

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MULTİPLE SKLEROZ PATOFİZYOLOJİSİNDE
PERİSİTLERİN ROLÜ**

CANAN AYSEL ULUSOY

**DANIŞMAN
PROF. DR. ERDEM TÜZÜN**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İleri Nörolojik Bilimler Programında Doktora öğrencisi Canan Aysel ULUSOY tarafından Prof. Dr. Erdem TÜZÜN'ün danışmanlığında hazırlanan "Multiple Skleroz Patofizyolojisinde Perisitlerin Rolü" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 18/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri-Danışman**

Prof. Dr. Erdem TÜZÜN
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Sinirbilim Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Elif ÖZKÖK
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Erdinç DÜRSUN
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa,
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Yasemin GÜRSOY ÖZDEMİR
Koç Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Nöroloji Anabilim Dalı

BEYAN

iii

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Canan Aysel ULUSOY

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde tez danışmanım olarak beni bilimsel dünyaya sabır ve şefkatle hazırlayan Prof. Dr. Erdem Tüzün'e,

Her adımında benden desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Cem İsmail Küçükali'ye,

Gerek tez deneylerimi kurtarması, gerekse diğer bütün işlerde can simidi olan Doç.Dr. Vuslat Yılmaz'a,

Doktora tezimde beraber çalışma şansına eriştiğim, kendisinden her anlamda çokça şey öğrendiğim Prof. Dr. Yasemin Gürsoy- Özdemir'e,

Tezlerimizin deneylerinin her aşamasında birbirimize her anlamda destek takımı olduğumuz Dr. Emine Şekerdağ, Dila Atak ve Aysu Bilge Yılmaz'a,

Anlayış ve samimiyetiyle Prof. Dr. Elif Özkök'e,

Sinirbilimi seçmemde büyük etkileri olan Prof. Dr. Tamer Demiralp ve Doç. Dr. Nurcan Orhan'a,

Yüksek lisans tezimi beraber yapma şansını bulduğum ve doktora tezimi toparlayan deneylerimi yapabilmem için de yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Güher Saruhan-Direskeneli'ye,

Deneylerim için zamanından büyük fedakarlıklar yapmış Abdullah Yılmaz'a,

Birbirimize hep destek tam destek olduğumuz, iş hayatımın en büyük konfor ve keyif sebepleri çalışma arkadaşlarım Hande Yüceer, Elif Şanlı, Ece Akbayır, Zerrin Karaaslan, Melis Şen, Berrak Yetimler, Murat Giriş, Şenol Işıldak, Çiğdem Aksu Karakaş ve Pınar Öztekin Güngör'e,

Tezimle ilgili bütün buhranlarımı çeken, çok hızlı ve etkili fikirleriyle elimden tutan Seçkin Kadıköy'e,

Hayatım boyunca karşılıksız sevgi ve sabırları için aileme ve beni hep güldüren kedimiz Lokum'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Multipl skleroz	2
2.1.1. Epidemiyolojisi	2
2.1.2. Risk Faktörleri.....	3
2.1.2.1. Epstein-Barr Virüsü	3
2.1.2.2. Vitamin D.....	4
2.1.2.3. İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen; HLA) ve Diğer Genetik Faktörler	5
2.1.3. Altıpları	6
2.1.3.1. Radyolojik İzole Sendrom (RİS).....	6
2.1.3.2. Klinik İzole Sendrom (KİS).....	6
2.1.3.3. Atak ve İyileşmelerle Giden MS (Relapsing-Remitting MS; RRMS).....	7
2.1.3.4. Sekonder Progresif MS (SPMS)	7
2.1.3.5. Primer Progresif MS (PPMS).....	8
2.1.4. Klinik	8
2.1.4.1. Belirti ve Bulgular	8
2.1.4.1.1. Motor Semptomlar	8
2.1.4.1.2. Somatosensoriyal Bulgular	8
2.1.4.1.3. Beyin Sapı Semptomları	9

2.1.4.1.4. Görme Yolları Semptomları.....	9
2.1.4.1.5. Serebellar Bulgular.....	9
2.1.4.1.6. Kognitif ve Psikiyatrik Bulgular	9
2.1.4.1.7. Yorgunluk ve Uyku Bozuklukları.....	10
2.1.4.1.8. Mesane, Barsak ve Seksüel Bozukluklar	10
2.1.4.2. Tanı	10
2.1.4.3. Tedavi.....	12
2.1.4.3.1. Hastalık-Düzenleyici Tedavi.....	12
2.1.4.3.2. Semptomik Tedavi	14
2.1.5. Multipl Skleroz Patogenezi	16
2.1.5.1. MS İmmünohistopatolojisi.....	16
2.1.5.1.1. Patern 1.....	17
2.1.5.1.2. Patern II.....	17
2.1.5.1.3. Patern III.....	17
2.1.5.1.4. Patern IV	17
2.1.5.1.5. Akut MS plakları.....	18
2.1.5.1.6. Kronik plaklar	18
2.1.5.2. MS İmmünolojik Mekanizmalar	18
2.1.5.3. MS Nörodejeneratif Mekanizmalar.....	20
2.1.5.4. Kan Beyin Bariyeri ve Multiple Skleroz İlişkisi.....	21
2.1.5.5. Perisitlerin İmmünolojik Fonksiyonları ve MS İlişkisi.....	23
2.1.6. MS Hayvan Modelleri.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Multipl Skleroz Hayvan Modeli Oluşturma	27
3.1.1. Fareler	27
3.1.2. İmmünizasyon.....	27
3.1.3. Farelerin Klinik Durumunun Değerlendirilmesi	28
3.1.4. In vivo deneyin sonlandırılması.....	29
3.2. Anti-MOG Antikoru Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile Değerlendirilmesi.....	29
3.3. Demiyelinizasyonun Luxol Fast Blue Boyama ile Değerlendirilmesi	29
3.4. Perisit ve İmmünolojik Parametrelerin İmmünohistokimya ile Değerlendirilmesi	29

3.5. Fare Serumlarının Perisitlerin Canlılığına Etkisinin Araştırılması.....	30
3.5.1. Perisit Hücre Kültürü	30
3.5.2. Annexin V / Propidiyum Iyodit (PI) Yöntemi	30
3.6. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. EAE Klinik Bulgular.....	32
4.2. Serum anti-MOG düzeyleri.....	33
4.3. İmmunohistokimya görüntüleri	33
4.4. Annexin V/PI	35
4.5. Perisit Hücre Kültürü Supernatant IL-6 ve IL-17a Düzeyleri	36
4.6. EAE Fare Serum IFN γ , IL-17a ve IL-4 düzeyleri	37
5. TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	43
ETİK KURUL KARARI	55
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	56
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. McDonald Tanı Kriterleri (2017).....	10
Tablo 2-2. MS Hastalık Düzenleyici Tedavi.....	12
Tablo 2-3. MS Semptomik Tedavi.....	15
Tablo 3.1. Deney grupları.....	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Sağlıklı ve MS hastası bireyde aksonların görünümünün şematik şekli.....	2
Şekil 4-1. EAE modeli farelerin kontrollerine göre klinik bulgularının karşılaştırılması.....	31
Şekil 4-2. Anti-MOG antikor düzeylerinin ELISA ile değerlendirilmesi.....	32
Şekil 4-3. 15 günlük EAE modelinde lezyonun ışık mikroskobu 5x büyütme görüntüsü.....	33
Şekil 4-4. 15 günlük EAE modeli ışık mikroskobu görüntüsünde lezyon ve kontralateralindeki lezyon olmayan bölgenin 20x büyütmede karşılaştırılması.....	33
Şekil 4-5. Annexin V/ Pi akım sitometrisi görüntüleri.....	35
Şekil 4-6. EAE fare serumu ile muamele edilmiş HBVP hücrelerinin Annexin V/PI boyanma yüzdeleri.....	36
Şekil 4-7. EAE serum IFN gamma, IL-17a ve IL-4 düzeyleri.....	36

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

‰: Yüzde

-: Negatif

+: Pozitif

0C: Santrigrad derece

µl: Mikrolitre

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CD 4,8: Yüzey farklılaşma antijenleri

EAE: Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelitis (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)

EBV: Epstein-Barr virüsü

FBS: Fetal Sığır Serum

GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları

HLA: İnsan lökosit antijeni

IFN-γ: İnterferon beta

IgG: İmmünglobulin G

IL-4, 6, 17,: İnterlökin-4, -6, -17

KBB: Kan Beyin Bariyeri

KİS: Klinik İzole Sendrom

ml: Mililitre

MOG: Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MS: Multipl Skleroz

MSS: Merkezi sinir sistemi

NK: Doğal öldürücü hücre

NKT: Doğal öldürücü T hücresi

ng: Nanogram

OKB: Oligoklonal bant

PBS: Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi

PPMS: Primer Progresif Multipl Skleroz

RİS: Radyolojik İzole Sendrom

RRMS: Ataklarla Yineleyen Multipl Skleroz

RPM: Dakikadaki devir sayısı

RPMI1640: Roswell Park Memorial Institute 1640 medium

SPMS: Sekonder Progresif Multipl Skleroz

TNF- α : Tümör nekroz faktörü-alfa

Treg: Düzenleyici T hücreleri

UVB: Ultraviyole B

ÖZET

Ulusoy, C.A. (2019). Multiple Skleroz Patofizyolojisinde Perisitlerin Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Multipl Skleroz (MS), öngürülemeyen ataklarla seyreden merkezi sinir sisteminin (MSS) demiyelinizan ve inflamatuvar bir hastalıdır. MS, ile ilgili yapılan çalışmalar, inflamasyonun ilk olarak periferde başlayıp kan beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğünün bozulması ile MSS'yi etkilediğine işaret etmektedir.

KBB'ni oluşturan hücrelerden biri olan perisitler, uzun yıllardır damar yapılarını çevreleyen ve kasılabilme fonksiyonları ile kan damarlarından geçen kan miktarını düzenleyen bir hücre grubu olarak bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, perisitlerin bu fonksiyonu dışında birçok immünolojik reaksiyon özelliği olduğunu da göstermiştir.

Bu çalışmamızda amacımız, nöroinflamatuvar bir hastalık olan MS'in patogenezi ile perisit arasında özellikle perisit sağkalımı ve inflamasyon açısından karşılıklı etkileşimlerini ortaya koymaktır.

Bu amaçla klasik MS modeli olan ve miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) antijeni ile immünizasyon ile oluşturulan deneysel otoimmün ensefalomyelitis (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) hayvan modelini oluşturduk. Erken (15 gün) ve geç (40 gün) dönemde EAE perisit etkileşimini araştırdık. Erken ve geç dönem EAE grupları ve kontrollerinde klinik bulgular gözlemledik. Bu deney hayvanlarının serumları ve beyin örneklerini aldık. Beyin örneklerinde MS lezyon alanlarında immünolojik parametre ve perisitleri histolojisini, serum örnekleri ile anti-MOG antikor titresi, proinflamatuvar sitokinler (interferon gamma (IFN γ) ve interlekin (IL) 17, anti-inflamatuvar sitokin IL-4 ve insan damarsal perisit hücre hattına sağkalım ve IL-6, IL-17 salınımı açısından etkisini inceledik. Bunun sonucunda perisitlerin bir kısmının inflamatuvar karakter kazandığını, diğer perisitlerin ise sağ kalımının olumsuz etkilendiğini gösterdik. Ayrıca lezyon alanlarına bakıldığında perisitlerin parankimal lezyon alanlarındaki miktarlarının arttığını gözlemledik.

Çalışmamız perisitlerin MS patogeneziinde rolü olduğunu düşündürmektedir. İleride perisitlerde gözlediğimiz inflamasyon ve apoptoz mekanizmalarının daha ayrıntılı çalışılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : multipl skleroz, demiyelinizasyon, perisit, apoptoz, otoimmünite

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 116S552

ABSTRACT

Ulusoy, C.A. (2019). The role of pericytes in the pathophysiology of multiple sclerosis. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Neuroscience. Doctoral Thesis İstanbul.

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of central nervous system (CNS) characterized with demyelination and unpredictable clinical attacks. Studies indicate that inflammation firstly starts in the peripheral immune system and then effects CNS due to the disturbance of blood brain barrier (BBB) system.

Pericyte is a cell type that is mostly found in BBB and known as regulator of blood volume in veins, by virtue of its ability of contraction. Recent studies show that pericytes also have immunological functions in CNS.

Our aim was to find out the interactions between MS pathogenesis and the response of pericytes to inflammation during MS pathogenesis.

For this reason we immunized mice with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) to induce experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). We investigated EAE and pericyte interactions at early stage (15 days) and late stage (40 days) experiment groups. We observed clinical symptoms, collected sera and brain samples. We investigated the histopathology of the brain samples, serum levels of anti-MOG antibody and cytokines (IL-6, IFN γ , IL-17). Moreover human vascular pericyte cells were treated with serum samples of EAE and thereafter IL-6 and IL-17 release and viability of the cells were investigated. As a result, we showed that some pericytes gain inflammatory features and the others undergo apoptosis. Also immunohistochemistry studies showed increased pericyte content in EAE lesion sites.

In conclusion we suggest that pericytes have important roles in MS pathogenesis. In future studies inflammation and apoptosis aspects of pericytes should be studied in greater detail.

