

## Otoimmün Demiyelinizan Hasta Serumlarının Beyin Perisitlerinin Sağkalımına Etkisi

### Impact of Autoimmune Demyelinating Brain Disease Sera on Pericyte Survival

Canan ULUSOY<sup>1</sup>, Emine ŞEKERDAĞ<sup>2</sup>, Vuslat YILMAZ<sup>1</sup>, Aysu Bilge YILMAZ<sup>2</sup>, Dila ATAK<sup>2</sup>, Atay VURAL<sup>2</sup>, Cem İsmail KÜÇÜKALİ<sup>1</sup>, Zerrin KARAASLAN<sup>1</sup>, Murat KÜRTÜNCÜ<sup>3</sup>, Recai TÜRKÖĞLU<sup>4</sup>, Yasemin GÜRİSOY ÖZDEMİR<sup>2</sup>, Erdem TÜZÜN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Koç Üniversitesi, KUTTAM, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji, Anabilim Dalı İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

#### ÖZ

**Amaç:** Multipl skleroz (MS) merkezi sinir sisteminin (MSS) otoimmün demiyelinizan hastalığıdır. Son yıllardaki bulgular beyin perisit disfonksiyonunun MS patogenezinde yol oynayabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada amacımız MS'nin perisit sağkalımına etkilerini ortaya koymaktır.

**Yöntem:** MS hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) modelini oluşturmak için, 8-10 haftalık C57BL/6 dişi fareler miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ile immünize edildi. Deneysel hayvan modelinin başarılı bir şekilde oluştuğunu doğrulamak için fareler klinik olarak gözlemlendi ve kanları alınarak serumlarında anti-MOG antikorunu taraması yapıldı. Hücre kültürü ortamında, insan beyin damarsal perisit (İBDP) ile DOE fare ve insan MS hastası serumları (yineleyici MS, sekonder progresif MS ve primer progresif MS hastaları dâhil edilmiştir.) Yirmi dört saat inkübe edildi. Perisitlerin hücre canlılık durumu Annexin V-FITC/propidium iyodid (PI) ile akım sitometrisinde değerlendirildi. Ayrıca MS

hastaları serumunda perisitlerin fonksiyonu için önemli olan trombosit kaynaklı büyüme faktörü düzeyi ELISA yöntemi ile ölçüldü.

**Bulgular:** DOE ve progresif tip MS serumları ile inkübe olan perisitlerin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek oranlarda erken apoptoza girdiği ve buna bağlı olarak canlılık yüzdelilerinin düştüğü görülmüştür. Farklı MS tiplerine sahip hasta ve sağlıklı kontrollerin serum ve beyin omurilik sıvılarından trombosit-kaynaklı büyüme faktörü seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

**Sonuç:** Elde ettiğimiz bulgular progresif tip MS hastalarının serumlarındaki birtakım faktörlerin perisit disfonksiyonuna sebep olarak MS patogenezinde katkı yaptığını düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Multipl skleroz, perisit, apoptoz, demiyelinizasyon, otoimmünite

#### ABSTRACT

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination and brain pericyte dysfunction might be involved in MS pathogenesis. Our aim was to evaluate whether the factors in serum affect pericyte survival.

**Method:** C57BL/6 female mice were immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) to induce experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). To confirm the animal model, the sera level of anti-MOG antibody in mice and platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in patients was measured by ELISA. Human brain vascular pericytes (HBVP) cell lines were incubated with sera of EAE mice and primer progressive MS (PPMS), seconder progressive MS (SPMS) and relapsing-remitting MS (RRMS) patients. The viability of HBVP is

measured with Annexin V-FITC/propidium iodide staining with flow cytometry.

**Results:** Annexin V-FITC/propidium iodide staining with flow cytometry showed increased ratios of early apoptosis and decreased survival following incubation with sera of EAE and progressive MS. Levels of platelet-derived growth factor-BB were identical in serum and cerebrospinal fluids of patients with different forms of MS.

**Conclusion:** Our results suggest that serum factors might contribute to progressive MS pathogenesis via pericyte dysfunction.

**Keywords:** Multiple sclerosis, pericytes, apoptosis, demyelination, autoimmunity

**Cite this article as:** Ulusoy C, Şekerdağ E, Yılmaz V, Yılmaz AB, Atak D, Vural A, Küçükali Cİ, Karaaslan Z, Kürtüncü M, Türkoğlu R, Gürsoy Özdemir Y, Tüzün E. Otoimmün Demiyelinizan Hasta Serumlarının Beyin Perisitlerinin Sağkalımına Etkisi. Arch Neuropsychiatry 2021;58:83-86.

