



Remisyonadaki Multipl Skleroz Hastalarında Periferik Kan Hücre İmmünofenotipleri

Vuslat Yılmaz¹, Canan Ulusoy¹, Özlem Mercan³, Suzan Adın Çınar², Recai Türkoğlu³

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği, İstanbul

Özet

Giriş ve Amaç: Çalışmamızda multipl skleroz (MS) hastalarında lenfosit alt popülasyonundaki değişimin akan hücre ölçer ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem ve Gereçler: Çalışmaya 25 ataklı yineleyici MS hastası ayrıca yaş ve cinsiyet uyumlu 11 sağlıklı kontrol de dahil edildi. CD3+ T hücre, CD4+ yardımcı T hücre, CD8+ sitotoksik T hücre, CD3+CD4+CD25 parlak düzenleyici T (Treg) hücre, CD19+B hücre, CD16+CD56+doğal öldürücü (NK) hücre, CD3+CD56+NKT hücre kantifikasyonu dört renkli akan hücre ölçer ile değerlendirildi.

Bulgular: Akan hücre ölçer cihazında hücre grupları değerlendirildiğinde, T hücre, düzenleyici T (Treg) hücre, B hücre, doğal öldürücü (NK) hücre, NKT hücre gruplarında hasta ve sağlıklı kişiler arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi. T ve B lenfositlerinin hasta ve sağlıklı kişilerde yüzdeleri oldukça yakın iken hastalarda NK ve NKT hücre gruplarında hastalar lehine gözlenen azalma anlamlı seviyede değildi. Ayrıca yardımcı, sitotoksik ve düzenleyici T hücrelerinin de hasta ve sağlıklı kişilerde benzer seviyelerde olduğu belirlendi.

Tartışma ve Sonuç: Bu bulgular, MS patogenezinde rol oynayan merkezi sinir sistemi inflamatuvar değişikliklerinin ve lenfosit aktivasyonunun periferik kan örneklerinde belirlenemeyeceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: B hücre; multipl skleroz; periferik lenfositler; T hücre.

Peripheral Blood Cell Immunophenotypes in Multiple Sclerosis Patients in Remission

Abstract

Introduction: The aim of this study was to identify lymphocyte subpopulation alterations of multiple sclerosis (MS) patients using flow cytometry.

Methods: Twenty-five relapsing remitting MS patients and 11 age- and gender- matched healthy controls were included in the study. The percentage of cluster of differentiation (CD)3+T cells, CD4+helper T cells, CD8+cytotoxic T cells, CD3+CD4+CD25 high regulatory T (Treg) cells, CD19+B cells, CD16+CD56+natural killer (NK) cells, and CD3+CD56+NKT cells were quantified using 4-color flow cytometry.

İletişim (Correspondence): Dr. Vuslat Yılmaz. İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul

Telefon (Phone): +90 533 743 55 73 **E-Posta (E-mail):** vuslaty@hotmail.com

Başvuru Tarihi (Submitted Date): 15.02.2017 **Kabul Tarihi (Accepted Date):** 15.03.2017



Results: Assessment of cell populations yielded no significant differences between the T cell, Treg cell, B cell, NK cell, and NKT cell groups of MS patients and healthy controls. While the T and B cell percentages were comparable between patients and healthy controls, NK and NKT cells were found to be reduced in MS patients, albeit at an insignificant level. Helper, cytotoxic, and Treg cells were determined to be at similar percentages in patients and healthy individuals.

Discussion and Conclusion: These results suggest that the lymphocyte activation and inflammatory alterations of the central nervous system involved in MS pathogenesis cannot be determined in peripheral blood cell samples.

Keywords: B cell; multiple sclerosis; peripheral lymphocytes; T cell.

