

SWAP-70 Antikoru Pozitif Multipl Skleroz Serum Antikorlarının İntraventriküler Uygulamasının Motor Aktivite ve Beyin Histolojisine Etkileri

Impact of Intraventricular Administration of SWAP-70 Antibody Positive Multiple Sclerosis Serum Antibodies on Motor Activity and Brain Histology

Recai Türkoğlu¹ , Canan Ulusoy² , Vuslat Yılmaz² 

¹Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Türkoğlu R, Ulusoy C, Yılmaz V. Impact of Intraventricular Administration of SWAP-70 Antibody Positive Multiple Sclerosis Serum Antibodies on Motor Activity and Brain Histology. Experimed 2018; 8(1): 7-10.

ÖZ

Amaç: SWAP-70 antikoru yakın zaman önce multipl skleroz (MS) olgularında gösterilmiş ve hastalığın prognozu ile ilişkili oldukları bulunmuştur. Bu antikorumun sinir sistemi üzerine olan olası etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: SWAP-70 antikoru pozitif ve negatif olan dörder MS olgusunun ve 5 sağlıklı olgusunun serum havuzlarından IgG saflaştırıldı ve farelerin yan ventriküllerine uygulandı (her grup için n=10).

Bulgular: Tedavi grupları arasında motor aktivite testi ile değerlendirilen kas gücü açısından fark saptanmadı. Benzer şekilde farklı IgG grupları arasında beyin immünohistokimya özellikleri açısından fark bulunamadı.

Sonuç: Bu pasif transferle oluşturulan MS hayvan modelinde MS IgG'sinin belirgin bir nörotoksik veya nörokoruyucu etkisi gösterilemedi.

Anahtar Kelimeler: Multipl skleroz, IgG, lokomotor aktivite, santral sinir sistemi, histoloji

ABSTRACT

Objectives: Antibodies directed against SWAP-70 have been recently identified in multiple sclerosis (MS) patients and found to be associated with disease prognosis. Our aim was to find out the potential actions of these antibodies on the nervous system.

Material and Method: Purified IgG was obtained from pooled sera from 4 each MS patients with and without SWAP-70 antibodies and 5 healthy controls and administered into lateral ventricles of mice (n=10 for each group).

Results: There were no significant differences among treatment groups by means of muscle strength, which was evaluated by motor activity test. Similarly, no significant differences could be found in brain immunohistochemistry examinations among different IgG groups.

Conclusion: Our results argue against a profound neurotoxic or neuroprotective action of MS IgG on neurons in this passive transfer animal model of MS.

Keywords: Multiple sclerosis, IgG, locomotor activity, central nervous system, histology

GİRİŞ

Multipl skleroz (MS) santral sinir sisteminin kronik demyelinizan ve nörodejeneratif bir hastalıdır. Myelin proteinlerini tanıyan T hücreleri MS patogenezinin en önemli faktörleri olarak gösterilmekle beraber B hücrelerinin ve ilişkili humoral faktörlerin de hastalık patogenezinde önemli rol oynadığı artık bilinmektedir (1, 2). İntratekal IgG üretiminin varlığı, MS lezyonlarında IgG birikintilerinin oluşması ve antikor temizleyici tedavi yöntemlerinin bazı MS olgu-

larında iyileştirici olduğunun gösterilmesi antikorumun MS hastalığının klinik ilerleyişini kontrol ettiğini düşündüren faktörlerdir (1, 2).