#### GİRİŞ

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) otoimmün demiyelinizan bir hastalığıdır. MS'te otoimmünitenin genellikle periferik bağışıklık sisteminin uyarılması ile başladığı ve daha sonra kan beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğünün bozulması dahil olmak üzere çeşitli karmaşık mekanizmalar yoluyla MSS'yi etkilediği düşünülmektedir (1).

Beyin perisitleri, KBB sisteminin önemli bir bileşenidir ve KBB gerçenliğini vasküler düz kas kasılması ile düzenlediği bilinmektedir (2, 3). Son çalışmalar beyin perisitlerinin ayrıca lökosit infiltrasyonu, mikrogliya polarizasyonu ve adaptif immünite regülasyonu yoluyla nöroimmünolojik hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceğini göstermiştir (4).

**Yazışma Adresi:** Canan Ulusoy, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye • E-posta: canan.ulusoy@istanbul.edu.tr

**Geliş Tarihi:** 27.07.2020, **Kabul Tarihi:** 07.10.2020, **Çevrimiçi Yayın Tarihi:** 26.01.2021

©Telif Hakkı 2020 Türk Nöropsikiyatri Derneği • Makale metnine www.noropskiyatrisiarsivi.com web sayfasından ulaşılabilir

Kronik inflamasyona bağlı diyabetik retinopatide retina perisitlerinin apoptozunun arttığını göstermiştir (5, 6). Ayrıca, post-mortem MS hastalarındaki MS lezyonlarına bakıldığında, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptör beta (PDGFR $\beta$ ) ekspresyonu dahil olmak üzere, perisitlerin fenotipik özelliklerine sahip hücrelerin lezyon bölgelerinde arttığı gösterilmiştir (7).

Bu çalışmada MS serum faktörlerinin perisit canlılığını değiştirip değiştiremeyeceğini ve böylelikle KBB bozulmasına ve MSS antijenlerini hedefleyen bağışıklık sistemi elemanlarının erişiminin artmasına yol açıp açmayacağı sorularına yanıt aranmaktadır. Bu soruların cevaplarını araştırmak için; ticari olarak temin edilebilen insan beyin vasküler perisit hücreleri (İBDP), deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) olan fare ve MS insan serumlarıyla inkübe edildi ve perisitlerin erken ve geç apoptoz oranları analiz edildi.

## YÖNTEM

### Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) modelinin oluşturulması

Sekiz ila on haftalık dişi C57BL/6 (B6) fareleri, çevresel olarak kontrol edilen standart koşullar altında barındırıldı. Bu proje yerel etik kurul tarafından onaylandı. DOE (n=14) için, tam Freund adjuvanında (CFA; Difco, Detroit, MI) emülsifiye edilmiş 200  $\mu$ g miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) 35-55 peptidin (Çoklu Peptid Sistemleri, San Diego, CA) subkütan enjeksiyonu ile fareler immunize edildi. Kontrol fareleri (n=5) sadece CFA ile immunize edilmiştir. Hem DOE hem de kontrol fareleri, immunizasyon gününde ve 48 saat sonra salin içinde 500 ng boğmaca toksini (PT; Sigma, St. Louis, MO) intravenöz uygulaması yapıldı. Ağırlık ve DOE klinik skorları (0 = sağlıklı, 1 = kısmi sarkık kuyruk, 2 = tam sarkık kuyruk, 3 = bir arka bacak parezi, 4 = bir arka bacak felci, 5 = iki arka bacak felci, 6 = arka bacaklarda felç ve parezi bir ön ayağın 7'si, 7 = arka bacakların felci ve bir ön ayağı, 8 = tetraparaliz, 9 = can çekişme, 10 = ölüm) önceden bildirilen bir klinik ölçek nedeniyle her iki günde bir kaydedilmiştir (8). Serumlar, deney sonlandırmadan önce ilk immunizasyondan 40 gün sonra toplandı.

