W, Hesselgesser J, Gaylord H. (2000). Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience* 97: 591–600.
114. Jiang Y, Salafranca MN, Adhikari S, Xia Y, Feng L, Sonntag MK, deFiebre CM, Pernet NA, Streit WJ, Harrison JK. (1998). Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 86: 1–12.
115. Han Y, Wang J, He T, Ransohoff RM. (2001). TNF- α down-regulates CXCR4 expression in primary murine astrocytes. *Brain Res* 888: 1–10.
116. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10896–10901.

117. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Piccioli P, Costa A, Florio T, Sechettini G. (1999). Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J Neurochem* 73: 2348–2357.
118. Mantovani A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20: 254–257.
119. Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Maeda N, Brueck W. (2000). The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 110: 177–185.
120. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* 192: 1075–1080.
121. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192: 899–905.
122. Huang D, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. (2001). Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 193: 713–726.
123. McManus CM, Weidenheim K, Woodman SE, Nunez J, Hesselgesser J, Nath A, Berman JW. (2000). Chemokine and chemokine receptor expression in human glial elements: induction by the HIV protein Tat, and chemokine autoregulation. *Am J Pathol* 156: 1441–1453.
124. Hua LL, Lee SC. (2000). Distinct patterns of stimulus inducible chemokine mRNA accumulation in human fetal astrocytes and microglia. *Glia* 30: 74–81.
125. Lokensgard JR, Hu S, Feneme van EM, Sheng WS, Peterson PK. (2000). Effect of thalidomide on chemokine production by human microglia. *J Infect Dis* 182: 983–987.

126. Janabi N, Hau I, Tardieu M. (1999). Negative feedback between prostoglandin and α - and β -chemokine synthesis in human microglial cells and astrocytes. *J Immunol* 162: 1701–1706.
127. Wang X, Ellison JA, Siren AL, Lysko PG, Yue TL, Barone FC, Shatzman A, Feuerstein GZ. (1998). Prolonged expression of interferon-inducible protein-10 in ischemic cortex after permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat. *J Neurochem* 71: 1194–1204.
128. Biber K, Sauter A, Brouwer N, Copray JCVM, Boddeke HWGM. (2001). Ischemia-induced neuronal expression of the microglia attracting chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC). *Glia* 34: 121–133.
129. Schreiber RC, Krivacic K, Kirby B, Vaccariello SA, Wei T, Ransohoff RM, Zigmond RE. (2001). Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 is rapidly expressed by sympathetic ganglion neurons following axonal injury. *Mol Neurosci* 12: 601–605.
130. Fluegel A, Hager G, Horvat A, Spitzer C, Singer GMA, Graeber MB, Kreutzberg GW, Schwaiger FW. (2001). Neuronal MCP-1 expression in response to remote nerve injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 69–76.
131. Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res* 902: 171–177.
132. Streit WJ, Walter SA, Pannell NA. (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563–581.
133. Becher B, Prat A, Antel JP. (2000). Brain-immune connection: immunoregulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 4: 293–304.
134. Andjelkovic AV, Spencer DD, Pachter JS. (1999). Visualization of chemokine binding sites on human brain microvessels. *J Cell Biol* 145: 403–412.

135. Gerard C, Rollins BJ. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2: 108–115.
136. Arimilli S, Ferlin W, Solvason N, Deshpande S, Howard M, Mocci S. (2000). Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 177: 43–51.
137. Ashhab Y, Dominguez O, Sospedra m, Roura-Mir C, Lucas-Martin A, Pujol-Borrell R. (1999). A one-tube polymerase chain reaction protocol demonstrates CC ckemokine overexpression in Graves' disease glands. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2873–2882.
138. Simchen C, Lehmann I, Sitting D, Steinert M, Aust G. (2000). Expression and regulation of regulated on activation, normal T cells expressed and secreted in thyroid tissue of patients with Graves' disease and thyroid autonomy and in thyroid-derived cell populations. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4758–4764.
139. Catani MV, Corasaniti MT, Navara M, Nistico G, Finazzi-Agro A, Melino G. (2000). Gp120 induces cell death in human neuroblastoma cells through the CXCR4 and CCR5 ckemokine receptors. *J Neurochem* 74: 2373–2379.
140. Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ. (2000). Expression of CX3CR chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8075–8080.
141. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, de Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Votterra A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4: 702–710.
142. Luan J, Furuta Y, Du J, Richmond A. (2001). Developmental expression of two CXC ckemokines, MIP-2 and KC, and their receptors. *Cytokine* 14: 253–263.
143. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed

cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9448–9453.