Beyin cDNA ekspresyon kütüphanelerinin kullanıldığı protein makroarray tarama çalışmaları "switch-associated protein 70" (SWAP-70) antikorumun MS olgularının serum örneklerinde yaygın olarak bulunduğunu gösterdi (3). Daha da önemlisi bu antikorum MS atakları sırasında daha yüksek oranda pozitif bulunuyor ve daha düşük özürüllük skorlu hastalarda bu-

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Recai Türkoğlu **E-mail:** recaiturkoglu@yahoo.com

Geliş Tarihi/Received Date: 25.04.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 25.04.2018 **Çevrimiçi Yayın Tarihi/Available Online Date:** 30.04.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

lunma eğilimi gösteriyordu (4-6). SWAP-70, bir protein kompleksinin parçası olup immunoglobulin ağır zincir geninin dönüşüm bölgeleri arasındaki DNA rekombinasyonunu katalizler (3). Ayrıca SWAP70'in sinyal ileti proteinlerinin özelliklerine sahip olduğu, hücre içi yollarını aktive edebileceği ve bazı durumlarda hücre membranında ifade edilerek hücre içi yolak sinyalizasyonunda da yer aldığı düşünülmektedir (7). SWAP-70 molekülünü nöron işlevlerine olan katkısı iyi bilinmemektedir.

Bu çalışmada MS olgularında iyi prognozla ilişkisi gösterilen SWAP-70 antikorlarının intratekal uygulamasının santral sinir sistemi işlevleri üzerine olan olası etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaca uygun olarak SWAP-70 antikorunu pozitif ve negatif olan MS olgularının serum antikorları saflaştırılarak yabani tip farelerin ventriküllerine uygulandı. Farklı antikorlarla muamele edilen farelerin motor aktiviteleri ve santral sinir sistemi histolojik özellikleri karşılaştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Olgular ve SWAP-70 Antikor Ölçümü

Revize 2017 McDonald kriterlerini dolduran ve henüz progresif evreye girmemiş 8 MS olgusunun serum örneği kullanıldı. Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet olarak MS olgularına benzer özellikler taşıyan 5 olgusunun serumları kullanıldı (Tablo 1).

SWAP-70 antikorları E.coli tarafından üretilen rekombinan SWAP-70 proteininin kullanıldığı indirekt ELISA yöntemiyle önceki yayınlarda belirtildiği şekilde yapıldı (4-6). SWAP-70 antikorunu pozitif olguların serum antikor düzeylerinin (OD cinsinden) sağlıklı olguların ve seronegatif MS olgularının ortalama OD değerlerinin iki standart sapma üzerinde olduğu gözlemlendi.

Serum örnekleri deney anına kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Çalışma için gerekli etik kurullardan onay alındı ve çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklılardan imzalı onam belgesi elde edildi.

IgG Saflaştırılması

IgG örnekleri sağlıklı ve MS olgularından protein-A-sefaroza CL-4B kolonu (Sigma, St. Louis, MO) ile önceki çalışmalarda

belirtildiği şekilde saflaştırıldı (8, 9). 1 mL serum 0.5 ml protein A-sefaroza ile 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Serumun uzaklaştırılmasının ardından IgG 0.05 M pH 3.0 sitrat tamponu ile ekstrakte edildi ve pH 8.8 1.5 M Tris-tamponu ile nötralize edildi. IgG içeren solüsyon PBS içinde diyalizden geçirilerek filtre ile sterilize edildi. IgG varlığı jel elektroforezinde 45-55 kDa ağır zincir ve 25-35 kDa hafif zincir IgG bantlarının gösterilmesi ile doğrulandı. IgG solüsyonlarının protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçüldü. Uygulanacak IgG konsantrasyonu 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde solüsyonlar steril PBS ile sulandırıldı.

Fareler ve İntraventriküler IgG Uygulaması

Yabani tip erkek C57BL/6 (B6) fareleri (6-8 hafta yaşında) kullanıldı. Deneylerin başlamasından 1 hafta önce fareler deney odasında bekletildi ve ortama alışmaları sağlandı.

Antikor pozitif MS grubu, antikor negatif MS grubu ve sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 3 deney grubu için grup başına 10 erkek fare kullanıldı. Her uygulamada 10 μL IgG solüsyonu enjeksiyon yoluyla ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile derin anestezi verildi ve sonra fareler stereotaksik çerçeveye yerleştirildi. Sağ lateral ventriküle yerleştirilen bir kanüle bağlanan Hamilton şırıngası ile IgG örnekleri uygulandı.