### MS hasta seçimi

Otuz iki MS hastası (ortalama  $\pm$  standart sapma; 40,0 $\pm$ 10,9 yaşında, 19 kadın) ve 11 yaş-cinsiyet uyumlu sağlıklı kontrol (38,6 $\pm$ 14,1 yaşında, 6 kadın) çalışmaya dahil edildi. MS hastaları relapsing remitting (RRMS, n=13, F/M=7/6, EDSS=1,2 $\pm$ 0,5), sekonder progresif (SPMS, n=10, F/M=5/5, EDSS=5,8 $\pm$ 0,7) ve birincil ilerleyen MS (PPMS, n=9, F/M=7/2, EDSS=5,4  $\pm$  0,8) (9). Katılımcıların hiçbirinde başka bir hastalık yoktu veya immünoterapi almıyordu. Tüm MS hastaları remisyondaydı. Ortalama hastalık süreleri (7,5 $\pm$ 3,2 yıl), EDSS skorları (3,2 $\pm$ 2,1) ve toplam atak sayıları (3,4 $\pm$ 2,1) kaydedildi. Yirmi hastada beyin omurilik sıvısına (BOS) özgü oligoklonal bantlar vardı. Çalışma, yerel etik kurulu tarafından onaylandı ve her bir katılımcıdan imzalı bir bilgilendirilmiş onay alındı.

### ELISA

EAE modelini doğrulamak için, EAE ve kontrol farelerin serumlarında ELISA ile anti-MOG antikor seviyeleri ölçüldü. MOG antijeni (1  $\mu$ g / mL), gece boyunca 4°C'de 0.1 M karbonat bikarbonat tamponu içinde 96 kuyulu mikrotitre plakaları üzerine kaplandı. Kuyruk damarından (1: 1000 seyreltme) elde edilen fare serum örnekleri (100  $\mu$ l) eklendi ve 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Yaban turpu peroksidazı (HRP) -konjuge anti-fare IgG'si (Abcam, Cambridge, UK) (1: 5000) ilave edildi ve sonra 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Daha sonra, peroksidaz gösterge substratı 3.3', 5.5'-tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi ilave edildi ve karışımın karanlıkta oda sıcaklığında renk oluşturmasına izin verildi. Plakalar 450 nm dalga boyunda okundu.

Plateletten türetilen büyüme faktörü-BB (PDGF-BB) seviyeleri, üreticinin kılavuzuna (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Çin) göre ELISA ile hastaların serumlarında ve BOS örneklerinde ölçüldü.

### Akım Sitometrisi

İBDP (5000 hücre / kuyu), perisit medyumuna (ScienCell, CA, ABD) ile 96 kuyulu poli-L-lizin kaplı plakalara ekildi. %70'lik hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, süpernatant uzaklaştırıldı ve üç tekrarlı olarak EAE fareleri, MS hastaları ve sağlıklı kontrollerin serumları (büyüme faktörleri olmayan perisit medyumunda 1:50 seyreltme) ile 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Önceden serum dilüsyonları 1:25, 1:50 ve 1: 100 ve inkübasyon süresi 16 saat-24 saat-36 saat olarak denendi. Deney, optimum ölü / canlı hücre oranının elde edildiği 1:50 ve 24 saatlik inkübasyonla devam edilmeye karar verildi. Hücreler daha sonra tripsinize edildi, hemen santrifüjlendi ve PBS içinde yeniden süspansiyon edildi. Anneksin V / propidium iyodür (PI) boyama ve akım sitometri prosedürleri, üreticinin talimatlarına göre (BD, New Jersey, ABD) 10000 hücre / kuyu ile gerçekleştirildi.

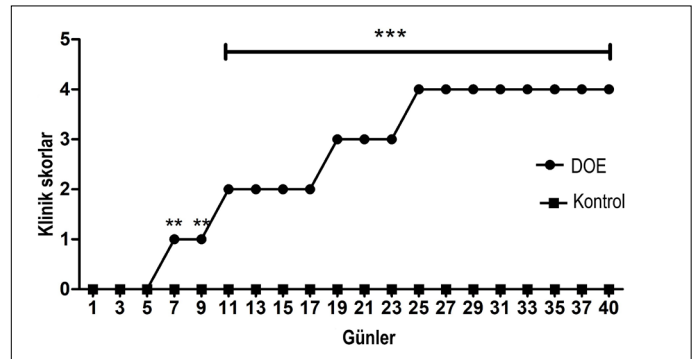
### İstatistiksel analiz

DOE klinik skorları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Akım sitometrisi ve ELISA sonuçları, Mann Whitney U veya Kruskal-Wallis (Dunn'in post-hoc analizi ile) testleri ile karşılaştırıldı. Korelasyon analizi için Spearman testi kullanıldı. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