Multipl skleroz (MS), hastanın yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen nedeni kesin olarak bilinmeyen multifaktöryel kronik demiyelinizan bir hastalıktır. Merkezi sinir sisteminde (MSS) tekrarlayıcı demiyelinizasyonla seyreden, patofizyolojisinde otoimmünitenin ön planda olduğu otoimmün bir hastalıktır. MS'in ortaya çıkmasında lenfositlerin kan beyin bariyerini (KBB) geçip MSS'ye migrasyonunun inflamasyonu başlattığı düşünülmektedir [1]. MS'i tetikleyen unsurlar bilinmese de, MSS yapılarına karşı gelişen otoreaktif T hücreleri ve antikörlerin, inflamasyon ve doku hasarının oluşmasında temel patojenik rolü oynadığına inanılmaktadır. MS'te T lenfositlerin, myeline karşı reaksiyon gösterdikleri ve mikroglia hücreleri ile makrofajları aktive edip, miyelin kılıfı hasarlayarak sinir iletilerinde hasara sebep olmaktadır [2].

Çalışmamızda, remisyondaki MS hastalarında periferik kan lenfosit dağılımı belirlenerek MSS'de meydana gelen değişikliklerin perifere yansımaları değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem

Hasta ve Sağlıklı Olgular

Çalışmaya takipli ataklı-yineleyen (RRMS) formda 25 remisyonda MS hastası (20 kadın, 5 erkek; yaş 26.9 ± 7.7 ; MS süresi $9.2 \text{ yıl} \pm 2.5$; yıllık atak sayısı 2.1 ± 0.2 ; EDSS 1.9 ± 1.2) ve 11 sağlıklı kişi (8 kadın, 3 erkek, Yaş: 30.6 ± 5.9) alındı. Hastaların 16'sı interferon beta ve 9'u glatiramer asetat tedavisi altındaydı. Hastalardan hiçbiri steroid tedavisi almıyordu.

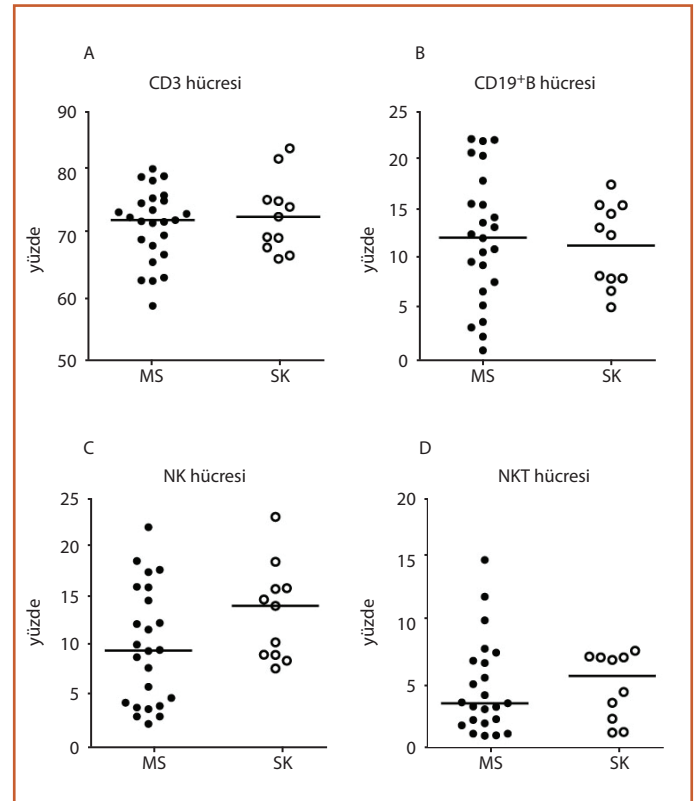
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul onaylı bu çalışmada donörlerin onayları alınarak çalışmaya ait gönüllü olur formu okutuldu ve imzaları alındı.