Key Words: multiple sclerosis, demyelination, pericyte, apoptosis, autoimmune

The present work was supported by TÜBİTAK. Project No. 116S552

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl skleroz (MS); genellikle birkaç günden birkaç aya kadar süren ataklarla seyreden, merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik otoimmün demiyelinizan ve nörodejeneratif bir hastalıdır (Goodin, 2014; Gontika ve Anagnostouli, 2018). MSS'nde inflamasyondan zengin lezyon alanları ile karakterizedir. MS'in oluşumu ile ilgili teorilerde çoğunlukla kabul gören, immün hücrelerin ilk olarak çeşitli sebeplerle periferde uyarıldığı sonrasında bir şekilde kan beyin bariyerini (KBB) aşarak MSS'de inflamasyonun olduğudur (Hemmer ve ark.,2015).

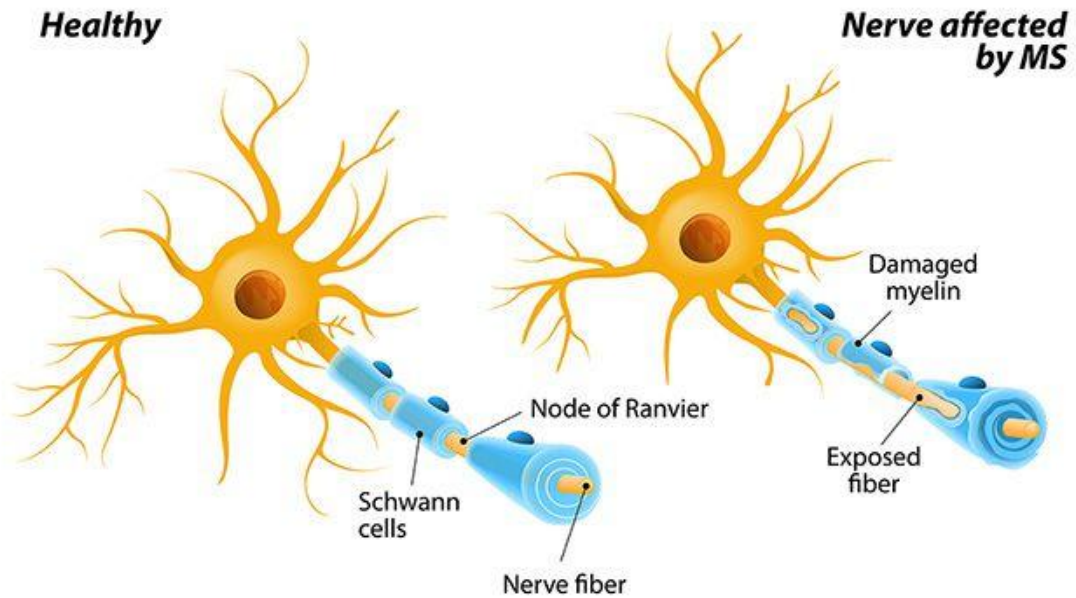
KBB; beyni, periferdeki nöronlara zararlı olabilecek biyokimyasal olay ve moleküllerden koruyan bir yapıdır. Bu yapının elemanlarından biri olan perisitler, sadece KBB'de değil vücuttaki diğer bütün damarlarda bulunur ve kasılabilir yetenğı sebebiyle kan akımını düzenlediğı uzun zamandır bilinmektedir. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar perisitlerin immünolojik pekçok fonksiyonu olduğunu ve çeşitli hastalıklarda immünolojik açıdan rolleri olabileceğini göstermiştir.

Bu sebeple çalışmamızda amacımız farklı fonksiyonları keşfedilen perisitler ve MS'in MS patofizyolojisinin erken ve geç döneminde karşılıklı olarak birbirilerini nasıl etkilediğine yanıt aramaktı. Bunu ortaya çıkarmak için daha önceki çalışmaların da ışığında özellikle inflamasyon, perisitlerin lokalizasyonu ve perisit sağkalımı üzerinde durduk.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multipl skleroz

Multipl skleroz (MS); genellikle birkaç günden birkaç aya kadar süren ataklarla seyreden, merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik otoimmün demiyelinizan ve aynı zamanda nörodejeneratif bir hastalıdır (Goodin, 2014; Gontika ve Anagnostouli, 2018). Öngörülemez inflamatuvar ataklarda; en sık ve en şiddetli miyelin kılıf ve oligodendrositler, daha az derecede nöronlar ve aksonlar zarar görür (Goodin, 2016) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1. Sağlıklı ve MS hastası bireyde aksonların görünümünün şematik şekli.

“<https://www.prevention.com/health/a20500422/7-things-you-dont-know-about-multiple-sclerosis/>” dan alıntıdır.

2.1.1. Epidemiyolojisi

MS, dünya genelinde her 100.000 kişiden 50-300 kişide görülmektedir. 2013 verilerine göre bu hastalık dünya çapında 2.300.000 insanı etkilemektedir (Browne ve ark.,2014). MS, alt tipine ve coğrafik bölgeye göre değişmekle birlikte, genel olarak kadınlarda erkeklere oranla 2,5 kat daha sık görülmektedir (Turan, 2013).

Ülkemizde son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, MS prevalansı her 100,000 kişide 41,1 ila 101,4 arasındadır (Türk Börü ve ark.,2018).

2.1.2. Risk Faktörleri

MS, genetik ve çevresel faktörlerin bir arada rol oynadığı multifaktöryel bir hastalıktır. Bu başlık altında, üzerinde en çok konuşulan faktörler ele alınacaktır.

2.1.2.1. Epstein-Barr Virüsü

Epstein-Barr virüsü (EBV), çift zincirli DNA'ya sahip Herpes ailesi virüslerinden biridir. Dünya çapında %95 oranında görülen oldukça yaygın bir virüstür (Luzuriaga ve Sullivan,2010). EBV enfeksiyonlarının önemli bir kısmı asemptomatiktir. Çoğunlukla erken çocukluk çağında görülür, daha ileriki yaşlarda EBV'ye maruz kalınması, enfeksiyöz mononükleoz görülme olasılığını artırır (Dunmire ve ark., 2015).

Toplumda sık görülen bir virus olmasına rağmen, birçok çalışma EBV ile MS arasında bir ilişki olabileceğini ortaya koymuştur. Bu ilişkiyi destekleyen çalışmalarda; MS hastalarında, artmış Epstein-Barr nükleer antijeni (EBNA-1) titresinin olduğu (Sundstrom ve ark., 2009; Sundqvist ve ark., 2012) ve enfeksiyöz mononükleoz görülme insidansının yüksek olduğu gösterilmiştir (Nielsen ve ark.,2007). Ayrıca MS hastalarının neredeyse %100'ünün MS olmadan önce bir şekilde EBV ile enfekte olduğunun gösterilmiş olması, EBV'nin MS patogenezinde rol oynadığı görüşünü desteklemektedir (Levin ve ark.,2010).

Fakat EBV'nin MS ile ilişkisiyle ilgili hala yanıtlanması gereken sorular bulunmaktadır. Bunların en başında, EBV virüs enfeksiyonu ile değişen CD8⁺ T hücre yanıtı (Pender ve ark.,2009, Lindsey ve Hatfield, 2010, Angelini ve ark.,2013) ve MSS'de EBV DNA'sı varlığı ile ilgili literatürde birbiri ile tutarsız yayınların bulunmasıdır. Çalışmalar arasındaki bu tutarsızlığın daha çok metodoloji ile ilgili olduğu belirtilse de; aynı hastalara ait örneklerin bulunduğu kohortların kullanıldığı bu çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesi, EBV ve MS ilişkisini tam olarak açıklamayı zorlaştırmaktadır (Peferoen ve ark.,2010).

Bir diğer EBV ile MS ilişkisini sorgulatan durum ise, hastalarda EBV enfeksiyonu ile MS kliniği görülmesi arasında onyıllar kadar uzun süre olmasıdır. Ayrıca EBV enfeksiyonu dünya popülasyonunda %95 oranında görülürken, MS dünya çapında çok daha küçük bir oranda görülmektedir. Bu sebeplerden EBV'nün, MS'in nedeni mi yoksa oluşan patogeneze sekonder etkisi olan bir faktörü mü olduğu bilinmemektedir (Laurence ve Benito-Leon, 2017).

2.1.2.2. Vitamin D

Vitamin D (kolekalsiferol), aslında bir vitaminden çok sekosteroid hormondur ve ya beslenme ile alınır ya da UVB varlığında deride 7-dehidroksikolesterolden sentez edilir (DeLuca, 2004; Tavera-Mendoza ve White, 2007). Uzun yıllardır kemik metabolizmasına olan etkileri bilinmekle beraber son 15 yılda özellikle immünomodülatör sisteme katkısı olduğu gösterilmiştir (Pierrot- Deseilligny ve Souberbielle, 2017).

UVB ile vücudun ihtiyacı olan vitamin D'nin %80-90'ı karşılanabilmektedir (Wacker ve Holick, 2013). Enleme bağlı güneşe maruz kalma süresi ve buna bağlı vitamin D sentezinin artması ile MS riski arasında negatif korelasyon gözlemlenmiştir. Bir diğer deyişle; MS riskinin ekvator düzeyinde minimal, daha yüksek enlemlere doğru gidildiğinde ise riskin arttığı uzun zamandır yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Simpson ve ark., 2011). Göç çalışmalarında gösterildiği üzere, 10-20 yaş arasında yüksek enlemde düşük enleme göç edenlerde (ekvatora yaklaşanlarda) MS riskinin azaldığı, tam tersi olarak yine aynı yaş aralığında düşük enlemde yüksek enlemlere göç edenlerde (kutuplara yaklaşanlarda) MS riskinin arttığı gözlemlenmiştir (Handel ve ark., 2010, McLeod ve ark.,2011). Fakat yüksek enlemde yaşamalarına rağmen MS riskinin oldukça az olduğu iki topluluk vardır: Eskimolar ve Laponyalılar. Bu toplumlar, diyetlerinde yoğun olarak yağlı balık ve ren geyiği eti tüketirler. İki besinin de vitamin D oranı yüksektir (Gillie, 2006). Bu durum UVB'nin vitamin D'ye bağlı mekanizmalar üzerinden sekonder olarak MS riskine etki ettiğini düşündürmektedir (Goodin, 2016).

MS'in otoimmün bir hastalık olması ve yapılan çalışmalarda MS hastalarındaki serum vitamin D düzeyinin kontrol gruplarına göre düşük olduğunun gösterilmesi (Nieves ve ark.,1994; Munger ve ark.,2006; Van der Mei ve ark.,2007), vitamin D'nin bağışıklık sistemini düzenleyici bir görevi olduğunu düşündürmektedir. Gerçekten de literatüre bakıldığında; vitamin D reseptörünün (VDR) T hücrelerinde (Veldman ve ark., 2000), dendritik hücrelerde (Hewison, 2012), monosit ve makrofajlarda (Bhalla ve ark., 1983; Veldman ve ark.,2000), aktif B hücrelerinde (Chen ve ark., 2007) ve hatta nöron ve glial hücrelerde (Baas ve ark., 2000; Langub ve ark., 2001) bulunduğu görülmektedir. Ayrıca monosit hücre kültürü, vitamin D ile muamele edildiğinde VDR'ye bağlı MHC II kaybı ve kostimülatör moleküllerde azalış olduğu gösterilmiştir

(Rigby ve ark., 1990; Almerighi ve ark., 2009). Monositlerde vitamin D varlığında IL-1 α , IL-6, IL-12, TNF α ve IP-10 gibi proinflamatuvar faktörlerin salınımında azalış olduğu gösterilmiştir (Zarrabeitia ve ark., 1992; Kuo ve ark., 2010). Buna ek olarak, yine hücre kültürü çalışmalarında vitamin D'nin B hücre proliferasyonunu, plazma hücre farklılaşması ve IgG, IgM üretimini ve hafıza B hücresi oluşumunu inhibe ettiği; proliferen B hücrelerini de apoptoza uğrattığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2007). T hücrelerine de etki eden vitamin D, Th1 ve Th17 hücre proliferasyonunu ve bunlara ait sitokinlerin üretimini baskılamış, buna karşılık Th2 ve Treg hücre proliferasyonu ve bu T hücre alttiplerine ait sitokinlerin üretimini desteklemiştir (Jeffery ve ark., 2009).

Bütün bu veriler, MS ile vitamin D arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu yüzden MS hastalarında vitamin D takviyesi uygulamasının, MS'i iyileştirip iyileştirmeyeceği ile ilgili klinik çalışmalar yapılmıştır. Interferon beta (IFN- β) tedavisine vitamin D₃ün eklenmesi ile hastaların MR aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir (Soilu-Hanninen ve ark., 2012). Ayrıca MS hastalarına orta seviyede vitamin D takviyesinin serumda transform büyüme faktörü beta (transforming growth factor beta; TGF- β) seviyesini arttırdığı, Th17 ve efektör hafıza T hücre oranını azalttığı gösterilmiştir (Mahon ve ark.,2003; Sotirchos ve ark., 2016). Doz bağımlı yapılan çalışmalarda ise 44ng/mg 'a kadar olan serum vitamin D seviyesinin MS açısından fayda sağladığı, daha yüksek seviyelerde ise plato etkisinin görüldüğü belirtilmiştir (Pierrot-Deseilligny ve ark.,2012).