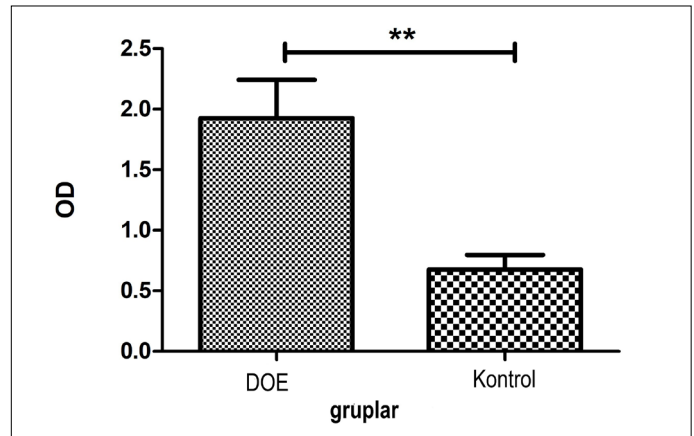
## BULGULAR

### DOE Modeli

7. günden başlayarak DOE farelerinde CFA kontrol farelerine göre anlamlı derecede daha yüksek klinik skorlar gözlemlendi (Şekil 1). Ayrıca DOE grubu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bir anti-MOG antikor serum seviyesi gösterdi (Şekil 2). EAE'nin, ayrıca immünohistokimya



Şekil 1. Deneysel otoimmün ensefalomyelitli (DOE) farelerin ve sadece tam Freund adjuvanı ile aşılmiş kontrol farelerinin klinik skor kinetiği (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).



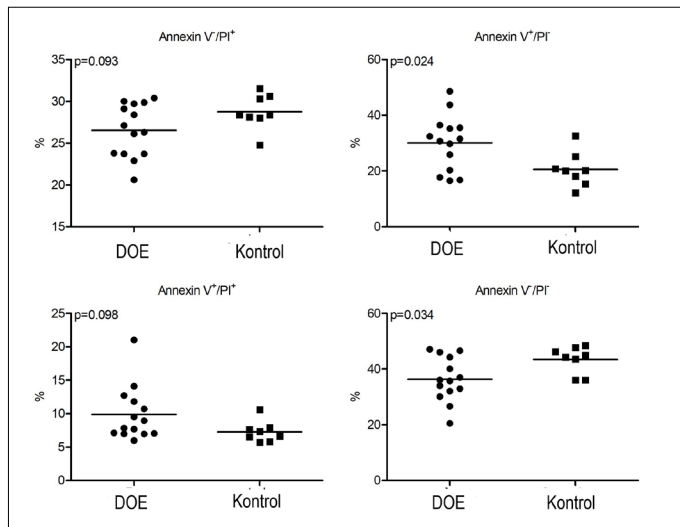
Şekil 2. ELISA ile serum anti-MOG antikor seviyeleri. Dikey çubuklar standart sapmaları gösterir ve OD, optik yoğunluğu belirtir (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

ile infiltre immün hücreler ile MSS lezyonlarının ve demiyelinazasyonun gösterilmesi ile de doğrulanmıştır (veriler gösterilmemiştir).

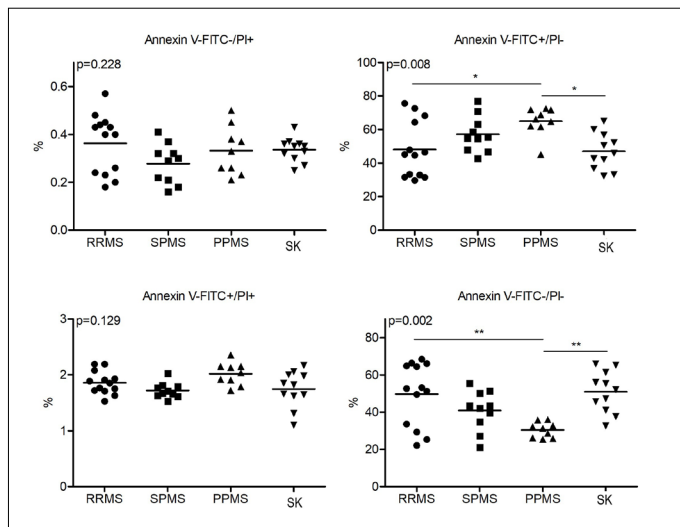
### DOE ve MS serumları, perisitlerde erken apoptozu indükler