Akan Hücre Ölçerinde Lenfosit Alt Grupların Saptanması

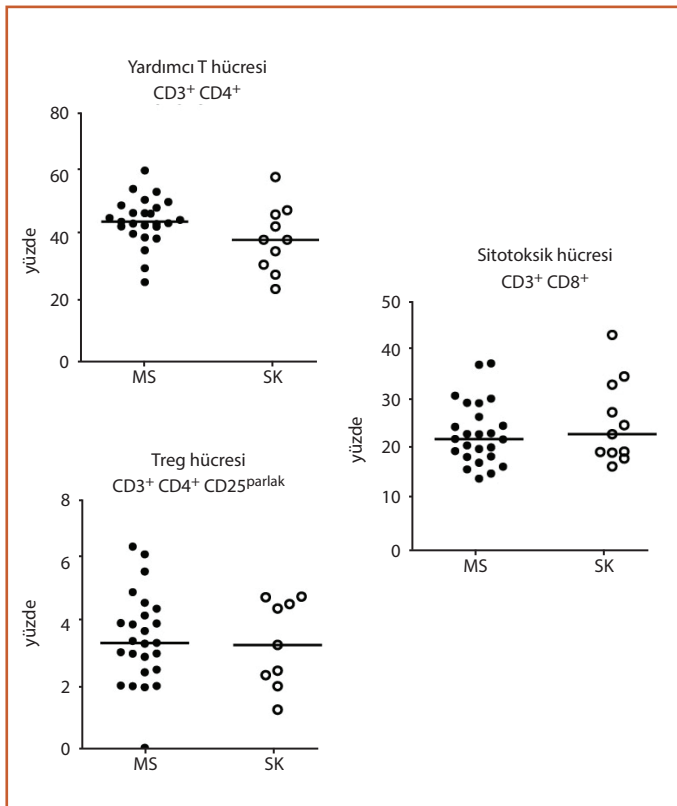
MS hastaları ve sağlıklı kişilerden EDTA'lı tüpe alınan periferik kan lenfositleri hücre yüzey belirteçlerine özgü floresan işaretli antikörler ile tam kan yüzey boyaması metodu ile boyandı ve akan hücre ölçerlerde değerlendirildi. Bunun için anti-human CD3-PE, anti-human CD4-FITC, anti-human CD8-APC, anti-human CD25-APC kullanıldı (BD Biosciences ABD). Akan hücre ölçer tüpüne 100 µl kan ve floresan işa-

retli monoklonal antikörler 20 µl konularak 20 dakika oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi. Eritrositleri patlatmak için liziz tamponu (BD FACS lysing solution BD Biosciences ABD) ile 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate buffered saline-PBS) ile 1500 rpm'de 5 dak +4°C'de santrifüj yapılarak hücreler yıkandı ve üzerine okuma tamponu (150 µl PBS ve 150 µl %2 paraformaldehid) eklendi.

Periferik kan hücrelerinin net sayısını belirlemek için ise Trucount tüpleri (BD Biosciences ABD) ve karışımı (anti-human CD3-FITC, CD16/56-PE, CD45-PerCP, CD19-APC, BD Biosciences ABD) kullanıldı. Öncelikle karışımdan 10 µl tüpe eklendi ve üzerine ters pipetaj ile 50 kan konuldu. Oda sıcaklığında 15 dakikalık inkübasyon sonrası liziz tampon eklenerek tekrar 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İşaretlenmiş örnekler dört renkli akan hücre ölçer (FACSCa-



Şekil 1. MS hastaları ve sağlıklı kişilerde T, B, NK ve NKT hücrelerinin dağılımı.



Şekil 2. MS hastaları ve sağlıklı kişilerde T hücre alt gruplarının dağılımı.

libur, Becton Dickinson Immuno Systems San Jose ABD) ile okutuldu, lenfosit kapısında en az 50000 hücre olacak şekilde veriler kayıt edildi. Hücre gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan veri analizlerinde Cell Quest (BD Biosciences ABD) ve FlowJo 7.6.5 yazılım programları kullanıldı.

