

In Vitro Ortamda Multipl Skleroz Hastalarına Ait Serum ile İnkübe Olan Perisitlerde Fibrotik Yanıt

The Fibrotic Response in Pericyte Culture Upon Exposure to Multiple Sclerosis Sera

Emine ŞEKERDAĞ-KILIÇ¹, Esra ÖZKAN¹, Canan ULUSOY², Ege Anıl UÇAR¹, Narges SHOMALİZADEH¹, Selin SAPANCI¹, Özgür ÖZTOP-ÇAKMAK³, Atay VURAL^{1,3}, Cem İsmail KÜÇÜKALİ², Erdem TÜZÜN², Yasemin GÜRSOY-ÖZDEMİR^{1,3}

¹Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

³Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) ilerleyici fonksiyon kaybıyla seyreden kronik, otoimmün ve demiyelinizan hastalıdır. Nöroinflamasyon sonucu periferik immün hücrelerin MSS'ye göçü yanında, beyin bariyer hücrelerinin ürettiği ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerinin genişlemiş perivasküler alanda birikmesi de MS patofizyolojisine katkıda bulunur. Bu çalışmada, MS hastalarının serum ve beyin omurilik sıvılarının (BOS) kan beyin bariyeri (KBB) hücrelerinde fibrozis yanıtını başlatma potansiyelini araştırmayı hedefledik.

Yöntem: İnsan beyin vasküler perisit ve endotel hücreleri ile insan astrositlerine kültür ortamında sitokin referans kontrol (Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF-β1)), sağlıklı insan serumu ve tedavisiz ataklı yineleyici MS hastalarına ait serum ve BOS örnekleri uygun dilüsyonda uygulandı. Perisit hücre proliferasyonu xCELLigence ile, KBB hücrelerindeki kolajen ve fibronektin ekspresyonu ile perisit miyofibroblastik transformasyon immünohistokimya yöntemi ile gösterildi.

Bulgular: TGF-β1 uygulaması, fibronektin yüksek ekspresyonu ile karakterize fibrozisi özellikle perisit hücre kültüründe indüklemiştir. Ayrıca MS serumu ile inkübe edilen perisit hücrelerinde, BOS ile inkübe edilen perisitlerden farklı olarak; artmış fibrotik yanıt, proliferasyon ve miyofibroblastik transformasyon gözlemlenmiştir. Yüksek fibronektin ekspresyonu ayrıca MS serumları ile inkübe edilmiş endotel hücrelerinde de saptanmıştır. Multipl skleroz serumları ile inkübe edilen astrositlerde artmış glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonu gözlemlenmesine karşın fibrotik işaretleyicilerde diğer gruplara göre azalma görülmüştür.

Sonuç: Kan beyin bariyeri hücreleri arasında perisitler, MS serumlarına karşı fibrotik yanıt oluşturmada anahtar roledir. Multipl skleroz serumu ile indüklenebilir in vitro MS modellemesi, hastalıkların bireysel farklılıklarla araştırılmasına ve yeni tedavi ajanlarının keşfedilmesine olanak sağlayabilir.

Anahtar Sözcükler: Astrosit, endotel hücre, fibrozis, kolajen, multipl skleroz, perisit.

ABSTRACT

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune and demyelinating disease of central nervous system (CNS) leading to progressive function loss. Besides infiltration of peripheral immune cells into CNS subsequent to neuroinflammation, the accumulation of extracellular matrix (ECM) elements, produced by brain barrier cells, in the enlarged perivascular spaces contributes to the pathophysiology. In this study, we aimed to develop an in-vitro model of MS to investigate fibrosis triggered by sera or cerebrospinal fluid (CSF) from MS patients and evaluate the response of blood-brain barrier (BBB) cells to this model.

Methods: Human brain vascular pericytes, endothelial cells and normal human astrocytes were cultured and exposed to a cytokine reference control (Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)), healthy human sera, and sera/CSF from treatment naïve relapsing-remitting MS patients with the appropriate dilution dose. The pericytes cell proliferation were evaluated by xCELLigence, while the collagen and fibronectin expressions of BBB cells, and pericyte myofibroblastic transformation were analyzed with immunocytochemistry.

Results: TGF-β1 induced fibrosis, characterized by fibronectin overexpression, specifically in pericyte cultures. Furthermore, incubation of pericytes with MS serum but not CSF led to a more robust fibrotic response (fibronectin/collagen overexpression), myofibroblastic transformation as well as increased proliferation. Fibronectin overexpression was also detected in endothelial cell culture with MS serum. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression is increased, but fibrotic markers are decreased in cultured astrocytes with MS serum.

Conclusion: Pericytes, among BBB-forming cells, were identified as key contributors to fibrosis in response to MS serum. MS-serum-induced in vitro models are promising for studying the individualized tendencies of patients and may be a new approach for high-throughput screening of potential treatment agents.

Keywords: Astrocytes, collagen, endothelial cells, fibrosis, multiple sclerosis, pericytes

Kaynak gösterme biçimi: Şekerdag-Kılıç E, Özkan E, Ulusoy C, Ucar EA, Shomalizadeh N, SapanCI S ve ark. In Vitro Ortamda Multipl Skleroz Hastalarına Ait Serum ile İnkübe Olan Perisitlerde Fibrotik Yanıt. Arch Neuropsychiatry 2025;62:69–76.

Öne Çıkan Noktalar

- Endotel hücrelerin MS olgularında görülen fibroz oluşumuna katkısı azdır.
- Perisitler, hücre kültüründe MS olgu serumlarına karşı fibrotik yanıt oluşturabilirler.
- Astroitlerin MS olgu serumlarına karşı fibrotik yanıtı azalmıştır.

GİRİŞ

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) inflamatuvar ve demiyelinizan bir hastalıdır. MS'de demiyelinizasyon ve inflamasyon, periferik immün hücrelerin MSS'ye göçü ve ekstrasellüler matriksteki (ESM) protein birikimleri sonucu oluşur. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde, inflamasyona bağlı olarak, MS lezyonlarında remiyelinizasyon mekanizmasının yetersiz kalmaya başlamasıyla, atak sonrası tam düzelleme gerçekleşemez. Bu nedenle çalışmalar, inflamatuvar yolları inhibe etmeye odaklanmıştır. Fakat son yıllardaki araştırmalar, ESM değişiminin periferden MSS'ye hücre ve molekül geçişini artırabildiğine ve bunun da MS lezyonlarında azalmış remiyelinizasyona sebep olabileceğine işaret etmektedir (1).

Astroitik gliosis, MSS'nin tek yara oluşturma mekanizması olarak düşünülmekteydi (2). Fakat yapılan çalışmalar, fibrotik yara oluşturma da MSS'ndeki patolojik süreçlere katkı sağlayabileceğini göstermiştir (3-7). Travmatik ya da inflamatuvar hasar sonucu oluşabilen fibrotik yara, ayrıca kolajenden zengin ESM depositleri olarak da tanımlanabilir ve bu fibrotik yaralar özellikle travmaya bağlı spinal kord hasar modellerinde ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (8,9). Ayrıca son zamanlarda yapılan genetik köken takibi çalışmalarında bu fibrotik yanıtın; perivasküler nişte bulunan, perisit ve/veya perivasküler fibroblastların da dâhil olduğu perivasküler platelet kaynaklı büyüme faktör reseptör beta (PDGFR β) pozitif hücrelerden oluştuğu gösterilmiştir (1,8-10).