144. Meng SZ, Oka A, Takashima S. (1999). Developmental expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the human cerebellum and brainstem. *Brain Dev* 21: 30–35.
145. Van Der Meer P, Goldberg SH, Fung KM, Sharer LR, Gonzales-Scarano F, Lavi E. (2001). Expression pattern of CXCR3, CXCR4, and CCR3 chemokine receptors in the developing human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 25–32.
146. Bezzi P, Volterra A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11: 387–394.
147. Limatola C, Giovannelli A, Maggi L, Ragozzino D, Castellani L, Clotti MT, Vacca F, Mercanti D, Santoni A, Eusebi F. (2000). SDF-1 α -mediated modulation of synaptic transmission in rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 12: 2497–2504.
148. Puma C, Danik M, Quirion R, Williams S. (2001). The chemokine interleukin-8 acutely reduces Ca²⁺ currents in identified cholinergic septal neurons expressing CXCR1 and CXCR2 receptor mRNAs. *J Neurochem* 78: 960–971.
149. Oh SB, Tran PB, Gillard SE, Hurley RW, Hammond DL, Miller RJ. (2001). Chemokines and glycoprotein 120 produce pain and hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. *J Neurosci* 21: 5027–5035.
150. Glabinski AR, Ransohoff RM. (1999). Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* 1: 3–12.
151. Franciotta D, Martino G, Zardin E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V. (2001). Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol* 115: 192–198.

152. Boven LA, Montagne L, Nottet HS, De Groot CJ. (2000). Macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 β , and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis lesions. *Clin Exp Immunol* 122: 257–263.
153. Zang YC, Samanta AK, Halder JB, Hong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zhang JZ. (2000). Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Over-expression of chemokine receptor CCR5. *Brain* 123: 1874–1882.
154. Allie R, Hu L, Mullen KM, Dhib-Jalbut S, Calabresi PA. (2005). Bystander modulation of chemokine receptor expression on peripheral blood T lymphocytes mediated by Glatiramer therapy. *Arch Neurol*;62: 889–894.
155. Jee Y, Liu R, Bai XF, Campagnolo DI, Shi FD, Volimer TL. (2006). Do Th2 cells mediate the effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis? *Int Immunol* 18: 537–544.
156. Giuliani F, Metz LM, Wilson T, Fan Y, Bar-Or A, Yong VW. (2005). Additive effect of the combination of glatiramer acetate and minocycline in a model of MS. *J Neuroimmunol* 158: 213–221.
157. Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. (2002). Targeting leukocyte MMP's and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125: 1297–1308.
158. Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Linington C, Duncan LD. (2002). Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol* 51: 215–223.
159. Karpus WJ, Fife BT, Kennedy KJ. (2003). Immunoneutralization of chemokines for the prevention and treatment of central nervous system autoimmune disease. *Methods* 29: 362–368.

- 160.** Miller SD, Karpus WJ. (1994). The immunopathogenesis and regulation of T-cell-mediated demyelinating diseases. *Immunol Today* 15: 356–361.
- 161.** Whitham RH, Bourdette GA, Hashim RM, Herndon RC, Vandenberg AA, Offner H. (1991). Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 146: 101–107.
- 162.** Chang TT, Jabs C, Sobel RA, Kuchroo VK, Sharpe AH. (1999). Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 190: 733–740.
- 163.** Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA. (1993). Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 177: 57–68.
- 164.** Kobayashi Y, Kawai K, Honda H, Tomida S, Nimi N, Tamatani T, Miyasaka M, Yoshikai Y. (1995). Antibodies against leukocyte function-associated antigen-1 and against intercellular adhesion molecule-1 together suppress the progression of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol* 164: 295–305.
- 165.** Morissey SP, Deichmann R, Syha J, Simonis C, Zettl U, Archelos JJ, Jung S, Stodal H, Lassmann H, Toyka KV, Haase A, Hartung HP. (1996). Partial inhibition of AT-EAE by an antibody to ICAM-1: clinico-histological and MRI studies. *J Neuroimmunol* 69: 85–93.
- 166.** Glabinski AR, Ransohoff RM. (1999). Sentries at the gate: chemokines and the blood-brain barrier. *J Neurovirol* 5: 623–634.
- 167.** Karpus WJ. (2001). Chemokines and central nervous system disorders. *J Neurovirol* 7: 493–500.