Bütün bu çalışmalar, daha çok atak ve iyileşmelerle giden MS (relapsing-remitting MS; RRMS)'de sonuç vermiş olup; progresif seyirli giden MS'lerde vitamin D ile ilgili anlamlı bir fayda görülememiştir (Muris ve ark.,2016; University of California ve ark., 2016).

2.1.2.3. İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen; HLA) ve Diğer Genetik Faktörler

Genetik faktörlerin MS oluşumunda rol oynayabileceği ile ilgili ilk tespitler, MS hastaları ve aileleri ile yapılan çalışmalardan gelmiştir. Kardeşi MS olan birinin MS olma ihtimali genel popülasyona göre 20-30 kat daha fazladır. Genetik benzerlik oranı arttıkça, örneğin monozigot ikizlerde, bu oran 200 kata kadar çıkmaktadır (Ebers ve ark., 1995; Willer ve ark.,2003;Nielsen ve ark.,2005;Ristori ve ark.,2006).

İnsan Lökosit Antijenleri (Human Leukocyte Antijen; HLA), birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi MS’de de çokça araştırılmış ve çeşitli HLA molekülleri ile MS arasında hastalık riskini artırıcı ya da hastalıktan koruyucu ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Örneğin; HLA-DRB1*15:01 alleli taşıyanların bu alleli taşımayanlara göre MS olma ihtimali 2-3 kat daha fazladır (Patsopoulos ve ark.,2013). Yapılan çalışmalar, HLA lokuslarının MS genetik riskine %20-30 arasında katkı yaptığını belirtmektedir (Haines ve ark.,1998).

HLA dışı genetik risk faktörleri ile ilgili ilk bilgiler, bir GWAS çalışmasında IL-2RA ve IL-17RA ile MS arasında gösterilen ilişkiyle gelmiştir (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium ve ark.,2007). Daha sonra devam eden GWAS çalışmalarıyla şüpheli genlere CD58, TYK2, STAT3 ve TNFRSF1A eklenmiştir (Sawcer ve ark.,2014).

İlginç olarak, RRMS ve primer progresif MS (PPMS) arasında farklı gen anlatımları da gösterilmiştir (Koch ve ark., 2018).

2.1.3. Alt tipleri

2.1.3.1. Radyolojik İzole Sendrom (RİS)

MS’e ait herhangi bir şikayet ya da bulgu olmadan, başka sebeplerden ötürü çekilen MR’da MS’i düşündüren lezyonların görülmesi durumudur (Okuda ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda bu hastaların %45’inin 5 yılda MS tanısı aldıkları gösterilmiştir (Siva ve ark.,2009). Ayrıca son yıllarda yapılmış çok-merkezli bir çalışma, erkek cinsiyet ve spinal kord lezyonuna sahip RİS’lerin PPMS’e dönüşme riski olduğunu ve RIS’in MS spektrumunun biyolojik bir parçası olduğunu önermiştir (Kantarci ve ark.,2016).

2.1.3.2. Klinik İzole Sendrom (KİS)

PPMS hariç; MS hastalarının çok büyük bir kısmının hastalığı aslında tek atakla, yani KİS olarak başlar ve bu atak genellikle optik sinir, beyin sapı, serebellar ve/veya omurilik tutulumu gösterir (Thompson ve ark.,2018).

Fakat her KİS, MS’e dönüşmemektedir. 5 yıl içinde, BOS ve MR bulguları negatif olan hastalarda %30, bu tanı yöntemlerinden birinde pozitiflik görülmüş ise

%50, her iki tanı yönteminde pozitiflik yakalanmış ise %80 oranında MS'e dönüşüm gözlemlenmiştir.

KİS'li hastalarda son yıllarda yapılan çalışmalarda, hastaların kognitif fonksiyonlarının sağlıklı kontrollere göre düşük olduğunun saptanması, aslında prelinik seviyede bu hastalarda MS patofizyolojisinde görülen demiyelinizasyon ve nörodejenerasyon yolaklarının devrede olduğunu düşündürmektedir (Miller ve ark.,2005a; Miller ve ark.; 2005b).

2.1.3.3. Atak ve İyileşmelerle Giden MS (Relapsing-Remitting MS; RRMS)

RRMS, atak ve tam ya da tama yakın iyileşmelerle seyreden ve MS hastalarının %85'inde görülen en yaygın MS türüdür. Ataklar saatler-günler içerisinde gelişir, haftalar-birkaç aya kadar düzelir. Ataklar arası dönemde hasta nörolojik olarak stabildir (Compston ve ark.,2006).

Doğal seyrinde hastalık yavaş seyirlidir ve hastaların yaklaşık %50'sinde semptomların başlamasından tek taraflı yardımla yürüme ihtiyacının gözükmesine kadar geçen süre genellikle 15-20 yıldır.

Hastalığın bu alttipi inflamasyon ağırlıklı seyreder. MRG'de kontrast tutulumu fazladır. Beyin atrofisi ve akson kaybı azdır(Turan,2013). RRMS hastalarının MRG görüntülerine bakıldığında sıklıkla T2 ağırlıklı sekanslarda veya KBB inflamasyona bağlı fokal yıkımdan dolayı, gadolinum pozitif lezyonlar görülür(Compston ve ark., 2006).

2.1.3.4. Sekonder Progresif MS (SPMS)

RRMS hastalarının %15-30 kadarında; yaklaşık 15-20 sene sonunda nörodejenerasyonun ön plana geçtiği, atakların azaldığı bunun yerine progresif fazın hakim olduğu bir döneme geçilir (Turan,2013; Thompson,2018).

Bu dönemde ,MRG bulgularında akut inflamasyon göstergesi olan yeni T2 veya gadolinum pozitif lezyon alanları yerine, beyin atrofisi ön plana çıkmaktadır.

Erkek cinsiyet, ilk atakların sık olması, erken dönemde motor ve serebellar bulgu ve tutulumların olması, hastalığın beşinci yılında orta derecede sekellik görülmesi ve MRG yükünün fazla olması SPMS için risk faktörleridir (Goodin, 2016).

2.1.3.5. Primer Progresif MS (PPMS)

MS hastalarının %10'unu kapsar ve hastalığın başından itibaren akut atak dönemleri olmaksızın sürekli progresyon ile izlenir.

SPMS'de olduğu gibi MRG bulgularında aktif inflamasyon alanları az, nörodejenerasyon ön plandadır. Ayrıca yine SPMS'ye benzer ve RRMS'den farklı olarak; cinsiyet oranı eşit, 40'lı yaş başlangıçlı ve mevcut tedavilere daha dirençlidir (Turan,2013; Goodin,2016).

2.1.4. Klinik

MS, her yaşta görülebilmekle beraber sıklıkla 20-40 yaş arası genç erişkin bireyleri etkilemektedir. Kadın erkek oranı yaklaşık 2:1 dir (Turan, 2013)

2.1.4.1. Belirti ve Bulgular

2.1.4.1.1. Motor Semptomlar

En sık görülen belirtiler motor bulgulara aittir. Genellikle tek taraflı alt ekstremitte etkilenmesi ile başlar, daha sonra çift taraflı tutulum görülür. Derin tendon reflekslerinde artma ve patolojik refleks görülür. Bu belirtilere genelde bacakta spastik paraparezi eşlik eder.

Üst ekstremitede güçsüzlük distal kaslarla sınırlıdır.

Motor semptomlar egzersiz ve ısı ile kötüleşebilir (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.1.2. Somatosensoriyal Bulgular

Somatosensoriyal belirtiler, MS hastalarının hemen hemen hepsinde görülen ve en sık karşılaşılan ilk semptomlardır. Hastalar bu belirtileri genellikle yanma, uyuşma, gerilme ve karıncalanma olarak tanımlarlar. Vibrasyon ve pozisyon duyusu kaybolabilir.

En sık görülen somatosensoriyal bulgu Lhermitte bulgusudur, boynun ani öne fleksiyonu ile omurilikte, kol ve bacaklarda ani elektriklenme, çarpılma hissidir. Fakat bu belirtinin MS'e spesifik olmadığı unutulmamalıdır.

MS hastalarında çoğunlukla görülen bir diğer bulgu nöropatik ağrıdır. Ayrıca spastisite nedeni ile bacaklarda ağrı ve kramp da görülür (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.1.3. Beyin Sapı Semptomları

Bu tutulumun en sık görülen belirtisi oküler hareket bozukluklarıdır. Nistagmus, bulanık görme, görüntünün zıplaması, çift görme ve odaklanamama başlıca bulgulardır.

Dizartrik konuşma sıklıkla görülen bir başka beyin sapı semptomudur. Konuşmalar patlayıcı ya da sarhoş konuşması tarzındadır. 9. ve 10. kraniyal sinirlerin etkilenmesine bağlı olarak nazal konuşma görülebilir (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.1.4. Görme Yolları Semptomları

Optik nöropati, genel MS popülasyonunun %17'sinin başlangıç belirtisidir ve %50'den fazla MS hastası hayatı boyunca en az bir kez optik nöropati atağı geçirir. Göz hareketlerine bağlı göz çevresinde ağrı ile birlikte görme keskinliği azalır, görme kayıpları oluşabilir.

Isı yine burada kötüleştirici bir faktördür: Vücut ısı arttığında görmenin bulanıklaşıp tekrar eski haline döndüğü Uthoff belirtisi görülebilir (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.1.5. Serebellar Bulgular

Yürüme ataksisi başlangıç bulgularının %11'inde görülür. Diğer serebellar bulgular: ataksi, dismetri, disdiadokokinezi, aksiyon tremorudur (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.1.6. Kognitif ve Psikiyatrik Bulgular

Kognitif bozukluklar MS hastalarının %40-70'inde bulunur. MS'in başlangıç yaşı, süresi ve fiziksel özürüllüğünden çok MRG'de görülebilecek beyin atrofisi, genişlemiş ventrikül ve korpus kallosum; kognitif bozukluklarla pozitif korelasyon gösterir. MS hastalarında sıklıkla bellek bozulması, dikkatsizlik, yavaş bilgi işleme görülür.

Psikiyatrik bulgular olarak anksiyete ve depresyon en sık görülen semptomlardır. Psikotik bulgular MS başlangıcındaki az sayıdaki hastada gözlemlenmiştir (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.1.7. Yorgunluk ve Uyku Bozuklukları

Yorgunluk, MS'in en sık görülen belirtilerinden birisidir. Hastaların neredeyse %80'inde görülür.

Uyku bozuklukları normal popülasyona göre 3 kat daha fazladır. Nadir olarak narkolepsi vakaları bildirilmiştir (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.1.8. Mesane, Barsak ve Seksüel Bozukluklar

MS hastaları genellikle sık idrara çıkma, idrarı yetiştirememesi, idrar kaçırma ve defekasyon bozukluklarından yakınır. Atakla birlikte ortaya çıkarak geçici olabilmekle birlikte, çoğunlukla kalıcıdır.

Seksüel işlev bozuklukları sıklıkla karşılaşılan ama toplumsal baskı yüzünden seyrek söz edilen belirtilerdir. Erkeklerde erektil işlev bozukluğu, ejakülasyon, libido azalması; kadınlarda yine libido azalması, orgazm olamama ve lubrikasyon sorunu olabilir (Eraksoy ve Akman-Demir, 2009; Turan,2013).

2.1.4.2. Tanı

Jean Martin Charcot, MS'i klinik ve histopatolojik olarak tarihte ilk tanımlayan kişidir ve özellikle histopatolojik bulguları günümüzde bile altın standart özelliğini korur Charcot MS'i, MSS'ini multifokal olarak etkileyen ve zamansal olarak tekrarlı veya progresif seyirli olarak tanımlamıştır(Charcot, 1889).

MS tanısı, günümüzde öncelikli olarak klinik bir tanıdır ve tanı için hastanın tıbbi öyküsü, nörolojik muayenesi, MRG ve diğer tanısal görüntüleme sonuçları, BOS tetkiki ve uyarılmış potansiyeller tetkiki değerlendirilir (Boz, 2013).

MS tanısı için 1950'lerden beri tanı kriterleri geliştirilmektedir (Boz, 2013). En çok kullanılan tanı kriterleri 1983'ten beri yayınlanan Poser ve 2001'den beri yayınlanan McDonald kriterleridir. McDonald kriterlerinin en son revize maddeleri Tablo 2-1 gibidir.