İnsan MS lezyonlarında (11,12) ve MS hayvan modellerinde (1,10,13) kolajen birikimini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Fakat fibrozisin MS hastalığı prognozuna katkısı ile ilgili literatür bilgisi sınırlıdır. Multipl skleroz hayvan modelinde yapılan bir çalışmada yara oluşumunun engellenmesinin motor disabilitayı iyileştirdiği ve oligodendrosit kökenli hücrelerde artışa neden olduğu belirtilmiştir (10). Ayrıca in vivo bir çalışmada ESM elementlerinin oligodendrosit olgunlaşmasına ket vurduğu gösterilmiştir (1). Bütün bu çalışmalar, MS'de fibrozisi hedef alan yeni tedavi yöntemlerin geliştirilebileceğine işaret etmektedir. Bu sebeple, fibrotik yanıt mekanizmasındaki potansiyel tedavi edici ajanların araştırılabilmesi için in vitro MS modeline ihtiyaç vardır.

Multipl skleroz hasta serumu ile inkübasyonla oluşturulan in vitro MS modelleri literatürde belirtilmiştir. Trans-endotelial elektrik direnci (TEER) çalışmalarında, MS serum veya miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ve nöromiyelitis optika (NMO) hastalarından elde edilen IgG ile inkübe edilen endotel hücrelerinin bütünlüğünün bozulduğu ve ayrıca sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (14-16). Sadece bir çalışmada MS hasta serumlarının perisitlerde proliferasyonu azalttığı ve ilk 24 saatte erken apoptoze girmelerine neden olduğu bildirilmiştir (17). Ayrıca, deneysel alerjik nörit serumlarının fare serebellum doku kültüründe demiyelinizasyona sebep olduğu gösterilmiştir (18). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda KBB hücrelerinin fibrotik yanıt oluşturma ve MS hastaları BOS örneklerinin fibrozise katkısına odaklanılmamıştır.

Multipl skleroz patofizyolojisindeki fibroziste KBB hücrelerinin katkısını araştırmak için, bu çalışmada KBB elemanlarının insan MS serum ve

BOS örnekleri ile inkübasyonundaki fibrotik yanıtlarının incelenmesi hedeflenmiştir. Bunun için KBB hücre hatları (endotel hücreler, perisit ve astrositler) MS hastalarına ait serum ve BOS örnekleri ile inkübe edilerek in vitro MS modeli oluşturulmuştur. Ayrıca, perisit hücre kültüründe hücre proliferasyonu ve miyofibroblastik transformasyonu xCelligence sistemi ile ölçüldü.

YÖNTEM

Hücre Kültürü

İnsan beyin vasküler perisitler (HBVP, ScienCell), insan beyin vasküler endotel hücreler (BEC) (hCMEC/D3, Sigma-Aldrich, SCC066) ve normal insan astrositleri (NHA, Gibco, N7805100) hücre hatları sırasıyla tam perisit besiyeri (ScienCell,1201), tam endotel besiyeri (Merck, SCME004) ve tam astrosit besiyeri (Lonza, CC-3186) ile kültüre alınmıştır. Normal insan astrosit ve BEC hücreleri kaplanmamış flasklara, HBVP hücreleri ise poly-L-lisin (PLL, Sigma-Aldrich, P2658) ile kaplı flasklara ekilmiş ve hücre hatları %80-90 konfluense ulaşana kadar 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörlerde bekletildi. Besiyerleri her iki ila üç günde bir değiştirildi.

İnsan Örneklem

İnsan serum ve BOS örnekleri için Koç Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 2016,123. IRB2,077 onay kodu ve IRB yönergesine göre çalışmaya katılım onayı alınmıştır. Multipl skleroz hastalarına ait serum ve BOS örnekleri, BOS-spesifik oligoklonal bantlar ile valide edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen bütün MS hastaları; tedavi almamış, biyolojik materyali atak sırasında toplanmış tekrarlayan ve düzelen MS (RRMS) tipi bireylerden oluşmuştur. Çalışmaya dâhil edilen sağlıklı bireylerin otoimmün, inflamatuvar ve diğer kronik hastalık öyküsü bulunmamaktadır.

Hücre Hatlarının MS serum ve BOS ile In Vitro İnkübasyonu

Perisit, astrosit ve endotel gibi KBB hücrelerinin MS serum ve BOS'una karşı oluşturduğu fibrotik yanıt hücre kültürü ortamında çalışmak için; HBVP, NHA ve BEC hücreleri transparan 96 kuyuluk düztaban plaklara ekildi ve hücre yapışması için gece boyu 37°C ve %5 CO₂ inkübe edildi. Sonrasında hücreler; üç deney grubuna ayrıldı: kontrol durum olarak kendi hücre tipine uygun hücre besiyeri, fibrozisi indüklediği bilinen (2,19,20) 20 ng/mL TGF- β 1 (R&D Systems, 240B) ve sağlıklı birey (n=3), MS serum veya BOS (n=3) 1:10 besiyeri ile dilüe olarak 72 saat 37°C ve %5 CO₂ inkübe edildiler. Sonrasında, besiyerleri uzaklaştırıldı, hücreler iki kez fosfat tamponlu tuz çözümü (PBS) ile yıkandı ve %4 paraformaldehit (PFA) ile 30 dk oda ısısında fikse edildi.

xCELLigence ve Perisit Proliferasyonu

xCELLigence sistemi (RTCA DP Analyzer, San Diego, CA); MS serumlarındaki inflamatuvar faktörlerin perisit hücre çoğalmasına direkt ve perisit hücre yaşama mekanizmalarına indirekt etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Yaşayan hücrenin olmadığı (sadece besiyeri olan ortam) veya ölü hücrelerden oluşan süspansiyonun olduğu ortamın hücre endeks değeri sıfıra yakındır. Hücreler elektrotlara temas ettikten sonra ölçülen sinyaller, hücre sayısı ile doğrusal korelasyon gösterir.

İlk olarak, xCELLigence E-plak (Agilent, 5469813001) kuyularına 50 μ l hücre besiyeri eklendi. xCELLigence cihazı 37°C ve ayarlandıktan sonra, plaklar bazal empedans ölçümü için cihaza yerleştirildi. Sonrasında HBVP hücreleri E-plaklara ekildi ve xCELLigence sistemde hücre proliferasyonunu gerçek zamanlı monitörize etmek için inkübasyona bırakıldı. Yirmi dört saat sonra, HBVP hücreleri ya kontrol grubu olarak perisit besiyeri, ya da %10 oranında perisit besiyeri ile dilüe edilmiş sağlıklı insan serumu (n=2, duplika çalışıldı) veya MS hasta serumu (n=2, duplika çalışıldı) ile inkübe edildi. Her kuyunun empedans değeri xCELLigence sistemi tarafından 100 saat boyunca "hücre endeks değeri" (duplika kuyuların ortalama değeri) olarak kaydedildi. Örnekler arasındaki proliferasyon oranı, iki zaman noktası arasındaki eğime göre hesaplandı.