DOE serumları ile inkübe edilen İBDP, kontrol serumları ile inkübe edilenlere göre ( $p=0,034$ ) anlamlı derecede azalmış hücre canlılığı (yani daha düşük Annexin V-/PI- hücreleri) gösterdi. Ayrıca erken apoptozlu hücrelerin yüzdesi (Annexin V+/PI-), DOE serumları ile inkübe edilen İBDP'de daha yüksekti ( $p=0,024$ ). Geç apoptozlu (Annexin V+/PI+;  $p=0,098$ ) ve nekrozlu (Annexin V-/PI+;  $p=0,093$ ) hücre oranları açısından DOE ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 3).

Benzer şekilde, PPMS serumu ile inkübe edilen İBDP'de, istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış erken apoptoz (Annexin V+/PI-;  $p=0,008$ )



**Şekil 3.** Deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) ile farelerin serumları ile inkübe edilmiş annexin V ve propidyum iyodür (PI) pozitif insan beyin vasküler perisitlerinin ve sadece tam Freund adjuvanı ile aşılanmış kontrol farelerinin yüzdeleri. Yatay çubuklar standart sapmaları gösterir. Mann-Whitney U testi ile elde edilen p değerleri, her panelin sol üst köşesinde gösterilir (Annexin V-/PI-, canlı hücreler; Annexin V+/PI-, erken apoptozlu hücreler; Annexin V+/PI+, geç apoptozlu hücreler; Annexin V-/PI+, nekrozlu hücreler).



**Şekil 4.** Tekrarlayan düzelen multipl skleroz (RRMS), sekonder progresif multipl skleroz (SPMS), birincil progresif multipl skleroz (PPMS) hastaları ve sağlıklı kontrollerin (SK). Yatay çubuklar standart sapmaları gösterir. Kruskal-Wallis testi ile elde edilen p değerleri her panelin sol üst köşesinde gösterilmiştir. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  Dunn'in post-hoc testi (Annexin V-/PI-, canlı hücreler; Annexin V+/PI-, erken apoptozlu hücreler; Annexin V+/PI+, geç apoptozlu hücreler; Annexin V-/PI+, nekrozlu hücreler).

ve azalmış hücre canlılığı (Annexin V-/PI-;  $p=0,002$ ) gözlemlenirken, geç apoptozlu hücrelerin oranları (Annexin V+/PI+;  $p=0,129$ ) ve nekroz (Annexin V-/PI+;  $p=0,228$ ) gruplar arasında benzerdi. SPMS serumları ile tedavi edilen hücreler, artan geç apoptoz ve azalan canlılık gösterme eğilimleri göstermesine rağmen, bu eğilimler istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı (Şekil 4).

### PDGF-BB seviyeleri MS'nin klinik özellikleriyle ilişkili değildir

Perisitlerin başlıca büyüme faktörlerinden biri olan PDGF-BB'nin MS serumları tarafından indüklenen perisit canlılık düzey değişikliğinde rolü olup olmadığını anlamak için, hastaların serum ve BOS'larında ELISA ile düzeyleri ölçüldü. RRMS ( $2007 \pm 520$  ng/L), SPMS ( $2401 \pm 815$  ng/L), PPMS ( $2387 \pm 886$  ng/L) ve sağlıklı kontrollerin ( $2387 \pm$ ) serumlarında PDGF-BB seviyeleri benzerdi ( $p=0,903$ )  $886$  ng/L ve RRMS ( $1926 \pm 166$  ng/L), SPMS ( $1805 \pm 52$  ng/L) ve PPMS ( $1736 \pm 61$  ng/L) hastalarının BOS'larında ( $p=0,417$ ). Serum/BOS PDGF-BB seviyeleri ile MS hastalarının yaş, EDSS, hastalık süresi ve toplam atak sayıları arasında anlamlı bir ilişki yoktu (gösterilmemiştir). Bununla birlikte, oligoklonal bantlı ( $n=20$ ) MS hastalarının BOS (ancak serum değil) PDGF-BB seviyeleri, olmayanlara göre ( $n=12$ ;  $1562 \pm 66$  ng/L,  $p=0,025$ ) yüksekti.