168. Glabinski A, Tani M, Tuohy V, Tuthill R, Ransohoff RM. (1995). Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows initial leukocyte entry at the onset of acute murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 118: 315–330.
169. Laman JD, Thompson EJ, Kappos L. (1998). Balancing the Th1/Th2 concept in multiple sclerosis. *Immunol Today* 19: 489–490.
170. Bar-or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA. (1999). Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 100: 252–259.
171. Sindern E, Niederkinkhaus Y, Henschel M, Ossege LM, Patzold T, Malin JP. (2001). Differential release of beta-chemokines in serum and CSF of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 104: 88–91.
172. Mahad DJ, Howell SJL, Woodroffe MN. (2002). Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72: 498–502.
173. Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, Schröder JM. (1999). Th1 and Th2 type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 777–786.
174. Matejuk A, Dwyer J, Ito A, Bruender Z, Vanderbark AA, Offner HJ. (2002). Effects of cytokine deficiency on chemokine expression in CNS of mice with EAE. *Neurosci Res* 67: 680–688.
175. Losana G, Bovolenta C, Rigamonti L, Borghi I, Altare F, Jouanguy E, Forni G, Casanova JL, Sherry B, Mengozzi M, Trinchieri G, Poli G, Gerosa F, Novelli F. (2002). IFN-gamma and IL-12 differentially regulate CC-chemokine secretion and CCR5 expression in human T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 72: 735–742.
176. Huang D, Han Y, Rani MR, Glabinski A, Trebst C, Sorensen T, Tani M, Wang J, Chien P, O'Brayn S, Bielecki B, Zhou ZL, Majumder S, Ransohoff RM.

- (2000). Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. *Immunol Rev* 177: 52–67.
- 177.** Ransohoff RM. (2002). The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis* 186(Suppl 2):S152–S156.
- 178.** Trebst C, Ransohoff RM. (2001). Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges. *Arch Neurol* 58: 1975–1980.
- 179.** Johnson KP, Ford CC, Lisak RP, Wolinsky JS. (2005). Neurologic consequence of delaying glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis: 8-year data. *Acta Neurol Scand* 111: 42–47.
- 180.** Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA. (1998). Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rates and degree of disability. *Neurology* 50: 701–708.
- 181.** Johnson KP, Brooks BR, Ford CC, Goodman A, Guarnaccia J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Pruitt A, Rose JW, Kachuck N, Wolinsky JS. (2000). Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. *Mult Scler* 6: 255–266.
- 182.** Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Crystal H, Drexler E, Keilson M, Merriam A, Wassertheil-Smoller S, Spada V. (1987). A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-relapsing multiple sclerosis. *N Eng J Med* 317 (7): 408–414.
- 183.** Mancardi GL, Sardanelli F, Parodi RC, Melani E, Capello E, Inglese M, Ferrari A, Sormani MP, Otonello C, Levrero F, Uccelli A, Bruzzi P. (1998). Effect of copolymer-1 on serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing remitting multiple sclerosis. *Neurology* 50: 1127–1133.
- 184.** Li QQ, Bever CT. (2001). Glatiramer acetate blocks interleukin-1-dependent nuclear factor- κ B activation and RANTES expression in human U-251 MG astroglial cells. *Mol Brain Res* 87: 48–60.

- 185.** Bornstein MB, Miller AL, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. (1982). Multiple sclerosis: trial of a synthetic polypeptide. *Ann Neurol* 11: 317–319.
- 186.** Ge Y, Grossman RL, Udupa JK, Fulton J, Constantinescu CS, Gonzales-Scarano F, Babb JS, Manon LJ, Kolson DL, Cohen JA. (2000). Glatiramer acetate (Copaxone) treatment in relapsing-remitting MS: quantitative MR assessment. *Neurology* 54: 813–817.
- 187.** Wolinsky JS, Narayana PA, Johnson KP. (2001). United States open-label glatiramer acetate extension trial for relapsing multiple sclerosis: MRI and clinical correlates. Multiple Sclerosis Study Group and the MRI Analysis Center. *Mult Scler* 7: 33–41.
- 188.** Racke MK, Martin R, McFarland H, Fritz RB. (1992). Copolymer-1 induced inhibition of antigen-specific T cell activation: interference with antigen presentation. *J Neuroimmunol* 37(1-2): 75-84.
- 189.** Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R. (1997). Copolymer-1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10821–10830.
- 190.** Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. (1998). Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1. *J Neuroimmunol* 91: 135–140.
- 191.** Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Bruck W, Hohlfeld R, Lassmann H. (2002). BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125: 75–85.
- 192.** Putheti P, Pettersson A, Soderstrom M, Link H, Huang YM. (2004). Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol* 24: 155–161.