Tablo 1. İmmünofloresan görüntülemelerde kullanılan antikor ve belirteç listesi

Birincil Antikorlar / Belirteçler	IF Oranı	Cat. Nu.
Tavşan anti-PDGFRβ	1:100	Ab32570
Fare anti-αSMA, FITC konjuge	1:100	F3777
Tavşan anti-GFAP	1:100	Ab7260
Tavşan anti-Fibronectin	1:100	F3648
Tavşan anti-Collagen I	1:100	Ab34710
Tavşan anti-Collagen IV	1:100	Ab6586
Tavşan anti-Laminin	1:100	Ab11575
Phalloidin-FITC konjuge	1:100	P5282
İkincil Antikor	IF Oranı	Cat. Nu.
Keçi anti-Tavşan IgG CY3 konjuge	1:200	111-165-003

IF Oranı: İmmünofloresan oranı; Cat. Nu.: Katalog numarası; αSMA: alfa düz kas aktini; CY3: siyanin 3; FITC: Floresin izotiyosyanat; GFAP: Glial fibriler asidik protein; PDGFRβ: platelet kaynaklı büyüme faktör reseptör beta

İmmünofloresan Boyama

Hücreler, tespit işleminden sonra yıkandı ve hücre membranı geçirgenliği için 5 dakika oda ısısında metanol ile inkübe edildi. Sonrasında, Super Block (Thermo Scientific™, PI37535) solüsyonu ile 1 saat oda ısısında bloklama işlemi uygulandı. Bloklamadan sonra, hücreler sırasıyla primer ve sekonder antikorlar ile (bloklama solüsyonunda dilüe edilmiş) 1,5 saat 37°C'de inkübe edildi. Kullanılan antikorlar Tablo 1'de listelenmiştir. Son olarak hücreler 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abcam, ab104139) ile kapatıldı.

Floresan görüntüler Leica DMI8 LCI mikroskobu ile alındı ve Leica LasX yazılımı ile görüntüler işlendi. Her kültürde her örnekten rastgele bir alandan görüntü elde edildi. DMI8 floresan mikroskobunda XY tarama için donanım ayarları şu şekilde idi: (1) Objektif HC PL FLUOTAR 10x/0,30 kuru, numerik apertür 0,3, refraksiyon endeksi 1, voksel boyutu 1,857 µm, (2) Objektif HC PL FLUOTAR L 20x/0,40 kuru, numerik apertür 0,4, refraksiyon endeksi 1, voksel boyutu 0,929 µm. Floresan mikroskop görüntüleri LAS X programından (Leica, Almanya) Tiff dosyası olarak kaydedildi ve ImageJ 1,52e (NIH, ABD) programında analiz edildi. Hücre sayımı için, DAPI pozitif hücreler, her bir hücre tek bir nokta olacak şekilde arka planı ayarlayan "Find Maxima" ayarı kullanıldı. Her bir işaretleyicinin floresan boyanması, alandaki yüzde oranı veya entegre yoğunluğa (her µm²) göre hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

İki-kuyruklu eşleşmiş öğrenci T-testi ve Fisher LSD testi ile tek yönlü ANOVA analiz yöntemleri kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. *** = p<0,001, ** = p<0,01, * = p<0,05 ve ns = anlamsız (non significant) olarak istatistiksel sonuçlar belirtilmiştir. Körleme yapılmamıştır. Bütün verilerin (n ≥3) normalizasyonu Shapiro-Wilk testi (GraphPad Prism 8) ile yapılmıştır. Normalizasyon testi sonuçları p değeri >α şeklindedir. Bu sebeple sıfır hipotezi kabul edildi ve verilerimizin normal dağılımlı olduğu varsayıldı.

SONUÇLAR

Perisitlerin insan MS serumuna in vitro yanıtı

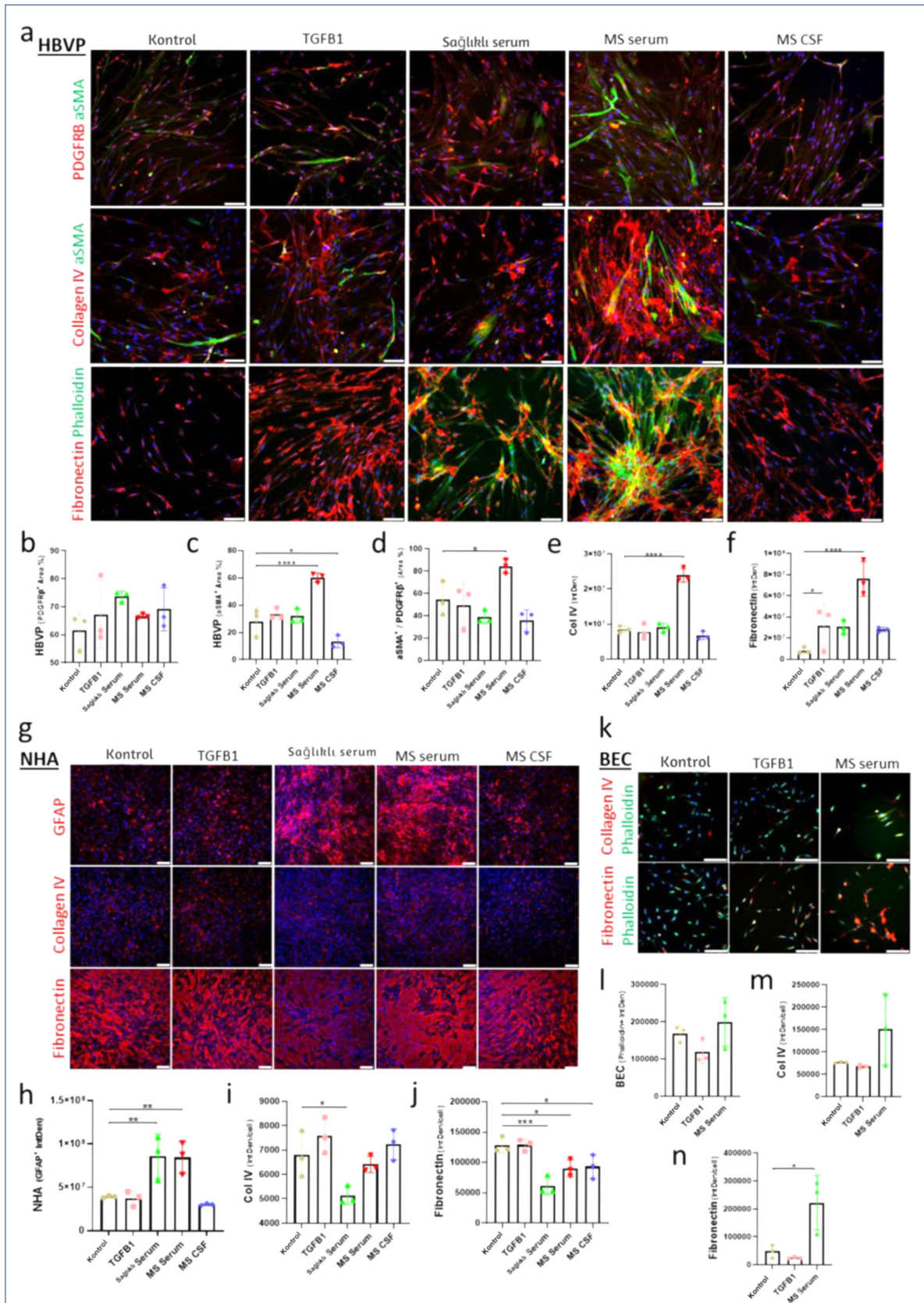
PDGFRβ+ hücrelerin MS patofizyolojisi ile ilişkisini belirleyebilmek için, öncelikle hangi KBB bileşeninin insan MS serumu veya BOS'una karşı cevap oluşturduğunu göstermeyi amaçladık. Daha önceki çalışmalarımı MS'de fibrozis oluşumuna işaret ettiği için (1,4,5,10,13), öncelikle fibrozis yolağını çalıştık. Perisit, astrosit ve endotel hücreleri gibi KBB bileşenlerinin MS serumlarına karşı in vitroda fibrotik yanıt oluşturabilmeleri değerlendirildi.