Tablo 2-1. McDonald Tanı Kriterleri (2017)

Klinik Durum	MS Tanısı İçin Ek Kriterlere
2 veya daha fazla atak ve 2 veya daha fazla lezyonun klinik kanıtı ya da; 2 ya da daha fazla atak ve farklı	Ek teste gerek yoktur.

lokasyonlarda lezyon içeren önceki atakların net tarihsel kanıtı ile 1 lezyonun klinik kanıtı	
2 ya da daha fazla atak ve 1 lezyonun klinik kanıtı	- Uzaysal dağılım, bu kriterlerden biri ile gösterilmelidir: - Farklı MSS alanını etkileyen ek klinik atak - MSS'nin periventriküler, kortikal, jukstakortikal, infratentoryal veya spinal kord alanlarından 2 veya daha fazlasında 1 veya daha fazla MS'e özgü T2 lezyonu
1 atak ve 2 veya daha fazla lezyonun klinik kanıtı	- Zamansal dağılım bu kriterlerden biri ile gösterilmelidir: - Ek klinik atak - MS tipik MRG lezyonlarının hem güçlendirici hem de güçlendirici olmayan eşzamanlı varlığı, veya yeni T2 veya güçlendirilmiş MRG lezyonunun karşılaştırılması - BOS OKB'leri
1 atak ve 1 lezyonun klinik kanıtı	- Uzaysal dağılım bu kriterlerden biri ile gösterilmelidir: - Farklı MSS bölgelerini etkileyen ek atak - MSS'nin periventriküler, kortikal, jukstakortikal, infratentorial veya spinal kord alanlarından 2 veya daha fazla bölgesinde 1 veya daha fazla MS'e özgü T2 lezyonu: - Zamansal dağılım bu kriterlerden biri ile gösterilmelidir: - Ek klinik atak - MS tipik MRG lezyonlarının hem güçlendirici hem de güçlendirici olmayan eşzamanlı varlığı, veya yeni T2 veya güçlendirilmiş MRG lezyonunun karşılaştırılması - BOS OKB'leri
1 yıllık hastalık ilerlemesi (geriye dönük	Uzaysal dağılım bu kriterlerden biri ile

veya ileriye dönük)	gösterilmelidir: • MSS'nin periventriküler, kortikal, jukstakortikal ve infratentorial alanlarından 1 veya daha fazla MS-tipik T2 lezyonu • 2 veya daha fazla T2 omurilik lezyonu • BOS OKB'leri
---------------------	---

2.1.4.3. Tedavi

MS tedavi yöntemleri, genel olarak, MS's spesifik olan hastalık-düzenleyici tedavi ve MS hastalığının diğer sistemlerde oluşturduğu semptomlar için yapılan semptomik tedavi olarak ikiye ayrılabilir.

2.1.4.3.1. Hastalık-Düzenleyici Tedavi

MS, temel olarak nöroimmünolojik bir hastalık olduğundan kullanılan tedaviler immüsupresan (fingolimod, natalizumab, ocrelizumab) veya immunomodülatuar (interferon beta, glatiramer acetate, teriflunomid) şeklinde olmaktadır.

Bu tedaviler, daha çok RRMS hastaları üzerinde anlamlı iyileşme gösterebilmektedir. Bu ilaçlardan sadece ocrelizumabın PPMS progresyonunu yavaşlattığı bildirilmiştir (Montalban ve ark.,2017).

Lisanslı hastalık-düzenleyici tedaviler ile ilgili özet bilgiler Tablo 2-2'de verilmiştir.

Tablo 2-2. MS Hastalık Düzenleyici Tedavi

Jenerik isim	Mekanizma	Kullanış
Avonex† (Interferonβ-1a)	Antijen sunumunu azaltır. T hücre çoğalmasını azaltır. Sitokin ekspresyonunu değiştirir. Immüsupresor mekanizmaları yeniden canlandırır.	Intramüsküler, haftada 1 defa

Rebif† (Interferon β -1a)	Antijen sunumunu azaltır. T hücre çoğalmasını azaltır. Sitokin ekspresyonunu değiştirir. Immunsupresor mekanizmaları yeniden canlandırır.	Subkütan, haftada 3 defa
Betaferon† (Interferon β -1b)	Antijen sunumunu azaltır. T hücre çoğalmasını azaltır. Sitokin ekspresyonunu değiştirir. Immunsupresor mekanizmaları yeniden canlandırır.	Subkütan, 2 günde 1 defa
Extavia† (Interferon β -1b)	Antijen sunumunu azaltır. T hücre çoğalmasını azaltır. Sitokin ekspresyonunu değiştirir. Immunsupresor mekanizmaları yeniden canlandırır.	Subkütan, 2 günde 1 defa
Plegridy† (Peginterferon β -1a)	Antijen sunumunu azaltır. T hücre çoğalmasını azaltır. Sitokin ekspresyonunu değiştirir. Immunsupresor mekanizmaları yeniden canlandırır.	Intramüsküler, 2 haftada 1 defa
Copaxone† (Glatiramer asetat)	Anti-inflamatuvar lenfositlerin proliferasyonunu uyarak T hücre farklılaşmasında değişiklik yapar.	Subkütan, her gün veya iki preparasyon olarak haftada 3 defa

Tecfidera† (Dimetil fumarat)	İnflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltır. Antioksidan yolakları aktive eder.	Ağız yoluyla günde 2 defa
Aubagio† (Teriflunomid)	Otoreaktif B ve T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. Anti-inflamatuvar yönde immünolojik sistemi regüle eder.	Ağız yoluyla, günde 1 defa
Gilenya (Fingolimod)	Lenfositlerin lenf nodüllerinden çıkmasını engeller.	Ağız yoluyla, günde 1 defa
Tysabri† (Natalizumab)	α -4 integrini bloklayarak lenfositlerin MSS'ye geçişini engeller.	İntravenöz, 4 haftada bir hastane kliniğinde uygulanmalıdır.
Mavenclad (Kladribin)	B ve T hücre sayısını azaltır	Ağız yoluyla, 2 kür 12 ay ara ile uygulanır.
Lemtrada† (Alemtuzumab)	anti-CD52 antikoru. B ve T hücre sayısını azaltır.	İntravenöz, 2 kür 12 ay ara ile uygulanır.
Ocrevus† (Ocrelizumab)	Anti-CD20 antikoru. B hücre sayısını azaltır.	İntravenöz, 4 kür 6 ay ara ile uygulanır.

2.1.4.3.2. Semptomik Tedavi

Semptomik tedaviler, MSS hasarına bağlı bulguları tedavi etmek amaçlı kullanılan farmakolojik ve diğer tedavi seçeneklerini kapsar. MS'in nedenlerinden çok, sekonder olarak etkilediği yolaklar üzerine etkilidir (Dobson ve Giovannoni, 2018).

Bu tedaviler ile ilgili özet bilgi Tablo2-3'te verilmiştir.

Tablo 2-3. MS Semptomik Tedavi

Semptom	Farmakolojik ve farmakolojik olmayan tedavisi
Spastisite	Farmakolojik: Baklofen, tizandin, gabapentin, dantrolen, klonazepam, botulin toksin enjeksiyonu, fenol enjeksiyonu Non-farmakolojik: Egzersiz, fizyoterapi, hidroterapi.
Yorgunluk	Farmakolojik: Amatadin, modafinil. Non-farmakolojik: Egzersiz, kognitif davranışsal terapi, iş terapisi.
Dolaşım bozukluğu	Farmakolojik: Fampridin Non-farmakolojik: Egzersiz, fizyoterapi
Ataksi ve tremor	Farmakolojik: Propanol, klonazepam, levetirasetam, izoniazid, botulin toksin enjeksiyonu. Non-farmakolojik: Fizyoterapi, belirli vakalarda cerrahi işlem
İdrar torbası disfonksiyonu	Farmakolojik: oksibutinin, tolterodin, solifenasin, desmopressin sprey, botulin toxin, kannabinoidler, mirabegron. Non-farmakolojik: Tibial sinir uyarımı, sakral nöromodulasyon, cerrahi müdahale.

Seksüel disfonksiyon	Farmakolojik: sildenafil, intraüretral alprostadil Non-farmakolojik: kognitif ve davranışsal terapi, pelvik duvarı fizyoterapisi
Barsak disfonksiyonu	Farmakolojik: laksatifler, rektal stimulanlar, transanal lavaj Non-farmakolojik: abdominal masaj, biofeedback alıştırması, rektal lavaj, sakral sinir uyarımı, tibial sinir uyarımı.
Depresyon ve duygusal labiliteler	Farmakolojik: antidepresanlar, amitriptilin, dekstrometorfan, quinidin. Non-farmakolojik: kognitif ve davranışsal terapi
Kognitif bozukluk	Farmakolojik: donepezil, memantin Non-farmakolojik: kognitif rehabilitasyon
Görme problemleri	Farmakolojik: gabapentin, memantin Non-farmakolojik: yok
Ağrı	Farmakolojik: amitriptilin, duloksentin, gabapentin, pregabalin, kapsaisin, karmazepin, aksarbazepin, lamotrigin, baklofen Non-farmakolojik: fizyoterapi, trigeminal nöroglia için cerrahi işlemler.

2.1.5. Multipl Skleroz Patogenezi

2.1.5.1. MS Immünohistopatolojisi

MS hasta beynindeki aktif lezyonlar, immunohistokimyasal analizde genel olarak 4 farklı patern gösterirler. Farklı paternler olması MS'nin bulunduğu evre ve

zaten MS'nin başlı başına heterojen bir hastalık olması ile ilgilidir (Lucchinetti ve ark.,1996; Lucchinetti ve ark.,2000; Lassman ve ark.,2001).

2.1.5.1.1. Patern 1

MS hastalarının %15'inde gözlemlenmiştir. Lezyon merkezinde küçük ven veya venüller bulunur. Sınırları keskindir. T hücreleri ve makrofajlar çoğunluktadır. Miyelin kaybı gözlenir. Plak çevresinde remiyelinizasyonun sonucu olarak gölge plak oluşumları görülür. Birçok RRMS hastası bu paterne sahiptir (Lucchinetti ve ark.,1996; Lucchinetti ve ark.,2000; Lassman ve ark.,2001).

2.1.5.1.2. Patern II

Hastalarda en çok rastlanan (%58 oranında) aktif plak paternidir. Antikor aracılı patern olarak da bilinir. Patern I'de gözlemlenen bütün immunopatolojik bulgular burada da gözlemlenir. Ek olarak, aktif miyelin yıkım alanlarında IgG ve kompleman depozitleri bulunur. Bazı RRMS hastalarında görülür (Lucchinetti ve ark.,1996; Lucchinetti ve ark.,2000; Lassman ve ark.,2001).

2.1.5.1.3. Patern III

MS hastaların %26'sında mevcuttur. Lezyon sınırları belirgin değildir ve inflamasyon alanında T hücreleri ve makrofajın yanı sıra aktif glia infiltrasyonu gözlenir. Miyelin kaybında özellikle miyelin ilişkili glikoprotein (myelin associated glycoprotein; MAG) azalması ön plandadır. Lezyon alanlarında apoptotik hücreler ve demiyelinizasyon beraber görülür (Lucchinetti ve ark.,1996; Lucchinetti ve ark.,2000; Lassman ve ark.,2001).

2.1.5.1.4. Patern IV

Hastaların %1'inde gözlemlenebilmiştir. İnflamasyon alanlarında T hücreleri ve makrofajlar yoğunluktadır. Ayrıca oligodendrosit kaybı gözlemlenir. Apoptotik hücre ölümü morfolojisine rastlanmaz. PPMS olgularında patern IV gözlemlenir (Lucchinetti ve ark.,1996; Lucchinetti ve ark.,2000; Lassman ve ark.,2001).

Bir diğer plakları sınıflama yöntemi ise plakların zamansal özelliklerine göredir (Wu ve Alvarez, 2011).

2.1.5.1.5. Akut MS plakları

Hastalığın en erken dönemini temsil eden bu plaklar; perivasküler alanda yoğun olarak gözlemlenir. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu, miyelin kaybı ve parankimal ödem bu plaklar için tipiktir. Oligodendrosit apoptozu ve yıkımı görülür (Greenfield ve ark., 2008; Popescu ve Lucchinetti, 2012).

2.1.5.1.6. Kronik plaklar

Aktif plaklardan farklı olarak bu plaklar hiposellüler özellik gösterir. Ayrıca miyelin kaybının yanı sıra, akut plaklardan farklı olarak gliozis yoğun olarak gözlemlenir. Kronik plaklar kendi içinde ikiye ayrılır: lezyon çevresinde aktif inflamasyonun olduğu kronik aktif plaklar ve inflamasyonun tamamen durduğu kronik sessiz plaklar (Greenfield ve ark., 2008).

2.1.5.2. MS İmmünolojik Mekanizmalar

MS; hem ak madde hem de gri cevheri etkileyen, otoimmün MSS hastalığıdır. İmmünolojik hücrelerin (T hücreleri, B hücreleri, doğal immünite hücreleri) aktif ve önemli rol oynaması, bu hastalığın otoantijenlere karşı yanıtla oluştuğunu düşündürmektedir (Thompson ve ark., 2018).

MSS miyelin kılıfı otoantijenlerine karşı yanıtın nasıl başladığı tam olarak bilinmemekle birlikte bunun iki şekilde olabileceği düşünülmektedir. İlk teori, MSS yerleşik modele göre, otoimmünite ilk MSS'de başlar, sonra parçalanmaya bağlı olarak otoantijenlerin açığa çıkan altbirimleri dolaşım sistemi ile pasif ya da antijen sunan hücreler aracılığı ile aktif bir şekilde periferik immün sisteme taşınır. Diğer teori, MSS dışı modele göre, mikrobial veya viral antijenle moleküler benzerlik sebebi ile otoantijen uyarımı, ilk periferde başlar. Kan beyin bariyerinin (KBB) yıkılması ile birlikte, bu miyelin kılıfı hedef olarak algılama potansiyeline sahip uyarılmış bağışıklık sistemi hücreleri MSS'ye geçer. Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında; RRMS'in MSS dışı teori, progresif MS'lerin ise MSS yerleşik model ile oluştuğu düşünülmektedir (Hemmer ve ark., 2015).

MS, uzun yıllardır T hücre aracılı otoimmün bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Gerçekten de MS lezyonlarına baktığımız zaman; büyük oranda T

hücreleri (özellikle CD8⁺ T hücreleri) ve makrofaj/mikroglial hücre aktivasyonu; daha az oranda B hücreleri ve diğer immün hücreler gözlemlenir.