- 193.** Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM. (2003). Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25^{high} T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144: 125–131.
- 194.** Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25⁺ T regulatory cells in patient with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971–979.
- 195.** Holmoy T, Skorstad G, Hestvik A, Vartdal F. (2007). Multiple sclerosis: Phenotype of cerebrospinal fluid T cells specific for glatiramer acetate. *Neurology* 68: A19–A20.
- 196.** Ziemssen T, Schneider H. (2007). Presence of glatiramer acetate (GA)-specific T cells in the cerebrospinal fluid of GA-treated MS patients and GA-T cell transferred EAE mice producing Th2 cytokines and neurotrophic factors. *Neurology* 68: A314–A315.
- 197.** Sela M, Teitelbaum D. (2001). Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2: 1149–1165.
- 198.** Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 2001;56:702-708.
- 199.** Yong VW. (2002). Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 59: 802–808.
- 200.** Brod SA, Lindsey JW, Wolinsky JS. (2000). Combination therapy with glatiramer acetate (copolymer-1) and a type I interferon (IFN-alpha) does not improve experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 47: 127–131.
- 201.** Buttmann M, Merzyn C, Rieckmann P. (2004). Interferon- β induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 156: 195–203.

202. Cremer L, Vieillard V, De Maeyer E. (2000). Retrovirally mediated IFN- β transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of RANTES production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *J Immunol* 164: 1582–1587.
203. Comabella M, Imitala J, Weiner HL, Khoury SJ. (2002). IFN- β treatment alters peripheral blood monocytes chemokine production in MS patients. *J Neuroimmunol* 126: 205–212.
204. Zang YC, Halder JB, Samanta AK, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. (2001). Regulation of chemokine receptor CCR5 and production of RANTES and MIP-1 α by interferon- β . *J Neuroimmunol* 112: 174–180.
205. Glabinski AR, Bielecki B, Ransohoff RM. (2003). Chemokine upregulation follows cytokine expression in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 58: 81–88.
206. Hulkower K, Brosnan CF, Aquino DA. (1993). Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 150: 2525–2533.
207. Godiska R, Chantry D, Dietsch G, Gray P. (1995). Chemokine expression in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 58: 167–176.
208. Glabinski A, Tuohy V, Ransohoff R. (1998). Expression of chemokines RANTES, MIP-1 α and Gro- α correlates with inflammation in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation* 5: 166–171.
209. Nygardas PT, Matta JA, Hinkkanen AE. (2000). Chemokine expression by central nervous system resident cells and infiltrating neutrophils during experimental autoimmune encephalomyelitis in the balb/c mouse. *Eur J Immunol* 30: 1911–1918.

210. Rajan AJ, Asensio VC, Campbell IL, Brosnan CF. (2000). Experimental autoimmune encephalomyelitis on SJL mouse: effect of gamma delta T cell depletion on chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Immunol* 164: 2120–2130.
211. Glabinski A, Tani M, Strieter R, Tuohy V, Ransohoff R. (1997). Synchronous synthesis of α - and β -chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 150: 617–630.
212. Karpus WJ, Lukacs NW, McRae BL, Strieter RM, Kunkel SL, Miller SD. (1995). An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 α in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 155: 5003–5010.
213. Kennedy K, Strieter R, Kunkel S, Lukacs N, Karpus W. (1998). Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 and monocyte chemoattractant protein 1. *J Neuroimmunol* 92: 98–108.
214. McManus C, Brosnan C, Berman J. (1998). Cytokine induction of MIP-1 α and MIP-1 β in human fetal microglia. *J Immunol* 160: 1449–1455.
215. Zhou Z-HL, Chaturvedi P, Han Y. (1998). IFN- γ induction of the human monocyte chemoattractant protein (hMCP)-1 gene in astrocytoma cells: functional interaction between an IFN- γ -activated site and a GC-rich element. *J Immunol* 160: 3908–3916.
216. Zach O, Bauer HC, Richter K, Webersinke G, Tontsch S, Bauer H. (1997). Expression of a chemotactic cytokine (MCP-1) in cerebral capillary endothelial cells in vitro. *Endothelium* 5: 143–153.
217. Iarlori C, Reale M, Lugaesi A, DeLuca G, Bonanni L, Di Iorio A, Feliciani C, Conti P, Gambi D. (2000). RANTES production and expression is reduced in

relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon- β 1b. *J Neuroimmunol* 107: 100–107.