Hücre kültüründe HBVP hücreleri; perisit besiyeri (kontrol durum), TGF-β1 (sitokin referans kontrol), sağlıklı insan serumu, insan MS serumu veya BOS örneği ile 72 saat inkübe edildi. Sonrasında, fikse edilmiş HBVP hücreleri PDGFRβ (perisit işaretleyici), αSMA (düz kas hücre işaretleyici), kolajen I, kolajen IV, laminin ve fibronectin (ESM) ve fallodin (sitoiskelet yapısı) ile boyandı (Şekil 1a ve Şekil 2, Şekil 3). Sağlıklı insan serumu ile inkübe edilen perisitlerde, PDGFRβ+ yüzdesi kontrole (hücre besiyeri ile inkübasyon) göre hafif artış göstermiştir (p=0,061; Şekil 1b). İnsan MS serumu ile inkübe edilen perisitlerde, αSMA+ perisit hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenirken (p <0,0001; Şekil 1 c), insan MS BOS örneği ile inkübe edilen perisitlerde αSMA+ hücre oranı anlamlı derecede azalmıştır (p<0,05). Buna ek olarak, MS serumu ile inkübe olan perisitlerde, αSMA+/ PDGFRβ+ oranında (miyofibrotik transformasyon için) anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p <0,05; Şekil 1d). Kolajen IV, MS serumu ile inkübe edilen perisitler anlamlı derecede artmışken (p <0,0001; Şekil 1e, Şekil 2), fibronectin hem TGF-β1 (p <0,05; Şekil 1f) hem de MS serumu (p <0,0001) ile inkübe edilen perisitler anlamlı artış göstermiştir. Fakat laminin ekspresyonunda MS serumuna bağlı anlamlı bir artış görülememiştir (Şekil 3).

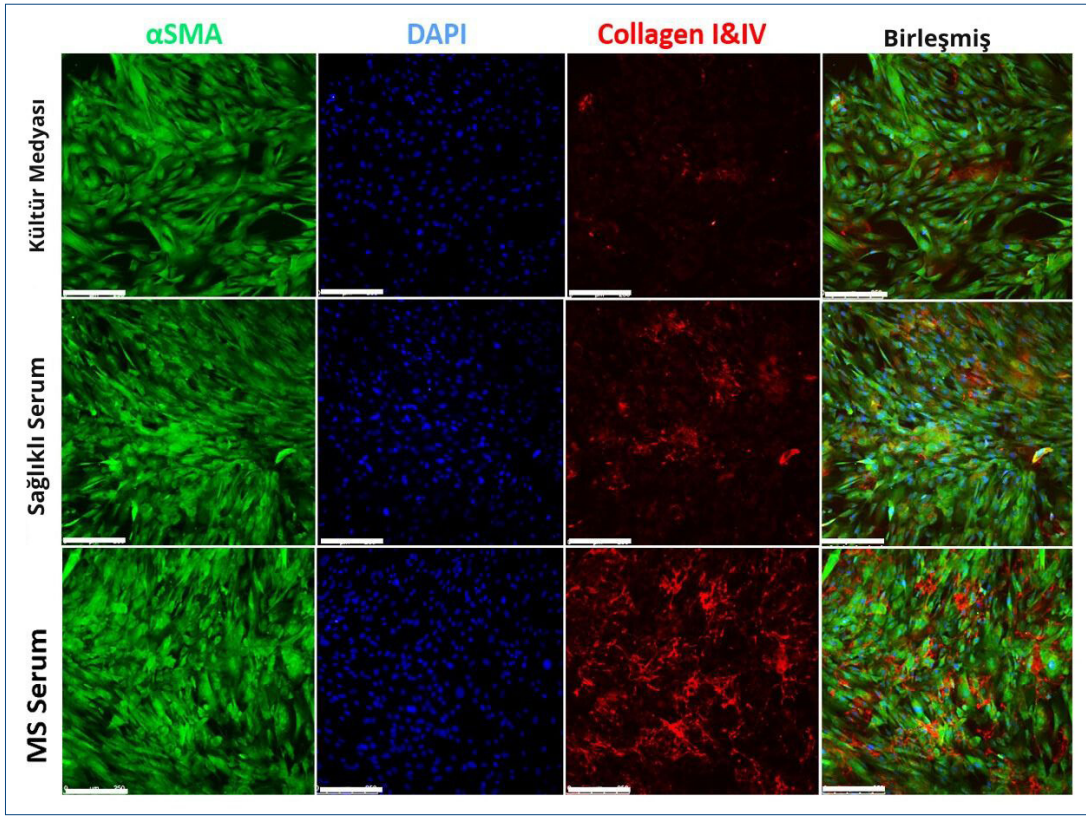
Son olarak, MS serumunun perisitlerin mitojenik aktivitesine etkisini test ettik. Proliferasyon oranı xCELLigence sistemi ile ölçülmüştür. Multipl skleroz serumu ile inkübe edilen perisitlerde proliferasyonda anlamlı artış gözlemlenmiştir (Şekil 4). Sitokin referansı olan TGF-β1 ile inkübe olan perisitlerde, beklenildiği üzere, fibronectin overekspresyonu ile fibrozis yanıtı gösterilmiştir. Buna karşın, MS serumu ile inkübe olan perisitlerde (BOS ile inkübe edilenlerden farklı olarak) çok daha fazla fibronectin ve kolajen overekspresyonu, miyofibroblastik transformasyon ve aynı zamanda artmış proliferasyon gözlemlenmiştir.