### TARTIŞMA

Çalışmamızda, DOE ve progresif MS serumları ile inkübe edilen İBDP, önemli ölçüde artmış erken apoptoz oranları ve azalmış hücre canlılığı oranları gösterdi. Bu bulgular, özellikle PPMS hastalarının ve MOG ile indüklenen DOE'li farelerin serumlarında apoptozu indükleyen faktör (ler) in varlığını gösterir. Bu nedenle, ön çalışmamız ilk kez progresif MS tiplerinde perisitlerin canlılığının henüz tanımlanmamış serum faktörlerinden olumsuz etkilenebileceğini gösterdi. Bu fenomen, BBB'nin bütünlüğünü bozabilir, MSS'de devam eden inflamasyonu ve demiyelinizasyonu artırabilir ve böylece MS prognozunu olumsuz etkileyebilir (10).

Özellikle, PPMS/DOE serumları, perisitlerin erken apoptozunu geç apoptoz ve nekrozdan daha fazla etkiledi. Nöronal apoptozun erken ve geç aşamaları, sırasıyla hücrel membran fosfatidilserin dışsallaştırmasını ve genomik DNA fragmentasyonunu içerir. Fosfatidilserin kalıntılarının açığa çıkması, apoptozun nispeten geri dönüşümlü bir aşamasını temsil eder ve mikrogial aktivasyonu ve pıhtılaşma kaskadını destekleyebilir (11). Ayrıca, perisitlerin PPMS/DOE serumlarına daha uzun süre maruz kalması da apoptozun geç aşamasını artırabilir. Dahası, Annexin V+/PI+ hücreleri sadece apoptozun geç aşamasını değil, aynı zamanda nekrozun erken aşamasını da temsil eder. Bu, MS/DOE serumu ile inkübe edilen perisitlerde geç apoptozda farklılık olmamasının bir başka nedeni olabilir. Bulgularımız doğrultusunda, DOE modelinin 40. gününde perivasküler perisit kaybı gösterilmiş olup, bu da DOE indüksiyonunun perisitler için toksik olan moleküllerin üretimini teşvik ettiğini düşündürmektedir (12). İlginç bir şekilde, immünizasyonun 20. gününde perisit sayısında benzer bir azalma gözlenmemiştir, bu da bu toksik elementlerin MOG aşılmasının bir geç safhası olduğunu göstermektedir. Özellikle, fibrinojen birikimi, ölüm sonrası ilerleyen MS beyin ve DOE modelinde gösterilmiştir. Fibrinojenin perisitler dahil glial hücrelerin hayatta kalmasını olumsuz etkilediği bilinmektedir (13).

Çalışmamızın sınırlılığı; sağlıklı kontrollerden BOS numunesi alınamamıştır ve çoğu hastanın BOS hacmi in vitro deneyler için yeterli değildir. Bu nedenle, MS hastalarının BOS'larının perisit sağkalımı üzerindeki etkisi gelecekteki çalışmalarda araştırılmalıdır.

PDGF-BB, perisitler tarafından bol miktarda eksprese edilen ve pro-rejeneratif etkiye sahip olduğu düşünülen PDGF reseptörlerine etki eden pleiotropik bir büyüme faktörüdür (14). Bu nedenle, DOE ve progresif MS serumlarında PDGF-BB'nin azlığı, perisit canlılığının azalmasına yol açan faktörlerden biri olabileceğini düşündük. Fakat, MS alt gruplarının serum/

BOS örnekleri arasında bir fark veya bu iddiaya karşı çıkan MS ve PDGF-BB'nin klinik özellikleriyle bir korelasyon bulamadık. Sonuçlarımız, MS'te artmış serum PDGF-BB seviyeleri veya PDGF-BB seviyeleri ile MS'nin nörogörüntüleme özellikleri arasında korelasyon bulmayan önceki bir raporla uyumludur (15). Bununla birlikte, BOS'a özgü oligoklonal bantlara sahip MS hastaları, daha yüksek BOS PDGF-BB seviyeleri gösterme eğilimi gösterdiler, bu da bu büyüme faktörünün intratekal B hücre proliferasyonunda veya antikor üretiminde rol oynayabileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak, sonuçlarımız progresif MS serumundaki faktör (ler) in perisitlerin canlılığını azaltarak BBB bozulmasına yol açabileceğini göstermektedir. Bu, MS'in ilerleyen formlarının gelişiminin altında yatan faktörlerden biri olabilir. Bu nedenle, bu fenomene neden olan faktör (ler) (örneğin, sitokinler, büyüme faktörleri, antikorlar vb.) daha ayrıntılı olarak açıklanmalıdır.