Kanülün yerleştirilme işleminden sonraki altıncı günde bazal motor aktivite testi değerlendirilmeleri yapıldı. Ardından 24 gün boyunca üç günde bir IgG enjeksiyonu yapıldı. Uygulamaların sonrasında motor aktivite testi tekrar yapıldı. Tüm motor değerlendirmeler sabah 9.00 ile 11.00 arasında gerçekleştirildi.

Motor Aktivite Testi

Farelerin motor aktivitesi motor aktivite monitorizasyon cihazı ile ölçüldü. Bilgisayara bağlı olan kare şeklindeki alanın (45x45 cm) tabanı dokunma sensörlü olup farenin hareketlerini bilgisayara bir yazılım aracılığıyla aktarmaktadır. Bilgisayar programı tarafından, bu bilgi, alanın hangi tarafında, ne kadar süre boyunca, kaç cm yürüdüğünü ve hareket ve dinlenme yüzdelerini kullanıcıya sunmaktadır. Deneye başlamadan önce tüm deney hayvanları 2 hafta süreyle motor aktivite alanına alıştırdı. Deney sırasında fareler bu alan içinde 5 dakika kadar tutulup hareketleri program aracılığıyla kayıt altına alındı.

İmmünohistokimya

IgG uygulama ve motor aktivite testlerinin ardından farelerin beyin örnekleri parafin bloklara gömüldü ve 10 μm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemlerinin ardından beyin kesitleri hematoksilin-eozin boyası ile değerlendirildi. Glial aktivite ve kompleman aktivasyonu, sırasıyla anti-glial fibriler asitik protein (GFAP) (1:400 dilüsyon, Abcam, Cambridge, İngiltere) ve C3b (1:100 dilüsyon, Biorbyt, Cambridge, İngiltere) antikorlarının kullanıldığı immünohistokimya çalışmaları ile incelendi. GFAP ve C3b antikorlarının %10 keçi serumu içinde hazırlanan solüsyonları ile kesitler gece boyunca 4°C sıcaklıkta inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile yıkamanın ardından uygun biyotinli ikincil antikorlar (Abcam) ile inkübe edilen kesitlerde immün reaksiyon avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile elde edildi (9).

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen MS ve sağlıklı olguların demografik ve klinik özellikleri

	MS (n=8)	Sağlıklı (n=4)
Cinsiyet (kadın/erkek)	6/2	3/1
Yaş (ortalama \pm standart sapma)	37,3 \pm 7,9	39,2 \pm 6,2
EDSS (ortalama \pm standart sapma)	3,2 \pm 1,1	-
Hastalık süresi (yıl; ortalama \pm standart sapma)	6,3 \pm 1,7	-
BOS oligoklonal bant pozitifliği	6	-
EDSS: expanded disability status scale; BOS: beyin-omurilik sıvısı		

BULGULAR

Hastaların Özellikleri

Bütün çalışmalarda 8 MS olgusunun (6 kadın, 2 erkek; ortalama yaş±standart sapma, 37,3±7,9) ve 4 sağlıklı kontrol olgusunun (3 kadın, 1 erkek; ortalama yaş±standart sapma, 39,2±6,2) serumları kullanıldı. MS ve sağlıklı kontrol olgularının yaş ve cinsiyet özellikleri arasında anlamlı fark yoktu. MS olgularının ortalama özürüllük skoru 3,2±1,1, hastalık süresi 6,3±1,7 idi. Altı olgunun BOS incelemesinde patern 2 oluklonal bant saptandı. Serum alınması sırasında MS hastaları remisyonda idi ve immünsüpresan ilaç kullanmıyorlardı.