Astrositlerin insan MS serumuna in vitro yanıtı

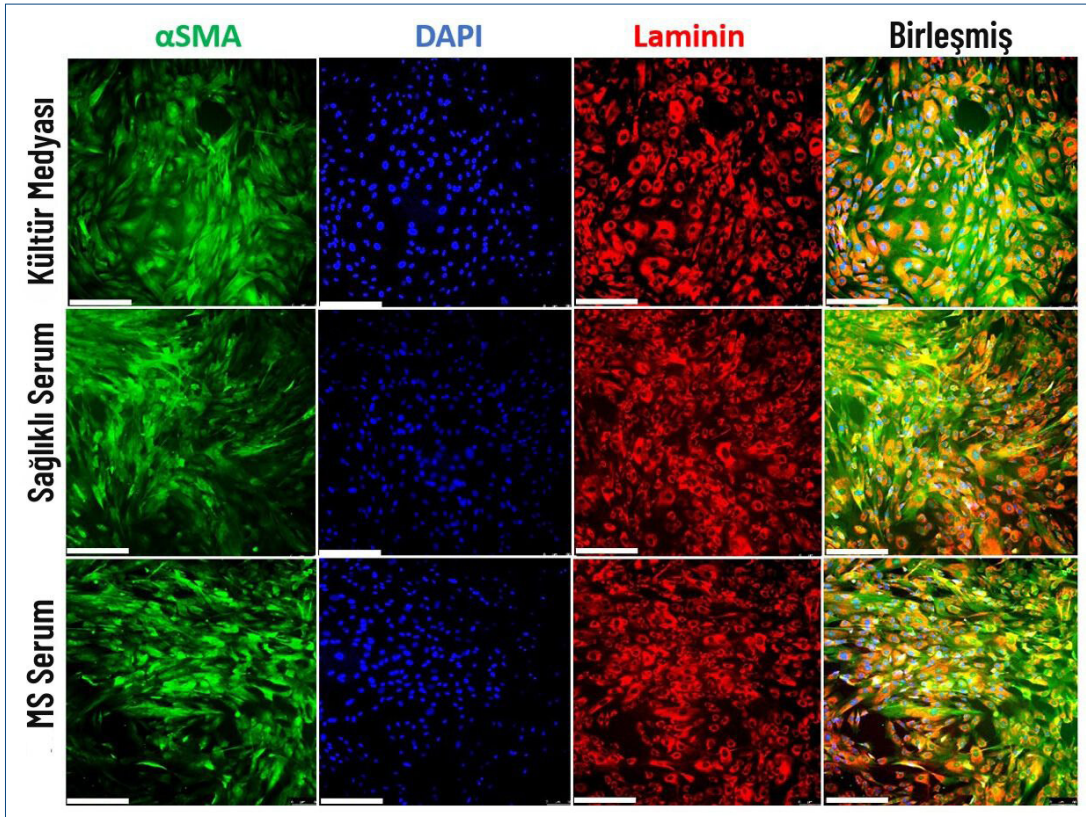
Normal insan astrosit hücreleri (Şekil 1g); astrosit besiyeri (kontrol), TGF-β1 (sitokin referans kontrol), sağlıklı insan serumu, insan MS serumu veya BOS örneği ile 72 saat inkübe edildi ve GFAP (astrosit işaretleyici), kolajen IV veya fibronectin ile boyandı. Hem insan serumu (p <0,01; Şekil 1h) hem de MS serumu ile inkübe olan astrositlerde kontrole göre artmış GFAP+ ekspresyonu gözlemlenmiştir. Sağlıklı insan serumu ile inkübe edilen NHA'larda kolajen IV ekspresyonu anlamlı olarak azalmıştır (p <0,05; Şekil 1i). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise, sağlıklı insan serumu (p <0,001; Şekil 1j), insan MS serumu (p<0,05) veya BOS (p<0,05) ile inkübe edilen NHA'larda kolajen IV'ün anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, TGF-β1'den farklı olarak, insan sağlıklı ya da MS



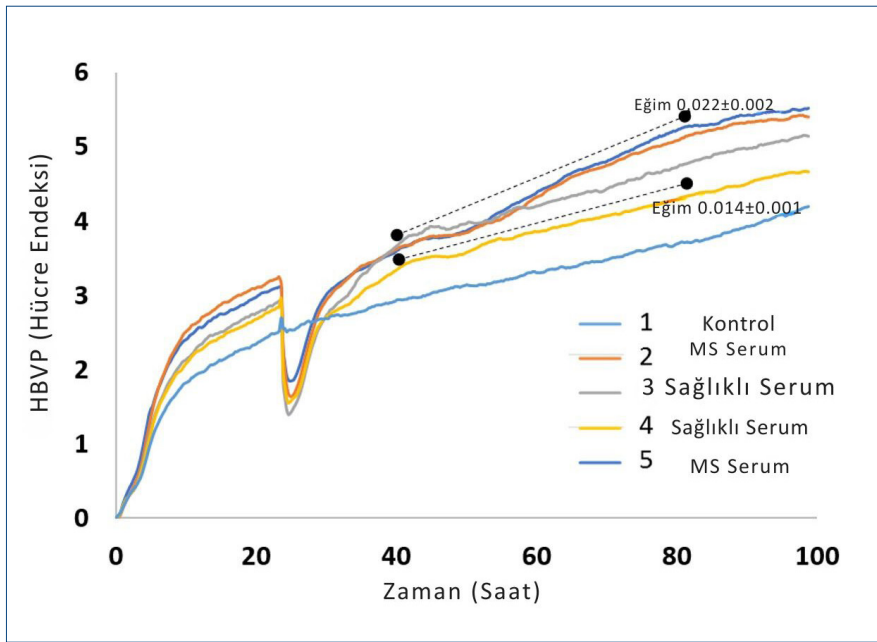
Şekil 1. İnsan MS serumuna karşı KBB hücrelerinin in vitro yanıtı. İnsan beyin vasküler perisit hücreleri (HBVP), perisit besiyeri (kontrol), TGF- β 1, sağlıklı insan serum, MS insan serum veya BOS ile 72 saat inkübe edildi. İnsan beyin vasküler perisitleri (a), NHA (g), ve BEC (k) ve ekspresyon analiz grafikleri şekildedeki gibidir (b-f, h-j, l-n). a) HBVP hücreleri; üst sıra: PDGFR β (perisit işaretleyici, kırmızı) ve α SMA (düz kas hücresi/miyofibroblast işaretleyici, yeşil), orta sıra: Kolajen IV (ESM işaretleyici, kırmızı) ve fallodin (hücre iskelet işaretleyici, yeşil) ile immünofloresan yöntem ile boyandı. Hücre çekirdek boyası DAPI ile hücreler belirlendi. g) NHA hücreleri astrosit besiyeri (kontrol), TGF- β 1, sağlıklı insan serum, MS insan serum veya BOS ile 72 saat inkübe edildi. Normal insan astrosit hücreleri immünofloresan yöntemle GFAP (astrosit işaretleyici, kırmızı), kolajen IV (kırmızı), veya fibronektin (kırmızı) ile boyandı. k) BEC hücreleri endotel besiyeri (kontrol), TGF- β 1, sağlıklı insan serumu veya insan MS serumu ile inkübe edildi ve immünofloresan yöntem ile kolajen IV (üst sıra, kırmızı) ve fibronektin (alt sıra, kırmızı) boyandı. Hücre çekirdekleri DAPI ile (mavi), hücre iskeleti fallodin ile boyandı. Bütün grafik datası noktasal saçılım grafiği ile ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir (serum ve BOS her biri n=3). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile doğrulanmamış Fisher LSD testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık şu şekilde gösterilmiştir: ****=p < 0,0001, **=p < 0,01 ve *=p < 0,05. Ölçek çubuğu 250 μ m'dir.