218. Schall TJ, Jongstra J, Bradley JD, Jorgensen J, Davis MM, Krensky AM. (1988). A human T cell – specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 141: 1018–1025.

219. Schall TJ. (1991). Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 3: 165–183.

220. Schall TJ, Bacon K, Toy K, Goddel DV. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347: 669–671.

221. Barnes DA, Huston M, Holmes R, Benveniste EN, Yong VW, Perez DH. (1996). Induction of RANTES expression by astocytes and astocytoma cell lines. *J Neuroimmunol* 71: 207–214.

222. Janabi N, Stefano MD, Wallon C, Hery C, Chiodi F, Tardieu M. (1998). Induction of human immunodeficiency virus type 1 replication in human glial cells after proinflammatory cytokines stimulation. Effect of IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α on differentiation and chemokine production in glial cells. *Glia* 23: 304–315.

223. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. (1991). Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis brain lesions. *J Clin Invest* 87: 949–954.

224. Gade-Andavolu R, Comings DE, McMurray J, Vuthoori RK, Tourtellotte WW, Nagra RM, Cone LA. (2004). RANTES: a genetic risk marker for multiple sclerosis. *Mult Scler* 10: 536–539.

225. Li QQ, Bever CT, Burt DR, Judge SI, Trisler GD. (2001). Induction of RANTES chemokine expression in human astrocytic cells is dependent upon activation of NF-kappa B transcription factor. *Int J Mol Med* 7: 427–433.

226. Li QQ, Bever CT. (2001). Comparison of RANTES chemokine induction by Th1 cytokines in human astroglial cell lines. *Int J Mol Med* 8: 95–101.
227. Li QQ, Burt DR, Bever CT. (2001). Glatiramer acetate inhibition of tumor necrosis factor- α induced RANTES expression and release from U-251 MG human astrocytic cells. *J Neurochem* 77: 1208–1217.
228. Grimm S, Baeuerle PA. (1993). The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 290: 297–308.
229. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994). Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 10: 405–455.
230. Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. (1997). Nuclear factor- κ B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection. *J Immunol* 158: 3483–3441.
231. Glabinski A, Krakowski M, Han Y, Owens T, Ransohoff R. (1999). Chemokine expression in GKO mice (lacking interferon-gamma) with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurovirol* 5: 95–101.
232. Tran EH, Prince EN, Owens T. (2000). IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 164: 2759–2768.
233. Hamilton N, Banyer J, Hapel A. (2002). IFN-gamma regulates murine interferon-inducible T-cell alpha chemokine (I-TAC) expression in dendritic cell lines and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 55: 171–177.
234. Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ. (1991). Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune disease in mice. *Proc Natl Acad sci USA* 88: 2918–2921.

- 235.** Chen Y, Inobe J, Weiner HL. (1995). Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. *J Immunol* 155: 910–916.
- 236.** Sun J-B, Xiao B-G, Lindblad M. (2000). Oral administration of cholera toxin B subunit conjugated to myelin basic protein protects against experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing transforming growth factor beta – secreting cells and suppressing chemokine expression. *Int Immunol* 12: 1449–1457.
- 237.** Johnson Z, Power CA, Weiss C, Rintelen F, Ji H, Ruckle T, Camps M, Wells TNC, Schwarz MK, Proudfoot AEI, Rommel C. (2004). Chemokine inhibition – why, when, where, which and how? *Biochem Soc Trans* 32(2):366–376.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Serpil BULUT

Doğum Tarihi : 31.03.1965

Doğum Yeri : Giresun

Eğitim Gördüğü Okullar :

Bulancak Barbaros İlkokulu 1971-1976

İstanbul Kız Lisesi 1976-1981

Beyoğlu Fındıklı Lisesi 1981-1982

İ Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 1982-1988

Uzmanlık Eğitimi : Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji AD
1991-1995

Çalıştığı Kurumlar :

Kırşehir SSK Hastanesi, Pratisyen hekim,
1988-1991

SB Ankara Hastanesi, Nöroloji Uzmanı,
1995-1996

Gazi Üniv Tıp Fak Nöroloji AD, Elektrofizyoloji lab,
1996-1997

Akademik Görevler :

Fırat Üniv Tıp Fak Nöroloji AD, Yardımcı Doçent
1997-2004

Fırat Üniv Tıp Fak Nöroloji AD, Doçent
(2004- Devam ediyor)

Yabancı Dil : İngilizce

Medeni Durum: Evli, 2 çocuklu