Miyelin proteinlerine reaktif CD8⁺ T hücrelerinin hastalık patogenezinde önemli rolü olduğu uzun yıllardır çalışmalarla gösterilmiştir (Friese and Fugger, 2009). *In vitro* çalışmalarda CD8⁺ T hücrelerinin, nöron ve oligodendrositlere litik mekanizmalarla zarar verdiği; *in vivo* çalışmalarda ise MS lezyonlarındaki aksonal hasarın, lezyonlardaki CD8⁺ T hücre yoğunluğu ile korole olduğu gösterilmiştir (Jurewicz ve ark.,1998; Bitsch ve ark.,2000).

CD4⁺ T hücre alt tiplerinden Th1 ve Th17 hücreler, MS için önemli bir diğer T hücre gruplarıdır. Çeşitli çevresel ve genetik etmenlerin etkisiyle, periferde aktive olan CD4⁺ T hücrelerin MSS'ye göçü ile MS lezyonlarının oluştuğu düşünülmektedir (İdiman, 2013). Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda, hastalığı transfer edenin Th1 hücreleri olduğu önerilmiştir (Pettinelli ve ark., 1981). Fakat sonrasında devam eden çalışmalarla Th17 hücrelerinin MS patogenezinde çok daha önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur (Goverman, 2009). Bu çalışmalardan birinde genetik olarak IFN-gamma yetersizliği olan farelerde, MS hayvan modeli olarak kullanılan deneysel otoimmün ensefalomyelit (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) uygulanmış ve bu farelerin EAE modeli oluşumuna dirençli olmadığı gösterilmiştir (Chu ve ark.,2000).

Gerek insan MS lezyonlarında yoğun Th17 hücrelerinin gösterilmesi (Jadidi-Niaragh ve Mirshafiey,2011) gerek EAE çalışmalarında Th17 hücrelerinin ve ilgili yolların hastalık patogenezi ile anlamlı bulunması (Betelli ve ark.,2008), Th17'nin MS hastalığında önemli bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Özellikle Th17 hücrelerinin KBB bütünlüğünü bozduğunun gösterilmesi, MSS inflamasyonunda kilit bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Kebir ve ark.,2007). Ayrıca Th17; temel sitokini IL-17 aracılığı ile MSS immün yanıtında önemli hücreler olan mikroglia ve makrofaj aktivasyonunu, IL-9 ile de Th17'nin MSS göçünü arttırdığı gösterilmiştir (İdiman,2013).

MS, her ne kadar T hücre aracılı bir hastalık olarak tanımlansa da; bazı MS hastalarında miyelin kılıf antijenlerine karşı otoantikor bulunması (Staun-Ram ve Miller,2017), BOS'ta miyelin antijenlerine reaktif B hücre varlığı (Abaul-Enein ve ark.,2004), SPMS hastalarının parankim ve meninkslerinde lenfoid foliküllerin varlığı

(İdman, 2013) bazı MS hastalarının plazmaferez veya immunoabsorpsiyon tedavilerinden yararlanım sağlamaları (Keegan ve ark., 2005; Heigl ve ark.,2013) ve B hücre yüzey işareti CD20'ye karşı bir antikor olan rituxumabın MS tedavisinde kullanılması (Piccio ve ark.,2010); MS'de B hücrelerinin rolü olduğuna işaret etmektedir. Fakat rituxamb tedavisinin MS ataklarını azaltmasına karşın BOS'taki antikor seviyesini etkilememesi, B hücrelerinin hastalık patogeneze antikor mekanizmasından bağımsız etki ettiğini düşündürmektedir (Piccio ve ark.,2010; Michel ve ark.,2015). Gerçekten de yakın zamanda B hücrelerinin MHC sınıf II aracılığı ile T hücrelerine antijen sunduğu gösterilmiştir (Adler ve ark.,2017).

T regülatör hücreler (Treg), immünolojik sistemin aşırı ve uzun zamanlı reaksiyon vermesini engelleyen bir kontrol sistemidir (İdman, 2013). MS ile ilgili gerek *in vitro* gerekse *in vivo* çalışmalarda, bu regülatör sistemin çalışmasında aksaklık olduğu gösterilmiştir. MS'de Treg yapı ve işlevinin bozulduğunu gösteren mekanizmalar şöyledir: Foxp 3 ekspresyonunda azalış, Treglerin Th17'yi kontrol etme yeteneklerinde azalış, Treglerin timustan periferik göçünde azalma, Treglerin dönüşümünde artma ve TCR yapısında bozulma (Huan ve ark.,2001; Venkenve ve ark.,2008)

MS patogeneğinde NK hücrelerinin hem immünsupresif hem de proinflamatuvar etkileri vardır. İnsan NK hücrelerinin, sitotoksik CD56^{soluk} ve immünregülatör etkisi de bulunan CD56^{parlak} olmak üzere iki tipi vardır. MS hastalarının BOS'ları incelendiğinde CD56^{parlak}, serumlarına bakıldığında CD56^{soluk} seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca IFN- β , daclizumab, natalizumab gibi tedavilerin immünregülatör işlevi olan CD56^{parlak} popülasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Bielekova ve ark.,2006; Saraste ve ark.,2007; Putzi ve ark., 2010; Elkins ve ark.,2015).

2.1.5.3. MS Nörodejeneratif Mekanizmalar

MS otoimmün bir MSS hastalığı olarak tanımlansa da, hastalığın progresyonunda hatta daha en başında bile nörodejenerasyon kaçınılmazdır. Literatürde gittikçe artan sayıda çalışma, MS'de nörodejenerasyonun otoimmüniteye sekonder olarak ortaya çıkan bir durumdan ziyade hastalık patogeneğinde inflamasyonla beraber görülen paralel bir mekanizma olduğuna işaret etmektedir (Kawachi ve

Lassmann,2017). Hatta bu konu ile ilgili, bazı derlemeler ve çalışmalar MS'in aslında nörodejeneratif bir hastalık olduğu önermiştir (Trapp and Nave, 2008; Chaudhuri, 2013)

Charcot zamanından bu yana MS lezyonlarında nöroinflamasyon ile birlikte aksonal hasar/aksonal dejenerasyonun da görüldüğü bilinmektedir. (Charcot,1868; Kornek ve Lassmann,1999). Hatta radyolojik çalışmalar, sadece beyaz madde lezyonlarının değil; kortikal ve derin gri madde lezyonlarının da MS hastalarında görülen kognitif bozulma ve özürlülük gelişimi ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir (Rudick ve ark.2009; Harrison ve ark., 2015). Ayrıca erken dönem MS ve KIS hastalarının %38'inde, histopatolojik bulguların nörodejenerasyonla korole olduğu gösterilmiştir (Lucchinetti ve ark.,2011).

MS'deki nörodejenerasyonun moleküler mekanizmaları bugüne kadarki çalışmaların ışığındaki aşağıdaki gibi özetlenebilir (Kawachi ve Lassmann,2017):

- ✓ Mikroglia ve/veya makrofajlarda görülen oksidatif patlama
- ✓ Mitokondriyal hasar ve buna bağlı aksonal enerji kaybı
- ✓ Histotoksik hipoksi
- ✓ Wallerian dejenerasyonu
- ✓ Yaşa bağlı demir birikimi
- ✓ Menenjial inflamasyon
- ✓ Astrosit aktivasyonu

2.1.5.4. Kan Beyin Bariyeri ve Multiple Skleroz İlişkisi

Kan beyin bariyeri (KBB); beyin parankimi ve dolaşım sistemi arasında olan, beynin homeostazını korumak için kontrollü metabolik ürün değişimi yapan ve bağışıklık sistemi elemanlarını sınırlı geçiren fakat patojen ve periferde bulunabilecek nörotoksik maddelerin girişini engelleyen bir yapıdır. Bu yapı oldukça karmaşık olup nörovasküler birim (NVB) denilen dört elemandan oluşur: endotel hücreler, perisitler, astrositler ve bazal membran (Spencer ve ark.,2018).

Endotel hücreler arasında bulunan sıkı bağlar ve adheren bağlar (Ballabh ve ark.,2004), perisitlerin KBB oluşumuna ve vasküler sisteme etkileri (Armulik ve ark.,2010; Hall ve ark., 2014), astrositlerin anjiogenez ve taşıyıcı hücre yüzey elemanları ekspresyonuna katkısı (Alvarez ve ark.,2011) ile KBB kontrollü ve dinamik

olan yapısını korumaktadır. Bu yapının bozulması, direkt veya indirekt şekilde birçok MSS hastalığının oluşumuna neden olur.

MS'nin daha en erken evrelerinde KBB yapısı bozulur. Radyolojik incelemeler gadolinum pozitif lezyonlarda KBB yapısının bozulduğunu göstermiştir (Spencer ve ark.,2018). Sadece aktif lezyonlarda değil normal görünümlü ak madde de KBB bozulmasına bağlı MRG değişiklikleri mevcuttur (Filippi ve ark.,1998).

Ayrıca patolojik incelemelerle, KBB'deki sıkı bağların bozulması ile birlikte perivasküler alanda fibrinojen birikimi ve astrogliozis olduğu ortaya konmuştur (Alvarez ve ark.,2011). T hücrelerinden salınan matriks metalloproteinaz (MMP)-2 ve 9 KBB bazal membranına zarar verdiği bilinmektedir ve MMP-2 ve 9 "knock out" farelerin EAE direnci göstermesi, KBB'nin MS patogenezinde oldukça kilit bir rolde olduğuna işaret etmektedir (Agrawal ve ark.,2006).

KBB yapısı bozulmasına bağlı olarak MS hastalarının MRG'lerinde global serebral hipoperfüzyon görülmektedir (D'haeseleer ve ark.,2011). Ayrıca EAE modelinde, doku hipoksisinin nörolojik hasar ile direkt ilişkili olduğu, bu farelere uygulanan oksijen tedavisinden olumlu sonuçlar elde edildiği literatürde bahsedilmiştir (Davies ve ark.,2013).

İlginç olarak MS risk faktörlerinden olan Vitamin D, sigara ve patojen maruziyeti de KBB yapısının bozulmasında rol oynamaktadır. İskemi hayvan modelinde vitamin D'nin KBB geçirgenliğini VDR-NF-Kb-MM9 üzerinden düzenlediği gösterilmiştir (Won ve ark.,2015). Ayrıca subaraknoid kanama sıçan modelinde vitamin D'nin MS plaklarında bulunan ve pro-inflamatuvar reaksiyonları indükleyen osteopontini, glikoprotein osteopontin formunda ekspresyonunu artırarak hem KBB bütünlüğünü pozitif yönden hem de MS'ten koruyucu olarak etkilediği ortaya konmuştur (Enkhjargal ve ark.,2017).

Sigara içenlerde küçük damar hastalığı riski fazladır ve yapılan çalışmalarda da MS hastalığı ile küçük damar hastalığı arasındaki pozitif korelasyon ortaya konmuştur (Geraldine ve ark.,2017). Ayrıca sigara içimine bağlı olarak nikotin, serbest radikaller ve nitrik oksitin endotelial hücrelerdeki sıkı bağlantıları bozduğu belirtilmiştir (Naik ve Cucullo, 2015).

Patojenlerin hem MS patogenezinde rol oynayabileceği hem de MS ataklarını arttırdığı uzun zamandan beri bilinmektedir (Spencer ve ark.,2018). Özellikle EBV'nün MS oluşumunda rol oynadığı çokça söylenen bir patojendir. Bu virüsün konumuz açısından bir diğer ilginç özelliği, beyin mikrodamarlarındaki endotelial hücrelerde inflamatuvar yanıtı neden olarak KBB bütünlüğünü bozabileceğinin gösterilmiş olmasıdır (Casiraghi ve ark.,2011).

KBB ve MS arasındaki ilişkiler ortaya çıktıkça, çalışmalar KBB ile ilgili hastalıklarda kullanılan ilaçların MS'deki yararlanımını araştırmaya yönelmiştir. Bu konuda RRMS üzerine yapılan hayvan çalışmasında, EAE modelinde statin kullanımının faydalı olabildiği ama bu faydanın IFN- β tedavisi ile birlikte olduğunda antagonist etki göstererek atak sayısında artmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Progresif formdaki MS tiplerinde statin, kortikal atrofiyi azaltarak bu MS alttiplerinde daha başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır (Pihl-Jensen ve ark.,2015). Bir diğer dolaşım sistemi koruyucusu olarak kullanılan aspirinin MS'e pozitif etkisi olmadığı hatta hemoraji riskini arttırdığı tespit edilmiştir (Tsau ve ark.,2015).

2.1.5.5. Perisitlerin İmmünolojik Fonksiyonları ve MS İlişkisi

Perisitler, ilk olarak Rouget tarafından 1873'te tanımlanmış olup Rouget hücreleri olarak bilinmekteydi; fakat endotelleri çevrelemesinden ötürü Zimmermann tarafından 1913'te perisit (peri= çevre; sit= cytes =hücre) adıyla yeniden isimlendirilmiştir (ElAli ve ark.,2014).