Şekil 2. Multipl skleroz serumu ile inkübe edilen perisitler artmış kolajen üretimi. İnsan beyin vasküler perisit hücreleri ya perisit besiyeri (kontrol), ya da sağlıklı veya MS insan serumu (%10 perisit besiyeri ile dilüe) üç tekrarlı kuyular olarak 24 saat inkübe edildi. Hücreler kolajen I, IV ve DAPI ile boyandı. Multipl skleroz serumları ile inkübe olan perisitlerde kolajen depositleri gözlemlendi. Ölçek çubuğu 250 µmdir.



Şekil 3. Multipl skleroz serumu ile inkübe edilen perisitlerde laminin ekspresyonu değişti. İnsan beyin vasküler perisit hücreleri ya perisit besiyeri (kontrol), ya da sağlıklı veya MS insan serumu (%10 perisit besiyeri ile dilüe) üç tekrarlı kuyular olarak 24 saat inkübe edildi. Hücreler laminin ve DAPI ile boyandı. Multipl skleroz serumu ile inkübe edilen perisitlerde kontrol ve sağlıklı insan serumu ile karşılaştırıldığında laminin ekspresyonunda fark bulunamamıştır. Ölçek çubuğu 250 µmdir.



Şekil 4. Multipl skleroz serumu ile inkübe olan perisitlerde artmış proliferasyon. İnsan beyin vasküler perisit hücreleri xCELLigence E-plaklarına ekildi ve ekildikten 24 saat sonra ya hücre besiyeri ya da %10 besiyeri ile dilüe edilmiş sağlıklı insan serumu (n=2) veya MS insan serumu (n=2) ile 100 saat inkübe edilmiştir. Her doğru duplike kuyuların ortalamasıdır. Multipl skleroz serumu ile inkübe edilen perisitlerde kontrol ve sağlıklı insan serumu ile inkübe edilen perisitlere göre anlamlı derecede artmış proliferasyon oranı gözlemlenmiştir. Proliferasyon oranı, 40. ve 80. saatler arasındaki eğime göre analiz edilmiştir (0,022±0,002 hücre endeksi/saat (ortalama ± standart sapma n=2, MS serum için), 0,014±0,001 hücre endeksi/saat (ortalama ± standart sapma n=2, sağlıklı serum için)). P değeri: 0,032 (iki kuyruklu eşleşmemiş student T testi ile analiz edilmiştir).

serumu ile astrositlerin inkübasyonu GFAP ekspresyonunu artırmasına karşın, kolajen ve fibronektin ekspresyonunu azaltmıştır.

Endotel hücrelerin insan MS serumuna in vitro yanıtı

Son olarak, BEC hücreleri endotel besiyeri (kontrol), TGF-β1 veya insan MS serumu ile 72 saat inkübe edildi ve kolajen IV ve fibronektin ile boyandı (Şekil 1k). Total fallodin+ hücre sayısı TGF-β1 veya MS serumu ile inkübe edilen BEC hücrelerinde anlamlı bir değişiklik göstermedi (Şekil 1l). Multipl skleroz serumu ile inkübe edilen BEC'lerde kolajen ekspresyonunda hafif bir artış (p=0,098; Şekil 1 m) gözlemlenirken, fibronektin artış oranı MS serumu ile inkübe edilen perisitlere benzerlik gösterdi (p <0,05; Şekil 1n).

TARTIŞMA

Multipl skleroz lezyonlarındaki perivasküler alanda kolajen IV ve fibronektin biriktiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (12,21). Bu perivasküler fibrotik cevapta hangi mekanizmaların rol oynadığı henüz tamamen açıklanamamıştır. Bu fenomeni, KBB elemanlarını (perisit, astrosit ve endotel hücreleri) MS durumlarına maruz bırakarak in vitro fibrotik yanıtını araştırmayı amaçladık. Kolajen I, kolajen IV ve fibronektin bazal lamina ve damar duvarı matriksinin bileşenidir. Bu proteinler, ESM'teki birkaç tip hücre tarafından fibrozise neden olan uyarılara yanıt olarak üretilip salınabilir. Multipl skleroz serumu ile inkübe edilen perisitlerin kolajen I, kolajen IV ve fibronektin üreterek en yüksek yanıtı verdiği; fakat MS BOS ile inkübe edildiğinde yanıt oluşturmadığını gözlemledik. Bu durum bize fibrozisi düzenleyen faktörlerin BOS yerine periferik kan kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamızda endotel hücreleri MS serum ve BOS'unun olduğu deney koşullarında fibrozis yanıtının düşük katkılı olduğunu gözlemledik. Fibrotik sitokin olması ile bilinen TGF-β1 sadece perisit kültüründe fibronektin üretimini indükleyebilmiştir. Son olarak, MS serumu ile inkübe edilen astrositlerde GFAP ekspresyonunun arttığını ama fibrotik yanıtın azaldığını gözlemledik.

Mono veya kokültür, beyin slaytları ve KBB modellerini içeren birtakım in vitro MS modellerine literatürde yer verilmiştir (22). Buna ek olarak, in vitro bireysel ilaç çalışmaları için gelecek vaad eden hastaların somatik hücrelerinden elde edilen pluripotent kök hücreden oligodendrosit oluşturan yeni protokoller de mevcuttur (23). Diğer kişiselleştirilmiş

modellemeler, kültüre edilmiş beyin slaytları veya hücreleri MS, NMO veya MOG hasta serumu veya IgG'si ile inkübe edilerek veya hayvan modeli olarak oluşturulmaktadır (14-18). In vitroda serum kullanarak indüklenen hastalık modellerinde hastalık patogenezi içinde görülen demiyelinizasyon, KBB bozulması ve sıkı bağlantı molekül kaybı da taklit edilebilmektedir. Ayrıca bu çalışmamızda perisitlerin, in vitro ortamda MS serumu ile inkübasyonu sonucu fibrotik yanıt oluşturabildiğini gösterdik. Bildiğimiz kadarıyla, KBB hücrelerinin in vitroda MS serumları ile inkübasyonu sonucu fibrotik yanıt oluşturduğu daha önce gösterilmemiştir.

Son çalışmalar, uzun zamandır bilinen aksine, MSS'deki fibrozis kaynağının menengial parçalanma ve ekstra MSS fibroblast infiltrasyonu kaynaklı olmadığını göstermiştir (2). Fibrotik yanıt, perivasküler nişteki hücrelerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, genetik soy takip çalışmalarında spesifik bir perisit tipinin (tip A perisit) ve perivasküler fibroblastların fibrozis oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermiştir (1,8-10). Perivasküler hücrelerin fibrozise katkılarını gösteren yayın sayısı literatürde her geçen gün artmaktadır. Hem perisitler hem de perivasküler fibroblastlar PDGFRβ ve CD13 eksprese ederler, fakat perivasküler fibroblastlar αSMA ve NG2 bakımından negatifler (2). Bu çalışmamızda HBVP hücrelerini; PDGFRβ, αSMA ve NG2 pozitif olduğu için fibroblast yerine perisit olarak tanımladık.