İstatistiksel analiz için parametrik olmayan Mann Whitney U testi uygulandı, SPSS 21 program paketi kullanıldı.

Bulgular ve Tartışma

MS etyopatogenezinde oldukça önemli yer tutan T lenfositlerin inflamatuvar ve anti-inflamatuvar özellikleri olan alt grupları bulunmaktadır. Bu çalışmada akan hücre ölçer ile remistondaki MS hastalarının periferik kan CD3+ T hücre, CD4+ yardımcı T hücre, CD8+ sitotoksik T hücre, CD3+CD4+CD25 parlak düzenleyici T (Treg) hücre, gibi T hücre ve alt gruplarının yanısıra CD19+ B hücre, CD16+CD56+ doğal öldürücü (NK) hücre, CD3+CD56+ NKT hücre grupları da değerlendirildi. Hücre grupları yüzde olarak belirlendi ve sağlık kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Yapılan pekçok çalışma, CD4+/CD8+ hücre oranlarını MS hastaları ile kontroller kıyaslandığında ilaç tedavisine göre farklı olduklarını göstermiştir [3,4]. T ve B lenfositlerinin has-

ta ve sağlıklı kişilerde yüzdeleri oldukça yakın iken hastalarda innate immün sistem elemanı olan NK ve NKT hücre gruplarında hastalar lehine gözlenen azalma anlamlı seviyede değildi (Şekil 1). Sağlıklı kişilerin sayısının az oluşu da burada anlamlı fark oluşmasını engel olmuş olabilir. Yine yardımcı, sitotoksik ve düzenleyici T hücreleri hasta ve sağlıklı kişilerde benzer seviyelerdeydi (Şekil 2). MS hastalarında yapılan benzer bir çalışmada ise CD3+CD4+ hücrelerinin hastalarda anlamlı olarak düşük olduğu, CD3+CD16+CD56+ hücrelerinin ise anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir [5].

Bu bulgular bize MS hastalığında beyinde görülen immünojenik değişikliklerin aslında tam da periferik kana yansımadağını göstermektedir. MS hastalarının remisyonda ve ilaç tedavisi altında olmaları gibi sebeplerle periferik kan lenfosit alt popülasyonu temelli bir tanı ve prognoz biyobelirtecini tanımlanma olasılığı düşüktür. Gelecekteki çalışmalarda çalışma grubunun sayılarının artırılması ve belirlenen hücre gruplarına ait alt grup analizlerinin yapılması bu amaca yönelik periferik kan hücre alt tiplerinin bulunmasına yardımcı olabilir. Ayrıca atak sırasında periferik kan immünofenotiplerinin değerlendirilmesi yararlı olacaktır.

Etik Komite Onayı: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Hasta Onayı: Hastalardan yazılı onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Bildirilmemiştir.

Yazarlık Katkıları: Konsept: V.Y., R.T., Dizayn: V.Y., R.T., Veri Toplama veya İşleme: V.Y., C.U., Ö.M., S.A.Ç.; Analiz veya Yorumlama: V.Y., R.T.; Literatür Arama: V.Y., R.T.; Yazan: V.Y.

Kaynaklar

1. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006;354:942-55.
2. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
3. Harrer A, Pilz G, Wipfler P, Oppermann K, Sellner J, Hitzl W, et al. High interindividual variability in the CD4/CD8 T cell ratio and natalizumab concentration levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2015;180:383-92.
4. Rudnicka J, Czerwiec M, Grywalska E, Siwicka-Gieroba D, Walankiewicz M, Grafka A, et al. Influence of fingolimod on basic lymphocyte subsets frequencies in the peripheral blood of multiple sclerosis patients - preliminary study. *Cent Eur J Immunol* 2015;40:354-9.
5. Arnetz B. Activated CD4+ and CD8+ T Cell Proportions in Multiple Sclerosis Patients. *Inflammation* 2016;39:2040-4.