Perisitler, kasılabilme yetenekleriyle damarlardan geçen kan miktarını düzenleyebildiği için, uzun yıllar boyunca beyin damar hastalıklarıyla ilişkilendirildi (Yemisci ve ark., 2009;Oztop-Cakmak ve ark.,2017). Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar, perisitlerin sadece kan akımını ve KBB bütünlüğünü düzenleyen bir hücre çeşidi değil; ayrıca nöroimmünolojik açıdan önemli görevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Perisitlerin; hem bazal seviyede hem de IL-1 β , TNF α , IFN γ ve LPS gibi inflamasyonu uyarıcı faktörlerle muamale edildiliğinde CCL2, MCP1 ve CXCL1 gibi kemokinleri ürettiği gösterilmiştir. Ayrıca perisitler, immünolojik uyarıya yanıt olarak, kendileri de IL-1 β , TNF α , IFN γ ve IL-6 üretirler (Pieper ve ark.,2013; Guijarro-Munoz ve ark., 2014; Matsumoto ve ark., 2014; Rustenhoven ve ark.,2016).

Uzun yıllardır perisitlerin bilinen özelliği KBB elemanı olduğudur ve KBB'nin morfolojisini ve fonksiyonunu koruması için perisitlere ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmalar perisit disfonksiyonu veya kaybında KBB'de sızıntılar olduğunu göstermiştir. Özellikle KBB yapısının bozulmasıyla beyin parankimine fibrinojen/fibrin infiltrasyonu gerçekleşir ve bu fibrin kümelenmesine yanıt olarak mikrogliya kemokin, antijen sunan hücre ve T hücre aktivasyonu gerçekleşir (Ryu ve ark.2015).

İlginç olarak son yıllarda yapılan *in situ* ve *in vitro* çalışmalarda perisitlerin 0,1-9 µm çapındaki materyali endositoz ile hücre içine alabildiği gösterilmiştir. Özellikle bu endositoz aktivitesi TNFα ve IFNγ gibi proinflamatuvar sitokinlerle artmakta, TGFβ ile bu aktivite azalmaktadır (Pieper ve ark.,2014; Rustenhoven ve ark.,2016).

Perisitlerin bir diğer önemli immünolojik fonksiyonu MHC II aracılığı ile CD4⁺ hücrelere antijen sunmasıdır. Fakat perisitler kostimülatör içermezler, bu yüzden daha çok T hücre anerjisini uyarır (Maier ve ark.,2011; Domev ve ark.,2014; Pierre ve ark.,2014).

Perisitlerin immünolojik fonksiyonlarının açığa çıkması ile otoimmün bir hastalık olan MS ile ilişkisi araştırılmaya başlanmıştır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda özet olarak perisitlerin oligodendrosit prekürsor hücreleri etkileyerek remiyelinizasyonu düzenlediği (Azevedo ve ark.,2018; Silva ve ark.,2019) ve MS insan beyinde perisitlerin aktif lezyon bölgelerinde inaktif bölgelere göre daha fazla bulunduğu gösterilmiştir (Iacobaeus ve ark.,2017).

2.1.6. MS Hayvan Modelleri

MS ile ilgili hayvan modelleri, MS hastalığının kendisi kadar çok çeşitlidir. MS ile ilgili ilk hayvan modeli, Rivers ve arkadaşları tarafından 1933'te maymunların tavşan beyin ekstraktları ile immünize edildiği EAE modeli ile oluşturuldu (Rivers ve ark.,1933). Daha sonraları bu modele adjuvan olarak tam Freund adjuvanı (complete Freund's adjuvant;CFA) (Freund ve McDermott, 1942) ve KBB geçirgenliğini bozmak için pertusis toksini (Munoz ve ark.,1984) eklendi. Zaman içerisinde birçok hayvanda denenmekle birlikte, fare ve sıçanlar modelin en iyi oluşturulduğu hayvan türleri oldu.

Farklı fare soylarını farklı miyelin proteinleri ile immünize ederek MS'in çeşitli alttipleri taklit edilir. Örneğin SJL/J farelerinin PLP miyelin proteini ile

immünizasyonu ile RRMS (Tuohy ve ark., 1989), C57BL6/J farelerinin MOG proteini ile immünizasyonu ile progresif MS türleri (Tompkins ve ark., 2002) modelleri oluşturulur. İmmünizasyon modeli ile MS için oldukça önemli olan başta CD8, CD4 T hücreler olmak üzere, B hücreleri, makrofajlar ve diğer immünolojik hücre ve faktörlerin patogeneze etkileri araştırılabilmiş ve MS ile ilgili önemli bilgiler elde edilebilmiştir (Procaccini ve ark., 2015).

Günümüz bilimsel yeniliklerin ilerlemesi ile özellikle başvurulmuş bir diğer MS modeli ise transgenik modellerdir. İlgili hedef faktör ile ilgili genin susturulmasıyla o molekülün hastalık oluşumunda önemli olup olmadığını anlamamızı sağlayan transgenik modeller MS için ilk defa Bettelli ve arkadaşları tarafından C57BL6/J fare soyundan gelen TCR azalmış transgenik farelerde MOG EAE modeli yapılarak oluşturulmuştur (Bettelli ve ark., 2003).

EAE immünizasyon modelleri, MS'in özellikle immünolojik yönlerin ve histopatolojisi hakkında bize bilgi vermekle birlikte kısıtlılıkları da mevcuttur. Spontan olarak hayvanlarda oluşturulamaması nedeni ile MS progresyonu hakkında detaylı bilgi verememesi, MS ataklarının EAE'de iyi taklit edilememesi, insanda beyin lezyon tutulumları fazla iken bu modelde omurilik tutulumlarının ön planda olması, insan MS ve EAE sürelerinin birbirinden çok farklı olması bu kısıtlılıklardan bazılarıdır (Procaccini ve ark., 2015).

Bir diğer EAE modeli MS risk faktörleri olan virüslerle hayvan modelinin oluşturulmasıdır. Bu modelle ilgili en bilineni fare MSS'inde demiyelinizasyona neden olduğu bilinen Theiler murin ensefalomyelit virüsünün (TMEV) kullanılmasıdır (Tsunoda ve Fujinami, 2010). Özellikle MS'in kronik progresif tipini iyi taklit etmesi, demiyelinizasyonu toksik etki ile değil immün sistemi uyararak yapması bu modelin pozitif taraflarıdır. MS araştırmaları için olumsuz yönleri ise TMEV'in sadece farede demiyelinizasyon yapması, diğer türler insan da dahil, demiyelinizan patolojiye sebep olamaması ve insan MS patofizyolojisinde kalıcı bir virüs enfeksiyonun gösterilememesidir (Procaccini ve ark., 2015).

Cuprizone ve lysolecithin ile yapılan toksik EAE modelleri, MS'in otoimmün mekanizmalarından ziyade de- ve remiyelinizasyon araştırmalarını yapmak için uygundur. Bu iki toksik madde farklı yollarla oligodendrositleri olumsuz etkileyerek demiyelinizasyona sebep olurlar (Blakemore ve Franklin, 2008).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Multipl Skleroz Hayvan Modeli Oluşturma

3.1.1. Fareler

Bu çalışmada 18-20 gram ağırlığında 24 adet C57BL/6 8-10 haftalık dişi fare kullanıldı. Hayvanlar İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Deneyler, erken dönem (15 gün) MOG-EAE (n=6), erken dönem kontrol CFA (n=6), geç dönem (40 gün) MOG-EAE (n=6) ve geç dönem kontrol CFA gruplarından (n=6) oluşturuldu. Hayvanların diyet programları ve bakımı İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 10.07.2017 tarihli toplantısında onaylanmıştır.

3.1.2. İmmünizasyon

Bu hayvan modeli daha önce literatürde tarif edildiği şekilde (Sharp ve ark.,2008) yapılmıştır. İmmünizasyon birer hafta ara ile 2 kez yapılmıştır ve immünizasyondan hemen sonra ve 48 saat sonra olmak üzere 2 kez fare başına 500 ng pertussis toksini %0,09 NaCl içeren fizyolojik tuz solüsyonu içinde intra-peritoneal olarak anestezi kullanmadan uygulanmıştır.

Fare başına total hacim 200 ul olacak şekilde, 200 µg MOG35-55 peptidi, ve 4 mg/ml inaktive Mycobacterium tuberculosis içeren tam Freund adjuvanı (complete Freund's adjuvant;CFA) ile emülsiyon haline getirilip, fareler subkütan olarak immünize edilmiştir.

MOG ile immünize edilen C57BL/6 farelerde oluşturulan EAE modelinde, immünizasyonun 10-15.gününden itibaren ilk klinik bulgular oluşmaya başlamaktadır ve izlemde bu bulguların artarak devam ettiği ve progresif hastalık için bir model olduğu görülmektedir. Kılıç ve arkadaşlarının yapmış olduğu EAE modelinde bu klinik durum 30.günden sonra stabil olarak izlenmiştir (Kılıç ve ark., 2015). Perisit fonksiyonlarının hastalığın erken evrelerinde bozulma ihtimalinden dolayı hastalık

modelini oluşturduktan 15 gün sonra sakrifiye edilecek fare grupları ve hastalığın 40. gününde sakrifiye edilecek fare grupları ayrı olarak oluşturulmuştur.

Deney grupları Tablo 3-1 belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Deney grupları

Grup	Sayı	Süre (gün)	Verilen maddeler
MOG- EAE	6	40	MOG, CFA
CFA	6	40	CFA
MOG-EAE	6	15	MOG, CFA
CFA	6	15	CFA

İn vitro deneylerde kullanmak üzere, in vivo deney sonunda fareler kardiyak perfüzyona maruz kalmadan hemen önce sol ventrikül içine yerleştirilecek bir enjektör aracılığı ile kan alınmış ve serum santrifüj ile ayrıştırılmıştır.

3.1.3. Farelerin Klinik Durumunun Değerlendirilmesi

Deney hayvanlarının ağırlıkları ve klinik skorları (0= sağlıklı, 1= kısmi düşük kuyruk, 2= düşük kuyruk, 3= arka ekstremitelerde pareziz 4=bir arka ekstremitenin paralizisi, 5= iki arka ekstemitenin de paraliz olması, 6= arka ekstremitler paraliz, n ekstremitlerde güçsüzlük, 7= arka ekstremiteler paraliz, bir n ekstremit paraliz, 8= n ve arka ekstremitelerin hepsi paraliz, 9= hiç hareket yok, nefes alma sıkıntılı, 10= ölüm) gün aşırı kaydedilmiştir (Bittner ve ark., 2014). Klinik başlangıç olarak klinik skor 1 referans olarak kullanılmıştır.

Ayrıca klinik durumu değerlendirmek için motor aktiviteyi ölçen asma testi immünizasyon öncesi ve deneylerin hayvan modeli kısmı bitene kadar gün aşırı yapıldı. Deney hayvanların kafes ızgarasında ters çevrilerek 100 cm yükseklikten yer çekimine karşı ızgaraya tutunarak durmaları gözlemlendi. Eşik değer olan 5 dakika süresince duramayan fareler 10 dakika dinlendirildikten sonra tekrar denendi. Beş dakika durabilen farelere bu tekrar yapılmadı.

3.1.4. In vivo deneyin sonlandırılması

Deney sonrası farelerin beyin dokusu, yüksek doz anestezi altında kardiyak perfüzyon ile % 10 formalin kullanılarak fikse edilip çıkarılmıştır.

3.2. Anti-MOG Antikörünün Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile Değerlendirilmesi

ELISA tablası, antikor ölçümleri için MOG35-55 proteini ile kaplama solüsyonu (karbonat-bikarbonat solüsyonu, pH 8.6) içinde kuyu başına 1 µg protein düşecek ve her bir kuyuda total hacim 100 µl olacak şekilde kaplandı ve gece boyu +4 derecede inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün tabla bir kez %0,05 Tween 20-PBS solüsyonu ile yıkandıktan sonra PBS içinde %5 “fetal bovine serum” (FBS-PBS) solüsyonu ile her bir kuyuda total hacim 100 µl olacak şekilde oda sıcaklığında 1 saat bloklama yapıldı. Ardından %2 FBS-PBS solüsyonu içinde 1:1000 oranında sulandırılmış fare serumları her bir kuyuya 100µl olarak konuldu ve 90 dakika +37 derecede inkübe edildi. %0,05 Tween-PBS solüsyonu her bir kuyuda 300µl olacak şekilde konuldu ve bu şekilde beş kere yıkama yapıldı. PBS içinde HRP-konjuge keçi anti-fare IgG sekonder antikor (Abcam, Cambridge, İngiltere) 1:5000 oranında sulandırıldı, her bir kuyuya total hacim 100 µl konuldu ve 90 dakika +37 derecede inkübe edildi. Tween-PBS solüsyonu her bir kuyuda 300µl olacak şekilde konuldu ve bu şekilde beş kere yıkama yapıldı. Substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) her kuyuya 100 µl konuldu. 10 dakika sonra reaksiyonu durdurma solüsyonu olarak 2M H₂SO₄ 100'er µl kuyulara konuldu. Hemen ardından 450 nm'de ELISA okuma işlemi gerçekleştirildi.

3.3. Demiyelinizasyonun Luxol Fast Blue Boyama ile Değerlendirilmesi

Beyin ve omurilik dokuları, kardiyak perfüzyon sonrası 10% formalinden sonra artan alkol serileri (%70,%80,%90,%96) ve ksilolde bir gün bekletilip dokular parafin kasetlerine alınmıştır. 5 µm'luk kesitler pozitif şarjlı lama alınmıştır. Luxol Fast Blue boyaması, deney hayvanlarının beyin ve omuriliklerindeki demiyelinizan alanları tespit etmek için kullanılmıştır. Bu deney, üretici firmanın (Abcam, Cambridge, İngiltere) talimatlarına uygun olarak yapılmıştır.