Traumatik veya inflamatuvar uyarı sonucu perisitler, αSMA eksprese eden fibroblast benzeri hücreler olan miyofibroblastlara dönüşebilirler (24,25). Bu çalışmamızda bulgulara benzer olarak miyofibroblastların, ESM bileşenleri olan kolajenler ve fibronektin üreterek fibrotik yanıt katıldığı gösterilmiştir (26-28). Perisitlerin lokasyonları bu transformasyon sırasında damardan yara bölgesine göç ile değişmektedir (8). Ayrıca, perisit işaretleyicilerin ekspresyonu da bu transformasyon sırasında değişmektedir: Perisitler CD13 ekspresyonu kaybolur, fibronektin eksprese etmeye başlarlar ve PDGFRβ işaretleyicisi aynı kalırken geçici olarak miyofibroblast işaretleyicisi olan αSMA'yı eksprese etmeye başlarlar (29).

Miyofibroblastik transformasyonu αSMA'nın PDGFRβ'ya oranına göre ölçtük ve sadece MS serumu ile inkübe edilen perisitlerde istatistiksel olarak anlamlı miyofibroblastik transformasyon gözlemledik. Fibrotik yanıt

oluşturması ile bilinen TGF- β 1 (2) bu miyofibroblastik transformasyonu oluşturamamıştır ve perisitler ile inkübe edildiğinde sadece fibronektin overekspresyonuna neden olmuştur. Buna karşın, MS serumu ile inkübe olan perisitlerde, hem kolajen IV hem de fibronektin ekspresyonu artmıştır. TGF- β 1 ile inkübe edilen perisitlerin kolajen I birikimine neden olduğunu göstermiştir (6). Ayrıca hasta ve sağlıklı kontrol serumları ile yapılan bir çalışma, kontrol ve MS serumları arasında TGF- β 1 seviyesi bakımından fark bulamamıştır (30). Perisitler sağlıklı insan serumuna yanıt oluşturmadığından, MS serumunda TGF- β 1 dışındaki faktör (ler) fibrozis yanıtına katkıda bulunuyor olmalıdır. Buna paralel olarak, yakın zamanlı bir çalışma interferon-gamma (IFN- γ) yolağındaki genlerin fibrotik yara oluşumunu düzenlediğini göstermiştir (10). Çalışmamızda, MS serumu ile inkübe edilen endotel hücrelerinde fibrotik yanıt gözlemlenirken, TGF- β 1 ile inkübe edilenlerde fibrotik yanıt oluşmamıştır. Sonuçlarımız daha önce literatürde belirtilmiş in vivo çalışmada serebral vasküler endotel hücrelerde fibrotik yanıt olarak gözlemlenen artmış fibronektin ekspresyonu ile uyumludur (31).

Çalışmamızda kullandığımız astrosit kültüründe, sağlıklı veya MS serumu ile inkübe edilen astrositlerde GFAP ekspresyonunun arttığı ve fibrotik yanıtın azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar karşıt dursa da aktif astrositlerin in vitroda matriks metalloproteinaz sentezleyebildiği gösterilmiştir, dolayısıyla serum-aktif astrositler, birikmiş ESM proteinlerini degrade edebilir (32). Benzer yanıt TGF- β 1 ile inkübe edilen astrositlerde gözlemlenmemiştir; bu MS serumundaki başka faktörlerin, bu hücrelerde TGF- β 1'den bağımsız mekanizmalarla fibrozise neden olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda MS serumunun perisitlerin (3 günlük xCELLigence sistemi takibi ile gözlemlenen) proliferasyonunu ve hücre işaretleyicilerinin ekspresyonunu arttığı gözlemlenmiştir. Dikkate değer olarak, hem sağlıklı hem de MS serumu ile inkübe edilen perisitlerin ilk birkaç saatte hücre sayısı azalmış, sonraki saatlerde MS serumu ile inkübe edilen hücrelerde proliferasyon artış göstermiştir. Bu gözlemimize paralel olarak, in vitroda MS serumu ile inkübe edilen perisit çalışmasında, ilk 24 saatte perisitlerin hücre sağkalımı azalmış ve hücrelerde erken dönem apoptoz işaretleyici ekspresyonu artmıştır (17).

Çalışmamızda MS serumu ile inkübe edilen endotel hücrelerde fibrotik yanıt oluşurken TGF- β 1 ile inkübe olanlarda fibrotik yanıt gözlemlenmemiştir. Bununla ilgili olası açıklama, BOS'un büyüme faktörleri dâhil olmak üzere yüksek miktarda protein içeriyor olmasıdır (33). Buna paralel olarak, BOS'un motor nöronlarda toksik etkisini araştıran çalışmalarda dilüe kullanılan BOS'un yüksek konsantrasyonda kullanılan BOS'a göre daha artmış yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (34). Ayrıca, TGF- β 1 ekspresyonu MS atak dönemi BOS'unda remisyon dönemine göre azalmaktadır (30). Bir diğer çalışmada ise MSS ile periferik kandaki serum molekülleri arasında yüksek korelasyon gösterilmiştir (35).

Çalışmamız birtakım limitasyonlara sahiptir. Çalışmamızda sitokin referans kontrol olarak kullanılan TGF- β 1'e göre MS serumunun daha artmış fibrotik yanıt oluşturduğunu gözlemledik. Fakat diğer birçok inflamatuvar sitokinler, IFN- γ gibi, fibrozis oluşumuna katkı sağlayabilir. Ayrıca, perisit ve astrosit hücre kültürlerinde kullandığımız serum ve BOS dilüsyon oranları eşitti. Fakat daha önceki hücre kültürü çalışmalarında bu dilüsyon oranında BOS'un çokça kullanıldığı bilinmektedir (34).

Sonuçlarımız, MS tanısı almış hasta serumu ile inkübe edilen perisitlerin miyofibroblastik tipe dönüşme ve ESM molekülleri üretme eğiliminde olduğunu göstermektedir. İlerleyen çalışmalarda hangi faktörlerin veya etkileşimlerin (sitokin, immüoglobulin, büyüme faktörleri, etc.) bu fenomene neden olduğu araştırılmalıdır.

Teşekkür: Bu çalışma, Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM)'nin hizmet ve altyapısı kullanılarak yürütülmüştür. TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. İçeriğin doğruluğundan yazarlar sorumludur.

Etik Komite Onayı: İnsan serum ve BOS örnekleri için Koç Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 2016.123. IRB2.077 onay kodu ve IRB yönergesine göre çalışmaya katılım onayı alınmıştır.