Motor Aktivite Sonuçları

Motor aktivite testinde SWAP-70 antikor pozitif serum, antikor negatif serum ve sağlıklı serum IgG uygulanan farelerin hareket yüzdesi ve test süresince kat ettikleri mesafe ölçüldü. Antikor pozitif IgG uygulanan grubun, antikor negatif IgG uygulanan grubun ve sağlıklı IgG uygulanan grubun hareket yüzdeleri sırasıyla %42,5±4,7, %39,4±3,1 ve %41,4±5,2 idi. ANOVA testi ile gruplar arasında anlamlı fark saptanamadı ($p>0,05$). Kat edilen mesafeler ise antikor pozitif IgG uygulanan, antikor negatif IgG uygulanan ve sağlıklı IgG uygulanan gruplarda 5,2±0,8, 5,4±0,3 ve 4,9±0,5 cm olarak ölçüldü. Bu parametre için de ANOVA testi ile gruplar arasında anlamlı fark saptanamadı ($p>0,05$).

Beyin Doku Çalışmaları

IgG uygulanan farelerin beyinlerinin her iki hemisferi ayrıntılı olarak hematoksilin-eozin boyaması ile incelendi ve nöronal yıkımın ve immünolojik infiltratların varlığı araştırıldı. Farklı olgu gruplarına ait IgG örneklerine maruz bırakılan farelerin beyin dokularında herhangi bir patolojik değişiklik saptanamadı. Tüm gruplarda kanüllerin beyin dokusuna girdiği bölgede korteks alanlarında minimal hücresele infiltrasyon gözlemlendi. Glial hücre aktivitesi tüm beyin bölgelerinde birbirine benzerdi. Bu bulgu MS serum antikorlarının glial aktivite artışına sebep olmadığını gösterdi. Benzer şekilde aktif C3 faktörü yıkım ürünü olan C3b depozitleri de incelenen beyin dokularında gözlenemedi. Bu bulgu da SWAP-70 antikorunun kompleman sistemini aktive etmediğini düşündürdü.

TARTIŞMA

MS olgularında B hücre temelli hastalık mekanizmalarının önemi giderek artan bir şekilde anlaşılmaktadır. B hücrelerini hedef alan tedavi yöntemlerinin klinik progresyonu engelleme- si B lenfositlerin MS patogenezindeki önemini daha da belirgin bir şekilde ön plana çıkarmıştır. MS olgularında tanımlanan serum antikorlarının sayısı da gün geçtikçe artmaktadır (10). Bu antikorlardan neurofascin antikorlarının intraventriküler uygulamasının deney hayvanlarında aksonal dejenerasyon ve kompleman aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir.

SWAP-70 antikorlu çeşitli çalışmalarda iyi prognozla ilişkilendirilmiş ve bu antikora sahip MS hastalarının özürüllük düzeylerinin düşük kalma eğiliminde olduğu ve SWAP-70 antikorunun MS gelişimini sınırlayan anti-inflamatuar sitokin üretimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (4-6). SWAP-70 antikoruna eklenen

periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde işlevsel değişiklikler saptanması SWAP-70 antikorunun hedef molekülüne bağlanabildiğini ve anti-inflamatuar etkilerini bu şekilde gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. SWAP-70 molekülünün santral sinir sisteminde de anlatımının bulunduğu ve nöron gelişimi ve myelin yapımına etkileri olduğu bilinmektedir (11).

Bu bilgiler ışığında SWAP-70 antikorlarının bağımsızlığı sistemi hücrelerinin yanı sıra sinir sistemi hücreleri üzerine de etkilerde bulunarak MS progresyonuna katkıda bulunabileceğini düşündük. Bu varsayımı sınamak amacıyla serum antikorlarının pasif transferi temeline dayanan bir deneysel MS hayvan modeli geliştirdik. Bu model geçmişteki çalışmalarda nöro-Behçet hastalarının serum antikorlarının motor aktivite ve beyin histolojisine olan etkilerinin araştırılması için kullanılmıştır (9). Bununla beraber çalışmamızda SWAP-70 antikorlu içeren veya içermeyen MS serum antikorlarının farelerde klinik veya histolojik bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir. Bulgularımız SWAP-70 antikorlarının MS hastalığı üzerine olan etkilerinin sinir sistemi hücrelerinden bağımsız olarak geliştiğini düşündürmüştür. Bununla beraber SWAP-70 antikorlarının motor sistem dışındaki nörolojik belirtilerle ilişkisinin olması ve farklı nöronal-gliyal işlevlerde görev alması mümkündür. Bu sebeple SWAP-70 antikorlarının gerçek potansiyelinin anlaşılabilmesi için primer nöron kültür hücrelerinin kullanıldığı ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır (2012/66-913).