3.4. Perisit ve İmmünolojik Parametrelerin İmmünohistokimya ile Değerlendirilmesi

Bu deneyde hem EAE beyin ve omurilik dokularında MS lezyonlarının tespit etmek hem de lezyon alanları ve perisitlerin lokasyon olarak birbiriyle ilişkisini

belirlemek hedeflenmiştir. Bu kapsamda MS patogeneğinde önemli rolü olan ve lezyonlarda sıkça görülen sitotoksik T hücre işaretleyicisi CD8⁺, fare makrofaj işaretleyicisi F4/80 ve perisit işaretleyicisi PDGRF beta kullanılmıştır. Her bir deneyde pozitif kontrol olarak sağlıklı fare dalağı ilgili parametrelerle boyanmıştır.

Bu deneyde kısaca parafin kesitler deparafinize edilmiş ve antikora uygun solusyon ile mikrodalgada 20 dakika antijen açığa çıkarma uygulanmıştır. Sonrasında %0,3 H₂O₂ ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe dokular, dH₂O ile yıkanmıştır. Blokaj için %10 Fetal bovine serum (FBS) ile dokular oda sıcaklığında en az bir saat inkübe edilmiştir. Blokaj işleminden sonra ardı sıra gelen dokular tavşan anti-fare CD3⁺, CD8⁺, sıçan anti-fare F4/80 ve tavşan anti-fare PDGRF beta ile sırasıyla %5 FBS-PBS içinde 1:100, 1:200, 1:200 ve 1:50 dilüsyonlarında gece boyu +4 sıcaklıkta inkübe edildi. Ertesi gün her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere %0,05 Tween20-PBS ile yıkandı. Sekonder antikor olarak primerlere uygun olan HRP konjuge kit sekonder antikor kullanıldı (SensiTek HRP). Bu kite göre anti-polivalent ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler, yine %0,05 Tween 20-PBS ile yıkandı ve 20 dakika kadar HRP solusyonu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında taze olarak hazırlanan DAB solüsyonunda örnekler 5-10 dakika kadar boyanma durumuna göre tutuldu. DAB'tan sonra kesitler dH₂O ya alındı ve artan alkol serilerinden geçti. En son ksilendeki örneklerin entellan ile lamel kapaması yapıldı.

3.5. Fare Serumlarının Perisitlerin Canlılığına Etkisinin Araştırılması

3.5.1. Perisit Hücre Kültürü

İnsan beyin vaskular perisit hücre hattı (Sciencell, Kaliforniya, ABD) firmanın önerdiği şekilde büyütülmüştür ve pasajlanmıştır. Hücre hattını büyütmek için yüksek glikozlu Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle'ın medyumunu (DMEM), içinde %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin ile kullanıldı. Pasajlar, hücre hattı konfluensi en az %80 iken yapıldı.

3.5.2. Annexin V / Propidiyum Iyodit (PI) Yöntemi

Deney için pasaj 7 perisit hücre soyu kullanılmıştır. Annexin V/PI için 10.000 hücre yeterli olacağı için deney düzeneği 96lık hücre kültürü plağında yapılmıştır. Her bir fare serumu için üç tekrar olacak şekilde deney dizayn edilmiştir. Hücre kültürü

plağı bir gün öncesinden poli-L-lizin (PLL) (Sigma, St. Louis, ABD) ile kaplanmıştır. 37 derece inkübatör Ertesi gün bir kez fosfat tamponlu solusyon (phosphate buffered saline; PBS) ile yıkanan plağa kuyu başına 10.000 hücre 200 ul %10 FBS içeren DMEM yüksek glikozlu besiyeri içinde kuyulara ekilmiştir. Hücreler her gün takip edilerek konfluenti %70 olduğunda deney başlanmıştır. Daha önce perisitte annexin v pi yöntemi uygulayan bir çalışmayı referans olarak aldık (Ampofo ve ark., 2019).

Fare serumları 1:50 oranında FBS içermeyen besiyerinde dilüe edilmiştir. Her bir kuyu üzerinden 100 ul çekilip yerine 100 ul fare serumunu içeren besiyeri konulmuştur. 24 saat bekledikten sonra supernatantlar dikkatli bir şekilde toplanmış ve hücreler DMEM içinde 1X Tripsin ile 5 dakika muamele edilmiştir. Tripsinden sonra flow tüplerine alınan hücreler 1 ml PBS eklenerek 1800 rpm 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Hücre zarının boyanmadan önce en az 20 dakika 300 ul besiyeri içinde %5CO₂ içeren inkübatörde hücreler inkübe edilmiştir. Sonrasında 1500 rpm 5 dk hücreler santrifüj edilerek besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bundan sonra yapılan Annexin V/ PI (BD, New Jersey, ABD) boyamasında firmanın talimatları uygulanmıştır. Annexin V/ PI okumaları 12 renkli akım sitometresi (BD, New Jersey, ABD) cihazı ile değerlendirilmiştir. Hücre gruplarının belirlenmesi için veri analizlerinde FlowJo 7.6.5 analiz programı kullanılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

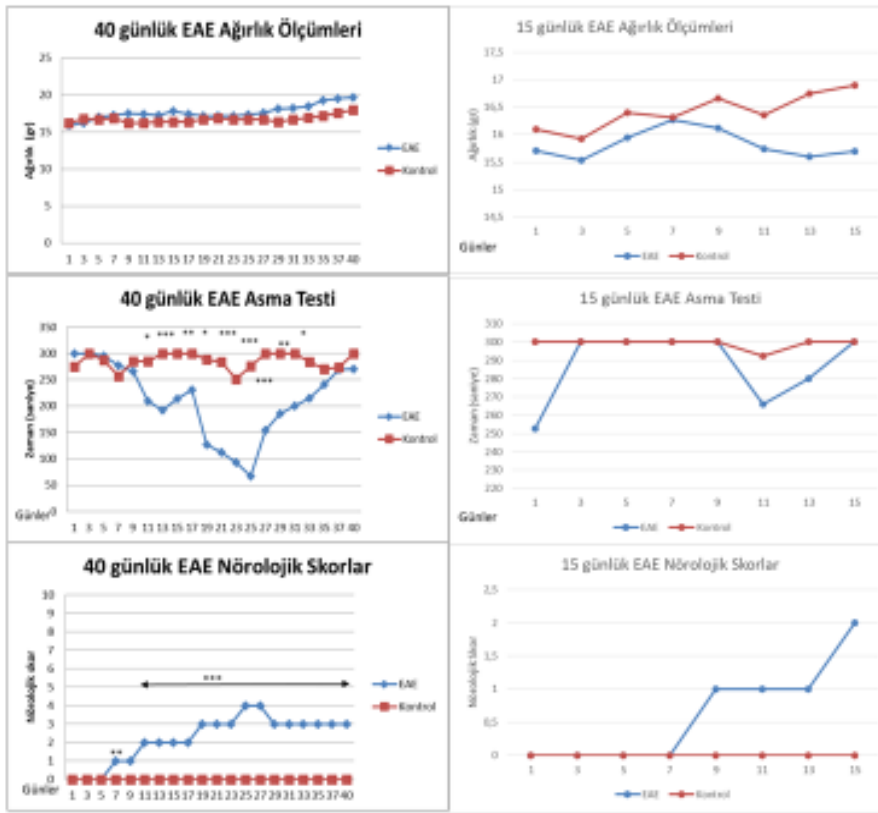
EAE deneyleri sonucunda elde edilen klinik skorlar Mann-Whitney U testi ile, diğer tüm parametrik değerler Student t-testi ile karşılaştırılmıştır. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. EAE Klinik Bulgular

40 ve 15 günlük EAE modeli ve kontrol gruplarının immünizasyondan sonraki günlere bağlı ağırlık, asma testi ve EAE klinik skorları Şekil 4-1 de verilmiştir.

40 günlük EAE insidansı %83,3 (5/6), 15 günlük EAE insidansı %50 (3/6) dır.



Şekil 4-1. EAE modeli farelerin kontrollerine göre klinik bulgularının karşılaştırılması.

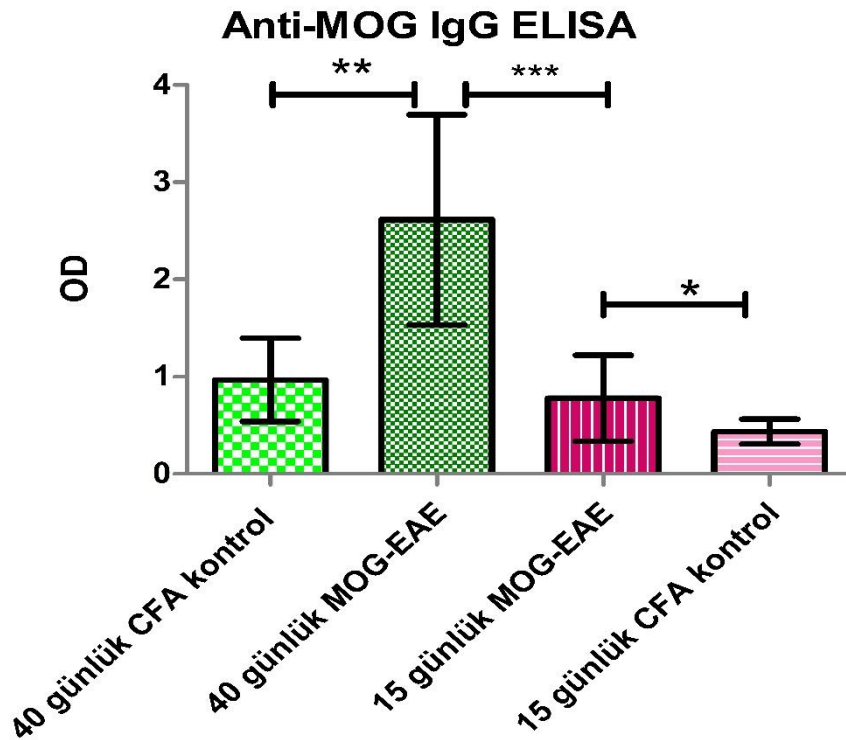
Hem 40 günlük hem de 15 günlük EAE modellerinde kontrol gruplarına göre ağırlık bakımından istatistiksel anlamlılığa ulaşmış bir fark görülemedi.

Deney hayvanlarının EAE'ye bağlı motor hareket durumlarını ölçen asma testine dayanma sürelerine bakıldığında, 40 günlük deney grubunda kontrol grubuna göre 11. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Bu anlamlı fark 27. günden itibaren azalmış ($p < 0,05$), 30. günden sonra istatistiksel anlamlılık kaybolmuştur.

Deney hayvanlarının nörolojik skorları, 40 günlük EAE modelinde 7. Günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken (7 ve 9. Günler $p<0,01$; 11. Günden itibaren $p<0,001$); 15 günlük modelde ilk klinik bulgular 9. Günden itibaren başlamış olmakla birlikte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır.

4.2. Serum anti-MOG düzeyleri

Hem 40 günlük EAE modelinde, hem de 15 günlük EAE modelinde kontrollerine göre serum anti-MOG antikor düzeylerinden anlamlı artış görülmüştür (40 günlük EAE- 40 günlük CFA kontrol $p=0,0188$; 15 günlük EAE- 15 günlük CFA kontrol $p=0,0092$) (Şekil 4-2).

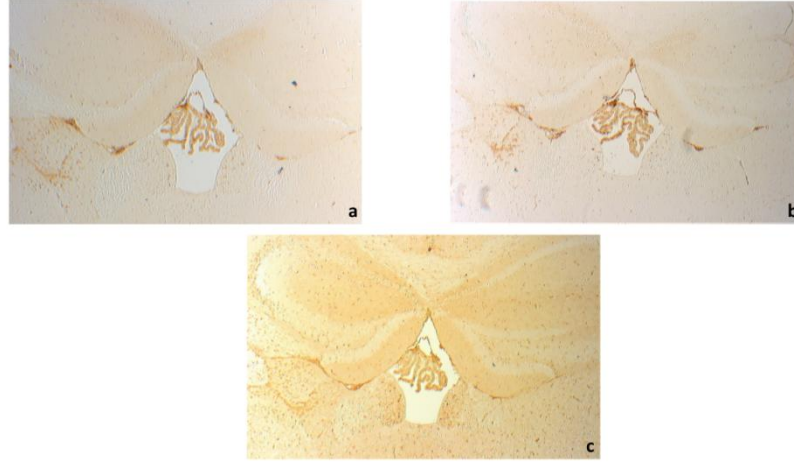


Şekil 4-2. Anti-MOG antikor düzeylerinin ELISA ile değerlendirilmesi.