Hasta Onamı: Hastalardan kan örneklerinin araştırmalarda kullanılmasına yönelik onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- EŞK, AV, ÖÖÇ, ET, ÇİK; Tasarım- NS, CU, SS, EÖ, EAU ; Denetleme- YGÖ; Kaynaklar- YGÖ, CU, ET, ÇİK ; Malzemeler- AV, ÖÖÇ, ET, ÇİK; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- EŞK, AV, ÖÖÇ, AT, ÇİK; Analiz ve/veya Yorum- EŞK; Literatür Taraması- EŞK, CU; Yazıyı Yazan- EŞK; Eleştirel İnceleme- YGÖ.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Çalışma Tübitak 1165552, 2165627 ve İstanbul Üniversitesi BAP TAB-2021-37245 nolu proje-37245 numaralı proje destekleri ile fonlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Yahn SL, Li J, Goo I, Gao H, Brambilla R, Lee JK. Fibrotic scar after experimental autoimmune encephalomyelitis inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuroimmunol Dis.* 2020;134:104674. [Crossref]
2. Fehlberg CR, Lee JK. Fibrosis in the central nervous system: from the meninges to the vasculature. *Cell Tissue Res.* 2022;387:351-360. [Crossref]
3. Anwar MM, Özkan E, Gürsoy-Özdemir Y. The role of extracellular matrix alterations in mediating astrocyte damage and pericyte dysfunction in Alzheimer's disease: a comprehensive review. *Eur J Neurosci.* 2022;56(9):5453-5475. [Crossref]
4. Dias DO, Göritz C. Fibrotic scarring following lesions to the central nervous system. *Matrix Biol.* 2018;68-69:561-570. [Crossref]
5. Fernández-Klett F, Priller J. The fibrotic scar in neurological disorders. *Brain Pathol.* 2014;24:404-413. [Crossref]
6. Özkan E, Çetin-Taş Y, Şekerdağ E, Kızıllırmak AB, Taş A, Yıldız E, et al. Blood-brain barrier leakage and perivascular collagen accumulation precede microvessel rarefaction and memory impairment in a chronic hypertension animal model. *Metab Brain Dis.* 2021;36(8):2553-2566. [Crossref]
7. Özkan E, Çetin-Taş Y, Şekerdağ E, Yiğit B, Shomalizadeh N, Sapancı S, et al. Hyperglycemia with or without insulin resistance triggers different structural changes in brain microcirculation and perivascular matrix. *Metab Brain Dis.* 2023;38:307-321. [Crossref]
8. Göritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science.* 2011;333:238-242. [Crossref]
9. Soderblom C, Luo X, Blumenthal E, Bray E, Lyapichev K, Ramos J, et al. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *J Neurosci.* 2013;33:13882-13887. [Crossref]
10. Dorrier CE, Aran D, Haenelt EA, Sheehy RN, Hoi KK, Pintari L, et al. CNS fibroblasts form a fibrotic scar in response to immune cell infiltration. *Nat Neurosci.* 2021;24:234-244. [Crossref]
11. Mohan H, Krumbholz M, Sharma R, Eisele S, Junker A, Sixt M, et al. Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. *Brain Pathol.* 2010;20:966-975. [Crossref]
12. van Horsen J, Bö L, Vos CM, P, Virtanen I, de Vries HE. Basement membrane proteins in multiple sclerosis-associated inflammatory cuffs: potential role in influx and transport of leukocytes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:722-729. [Crossref]
13. Şekerdağ-Kılıç E, Ulusoy C, Atak D, Özkan E, Gökyüzü AB, Seyaj S, et al. Perivascular PDGFRB+ cells accompany lesion formation and clinical evolution differentially in two different EAE models. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;69:104428. [Crossref]
14. Minagar A, Ostanin D, Long AC, Jennings M, Kelley RE, Sasaki M, et al. Serum from patients with multiple sclerosis downregulates occludin and VE-cadherin expression in cultured endothelial cells. *MSJ.* 2003;9:235-238. [Crossref]
15. Shimizu F, Tasaki A, Sano Y, Ju M, Nishihara H, Oishi M, et al. Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients disrupt the blood-brain barrier. *PLoS One.* 2014;9(3):e92872. [Crossref]
16. Yoshimura S, Nakagawa S, Takahashi T, Tanaka K, Tsujino A. FTY720 exacerbates blood-brain barrier dysfunction induced by IgG derived from patients with NMO and MOG disease. *Neurotox Res.* 2021;39:1300-1309. [Crossref]

17. Ulusoy C, Şekerdağ E, Yılmaz V, Yılmaz AB, Atak D, Vural A, et al. Impact of autoimmune demyelinating brain disease sera on pericyte survival. *Arch Neuropsychiatry*. 2021;58:83–86. [\[Crossref\]](#)
18. Saida T, Saida K, Silberberg DH. Demyelination produced by experimental allergic neuritis serum and anti-galactocerebroside antiserum in CNS cultures. *Acta Neuropathol*. 1979;48:19–25. [\[Crossref\]](#)
19. Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF- β 1 signaling and tissue fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4):a022293. [\[Crossref\]](#)
20. Wu C-F, Chiang W-C, Lai C-F, Chang F-C, Chen Y-T, Chou Y-H, et al. Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol*. 2013;182:118–131. [\[Crossref\]](#)
21. Sobel RA, Mitchell ME. Fibronectin in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*. 1989;135:161–168.
22. van der Star BJ, Vogel DY. S, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012;11(5):570–588. [\[Crossref\]](#)
23. Madill M, Fitzgerald D, O'Connell KE, Dev KK, Shen S, FitzGerald U. In vitro and ex vivo models of multiple sclerosis. *Drug Discov Today*. 2016;21:1504–1511. [\[Crossref\]](#)
24. Hurtado-Alvarado G, Cabañas-Morales AM, Gómez-González B. Pericytes: brain-immune interface modulators. *Front Integr Neurosci*. 2014;7:80. [\[Crossref\]](#)
25. Ozen I, Boix J, Paul G. Perivascular mesenchymal stem cells in the adult human brain: a future target for neuroregeneration? *Clin Transl Med*. 2012;1:30. [\[Crossref\]](#)
26. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007;127:526–537. [\[Crossref\]](#)
27. Lin S-L, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*. 2008;173:1617–1627. [\[Crossref\]](#)
28. Schrimpf C, Teebken OE, Wilhelmi M, Duffield JS. The role of pericyte detachment in vascular rarefaction. *J Vasc Res*. 2014;51:247–258. [\[Crossref\]](#)
29. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:666–671. [\[Crossref\]](#)
30. Carrieri PB, Provitera V, Rosa T, de Tartaglia G, Gorga F, Perrella O. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. A correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1998;20:373–382. [\[Crossref\]](#)
31. Andrews RN, Caudell DL, Metheny-Barlow LJ, Peiffer AM, Tooze JA, Bourland JD, et al. Fibronectin produced by cerebral endothelial and vascular smooth muscle cells contributes to perivascular extracellular matrix in late-delayed radiation-induced brain injury. *Radiat Res*. 2018;190:361–373. [\[Crossref\]](#)
32. Muir EM, Adcock KH, Morgenstern DA, Clayton R, von Stillfried N, Rhodes K, et al. Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Mol Brain Res*. 2002;100:103–117. [\[Crossref\]](#)
33. Gato A, Martín P, Alonso MI, Martín C, Pulgar MA, Moro JA. Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2004;301A:280–289. [\[Crossref\]](#)
34. Ng Kee Kwong KC, Gregory JM, Pal S, Chandran S, Mehta AR. Cerebrospinal fluid cytotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of in vitro studies. *Brain Commun*. 2020;2:fcaa121. [\[Crossref\]](#)
35. Beseler C, Vollmer T, Graner M, Yu X. The complex relationship between oligoclonal bands, lymphocytes in the cerebrospinal fluid, and immunoglobulin G antibodies in multiple sclerosis: indication of serum contribution. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186842. [\[Crossref\]](#)