**Teşekkür:** Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: TYO-2020-35994), TÜBİTAK (Proje No: 116S552) ve İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi tarafından desteklenmektedir. Yazarlar, akış sitometrisi deneylerine yardımcı olduğu için Aziz Sancar Deneysel Tıp Enstitüsü İmmünoloji Bölümünden Abdullah Yılmaz'a teşekkür ediyor.

**Etik Komite Onayı:** Bu makalede açıklanan tüm deneysel prosedürlerin yürütülmesinde, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımında ve Kullanımında Yol Gösterici İlkeler'e bağlı kalınmıştır. Bu proje "İstanbul Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulu, İstanbul, Türkiye" ve "İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından onaylanmıştır (Onay tarihi: 10.07.2017).

**Hasta Onamı:** Çalışma, kurumsal inceleme kurulu tarafından onaylandı ve her katılımcıdan imzalı bir bilgilendirilmiş onay alındı.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış Bağlıdır.

**Yazar Katkıları:** Fikir - CU, EŞ, VY, ET, ÇİK, YGÖ; Tasarım - CU, EŞ, ET, YGÖ; Denetleme - ÇİK, YGÖ; Kaynaklar - ÇİK, YGÖ; Malzemeler - CU, EŞ, ZK, MK; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - CU, EŞ, VY, ABY, AV, ZK; Analiz ve/veya Yorum - CU, EŞ, VY, ET; Literatür Taraması - CU, ET; Yazıyı Yazan - CU, ET; Eleştirel İnceleme - VY.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların beyan edecek herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, TÜBİTAK (Hibe No: 116S552) ve TYO-2020-35994 tarafından desteklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to diseases pathogenesis. *Handb Clin Neurol* 2014;122:231-266. (Crossref)
- Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, Can A, Topalkara K, Dalkara T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrate stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* 2009;15:1031-1037. (Crossref)

- Stamatovic SM, Johnson AM, Keep RF, Andjelkovic AV. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers* 2016;4:e1154641. (Crossref)
- Rustenhoven, J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain pericytes as mediators of neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2017;38:291-304. (Crossref)
- Shin ES, Huang Q, Gurel Z, Palenski TL, Zaitoun I, Sorenson CM, Sheibani N. STAT1-mediated Bim expression promotes the apoptosis of retinal pericytes under high glucose conditions *Cell Death Dis* 2014;5:e986. (Crossref)
- Cai J, Kehoe O, Smith GM, Hykin P, Boulton ME. The Angiopoietin/Tie-2 System Regulates Pericyte Survival and Recruitment in Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2163-2171. (Crossref)
- Iacobaeus E, Sugars RV, Törngvist AA, Alm JJ, Quian H, Frantzen J, Newcombe J, Alkass K, Druid H, Bottai M, Røytta M, Le Blanc K. Dynamic changes in Brain mesenchymal perivascular cells associated with multiple sclerosis disease duration, active inflammation, and demyelination. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:1840-1851. (Crossref)
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* 2014;86:51275. (Crossref)
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302. (Crossref)
- Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 1998;53:637-644. (Crossref)
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:277-287. (Crossref)
- Girolamo F, Errede M, Longo G, Annesse T, Alias C, Ferrara G, Morando S, Trojano M, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, Virgintino D. Defining the role of NG2-expressing cells in experimental models of multiple sclerosis. A biofunctional analysis of the neurovascular unit in wild type and NG2 null mice. *PLoS One* 2019;14:e0213508. (Crossref)
- Bhattacharya A, Kaushik DK, Lozinski BM, Yong VW. Beyond barrier functions: Roles of pericytes in homeostasis and regulation of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 2020. (Crossref)
- Shibahara T, Ago T, Nakamura K, Tachibana M, Yoshikawa Y, Komori M, Yamanaka K, Wakisaka Y, Kitazono T. Pericyte-Mediated Tissue Repair through PDGFRβ Promotes Peri-Infarct Astroglial Oligodendrogenesis, and Functional Recovery after Acute Ischemic Stroke. *eNeuro* 2020;7:ENEURO.0474-19.2020. (Crossref)
- Su JJ, Osoegawa M, Matsuoka T, Minohara M, Tanaka M, Ishizu T, Mihara F, Taniwaki T, Kira J. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. *J Neurol Sci* 2006;243:21-30. (Crossref)