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - R.T., V.Y.; Tasarım - R.T., V.Y.; Denetleme - R.T., V.Y.; Kaynaklar - C.U., V.Y.; Gereçler - C.U., V.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - R.T., C.U., V.Y.; Analiz ve/veya Yorum - R.T., V.Y.; Literatür Taraması - R.T., C.U., V.Y.; Yazıyı Yazan - R.T., C.U., V.Y.; Eleştirel İnceleme - R.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 23979).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of Istanbul University School of Medicine (2012/66-913).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from the patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - R.T., V.Y.; Design - R.T., V.Y.; Supervision - R.T., V.Y.; Resource - C.U., V.Y.; Materials - C.U., V.Y.; Data Collection and/or Processing - R.T., C.U., V.Y.; Analysis and/or Interpretation - R.T., V.Y.; Literature Search - R.T., C.U., V.Y.; Writing - R.T., C.U., V.Y.; Critical Reviews - R.T.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This work was supported by the Research Fund of the İstanbul University (Project number: 23979).

KAYNAKLAR

1. Pröbstel AK, Sanderson NS, Derfuss T. B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 16576-92. [\[CrossRef\]](#)
2. von Büdingen HC, Palanichamy A, Lehmann-Horn K, Michel BA, Zamvil SS. Update on the autoimmune pathology of multiple sclerosis: B-cells as disease-drivers and therapeutic targets. *Eur Neurol* 2015; 73: 238-46. [\[CrossRef\]](#)
3. Vural B, Demirkan A, Ugurel E, Kalaylioglu-Wheeler Z, Esen BA, Gure AO, et al. Seroreactivity against PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in Turkish patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27(2 Suppl 53): S67-72.
4. Türkoğlu R, Özyurt S, Ulusoy C, Erdağ E, Tüzün E. Expression of switch-associated protein 70 is associated with lymphocyte activation and reduced disability in multiple sclerosis. *Immunol Lett* 2016; 177: 75-7. [\[CrossRef\]](#)
5. Türkoğlu R, Gencer M, Ekmekçi D, Ulusoy C, Erdağ E, Sehitoğlu E, et al. Switch-associated protein 70 antibodies in multiple sclerosis: possible association with disease progression. *Med Princ Pract* 2014; 23: 239-45. [\[CrossRef\]](#)
6. Erdağ E, Tüzün E, Uğurel E, Cavuş F, Sehitoğlu E, Giriş M, et al. Switch-associated protein 70 antibodies in multiple sclerosis: relationship between increased serum levels and clinical relapse. *Inflamm Res* 2012; 61: 927-30. [\[CrossRef\]](#)
7. Vural B, Demirkan A, Ugurel E, Kalaylioglu-Wheeler Z, Esen BA, Gure AO, et al. Seroreactivity against PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in Turkish patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27(2 Suppl 53): S67-72.
8. Giriş M, Bireller S, Küçükali Cİ, Hanağasi H, Değirmencioğlu S, Tüzün E. Impact of Neuro-Behçet disease immunoglobulin G on neuronal apoptosis. *Noro Psikiyatrs Ars* 2017; 54: 67-71. [\[CrossRef\]](#)
9. Erdağ E, Şahin C, Küçükali Cİ, Bireller S, Küçükkerden M, Kürtüncü M, et al. Effects of in vivo and in vitro administration of neuro-Behçet's disease IgG. *Neurol Sci* 2017; 38: 833-43. [\[CrossRef\]](#)
10. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2015; 161: 51-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Takada N, Appel B. swap70 promotes neural precursor cell cycle exit and oligodendrocyte formation. *Mol Cell Neurosci* 2011; 48: 225-35. [\[CrossRef\]](#)