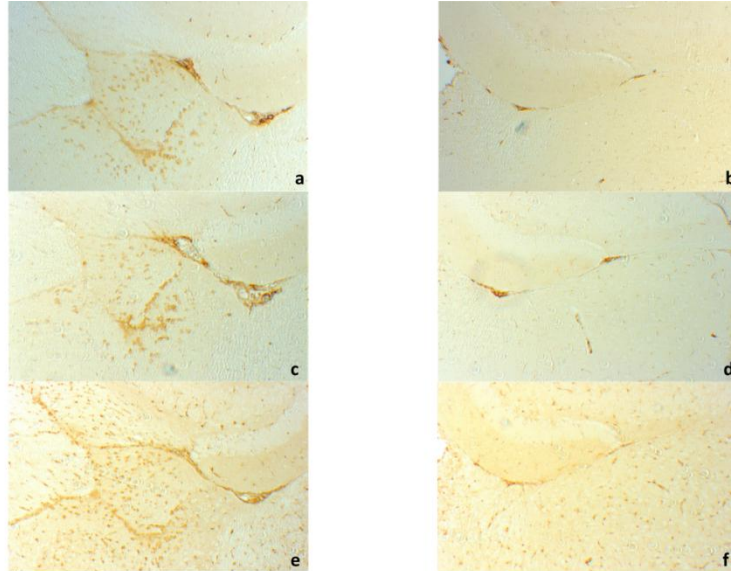
4.3. İmmunohistokimya görüntüleri

15 ve 40 günlük EAE farelerinde, MS hastalarına benzer şekilde, perivasküler alan ve etrafında $CD8^+$ T hücre ve makrofaj bakımından zengin lezyon alanları tespit

edilmiştir. Temsili olarak 15 günlük EAE grubu faresinin MS lezyon alanındaki CD8⁺, makrofaj işaretleyicisi F4/80 ve perisit işaretleyici PDGFR β görüntüleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 teki gibidir.



Şekil 4-3. 15 günlük EAE modelinde lezyonun ışık mikroskobu 5x büyütme görüntüsü. a. CD8, b. F4/80 ve c. PDGFR beta boyanması.



Şekil 4-4. 15 günlük EAE modeli ışık mikroskobu görüntüsünde lezyon ve kontralateralindeki lezyon olmayan bölgenin 20x büyütmede karşılaştırılması. a. EAE CD8

boyanması, b. CFA kontrol CD8 boyanması, c. EAE F4/80 boyanması, d.CFA kontrol F4/80 boyanması, e. EAE PDGRF beta boyanması, f. CFA kontrol boyanması.

4.4. Annexin V/PI

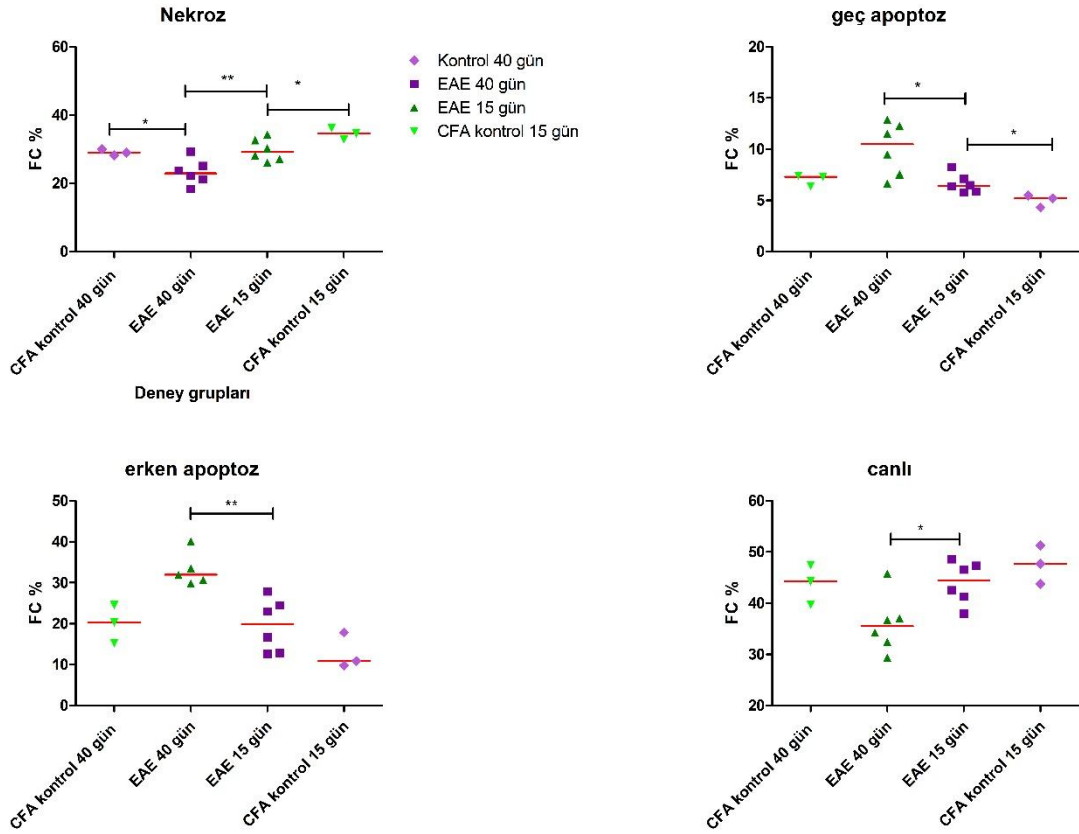
HBVP hücrelerinin; EAE modeli deney hayvanlarının serumuna maruz kalmalarına bağlı olarak nekroz, geç apoptoz, erken apoptoz ve canlılık akım sitometri yüzdeleri Şekil 4-5'te gösterilmiştir.

Bu deneyin sonuçlarına göre ilginç olarak nekroz yüzdesi 15 günlük EAE fareleri ve kontrolünde 40 günlük EAE ve kontrolüne göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (40 günlük ile anlamlılık $p=0,0362$) ; 15 günlük kontrolü ile anlamlılık $p=0,0491$). 40 günlük EAE grubu 15 günlük EAE grubuna göre anlamlı derecede düşük nekroz yüzdesi göstermiştir ($p=0,0094$).

Geç apoptozda, 40 günlük EAE deney grubukendi kontrolüne göre yüksek yüzdeye sahip olmakla birlikte; aradaki fark istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. 15 günlük EAE deney grubu kendi kontrolüne göre anlamlı derece yüksek yüzdeye sahiptir ($p=0,0297$). 40 günlük EAE ile 15 günlük EAE deney grupları karşılaştırıldığında ise 40 günlük grup 15 günlük gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek geç apoptoz oranı göstermektedir ($p=0,0122$).

Erken apoptoza bakıldığında geç apoptozdaki gruplar arasındaki eğilim değişmemekle birlikte, 15 günlük EAE grubu ve kontrolü arasındaki istatistiksel anlamlılık kaybolmuştur.

Grupların canlı hücre yüzdeleri bakımından 40 günlük kontrol grupları, deney gruplarına göre daha fazla canlı hücreye sahiptir; fakat bu eğilim istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. İlginç olarak 15 günlük EAE deney grubu kendi kontrol grubuna çok yakın canlı hücre yüzdesine sahiptir. 40 günlük EAE deney grubu ile 15 günlük EAE deney grubu karşılaştırıldığında ise 15 günlük grubun 40 günlük gruba göre anlamlı derecede yüksek canlı hücre yüzdesine sahip olduğu görülmüştür ($p=0,0175$).

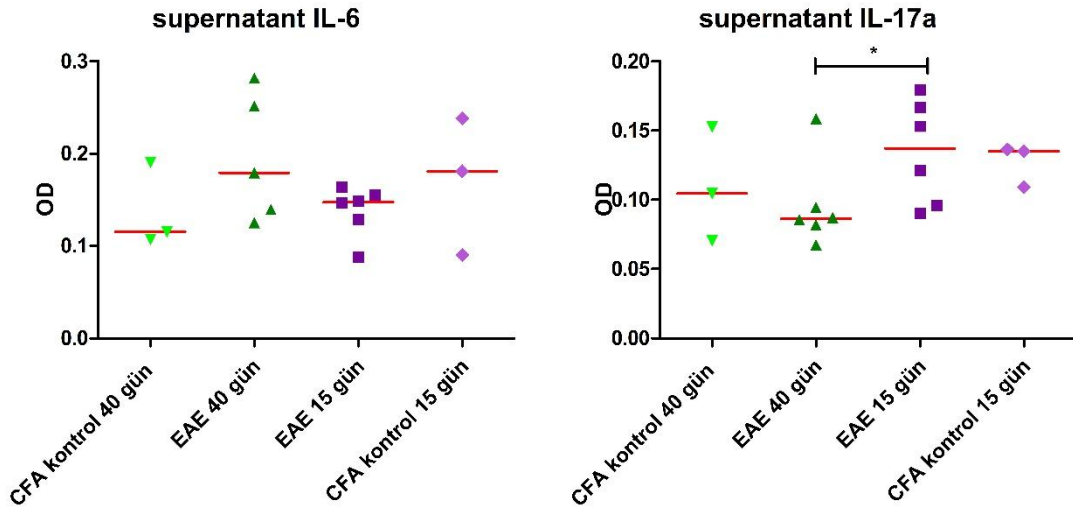


Şekil 4-5. EAE fare serumu ile muamele edilmiş HBVP hücrelerinin Annexin V/PI boyanma yüzdeleri.

4.5. Perisit Hücre Kültürü Supernatant IL-6 ve IL-17a Düzeyleri

40 ve 15 günlük EAE deney ve kontrol gruplarının serumlarıyla 24 saat muamele edilmiş HVPC hücre hattının 24 saat sonunda toplanan supernatantlarındaki IL6 ve IL17a düzeylerine bakıldığında IL-6 bakımından ise sadece 15 günlük EAE’de 40 günlük EAE grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,0462$)

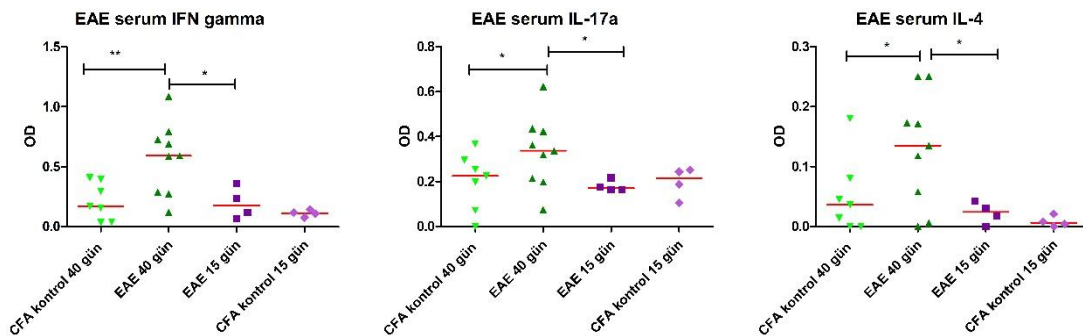
IL-17a düzeyi ise sadece 15 günlük EAE’de 40 günlük EAE grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,0424$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6. EAE fare serumu ile muamele edilmiş HVPC hücre supernatantlarında IL-6 ve IL-17A düzeyleri.

4.6. EAE Fare Serum IFN γ , IL-17a ve IL-4 düzeyleri

EAE deney grupları ve kontrol gruplarının serum IFN γ , IL-17a ve IL-4 seviyelerine bakıldığında, 40 günlük EAE deney grubunun hem kendi kontrol grubundan hem de 15 günlük EAE deney grubundan anlamlı derecede yüksek sitokin seviyelerine sahip olduğu görülmektedir (IFN gamma 40 günlük EAE - CFA kontrol grubu ile anlamlılık $p=0,0063$; 40 günlük EAE - 15 günlük EAE modeli ile anlamlılık $p=0,0189$) (IL-17a 40 günlük EAE - CFA kontrol grubu ile anlamlılık $p=0,0493$; 40 günlük EAE - 15 günlük EAE modeli ile anlamlılık $p=0,0454$) (IL-4 40 günlük EAE - CFA kontrol grubu ile anlamlılık $p=0,0369$; 40 günlük EAE - 15 günlük EAE modeli ile anlamlılık $p=0,0248$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-7. EAE serum IFN gamma, IL-17a ve IL-4 düzeyleri.



5. TARTIŞMA

Bu çalışmadaki amacımız; perisitlerin sağkalımı veya işlevsel değişikliğinin (inflamatuvar karakter kazanması) MS patogeneğine etkisi var mıdır ve bu etki MS'in zamansal olarak hangi dönemini/dönemlerini etkilemektedir sorularına yanıt aramaktır. Bu amaçla klasik bir MS modeli olan MOG antijeni immünizasyonuyla oluşturulan EAE hayvan modelini oluşturduk. Zamansal etkiyi gözlemlemek için EAE modelinde erken (15 gün) ve geç (40 gün) dönem grupları oluşturularak bu dönemlere ait fare serumlarının perisitte ne gibi değişikliklere neden olduğunu araştırdık.

İlk olarak EAE modelinin verifikasyonu amacıyla klinik değerlendirme, serum antikor ölçümü ve beyinde lezyon incelenmesi yapıldı. CFA ile immünize edilen kontrollerden farklı olarak MOG ile immünize edilen farelerde zaaf gösterildi. Serum anti-MOG antikor düzeylerinde anlamlı derecede artış gösterildi. MSS'inde demiyelinizan karakterde ve T hücre ve makrofaj bakımından zengin lezyon alanları tespit edildi. Böylece EAE modelinin başarıyla oluşturulduğu kabul edildi (Lassmann ve Bradl, 2017).

Literatürde belirtildiği gibi, 15 günlük EAE modelinde az sayıda hayvanda ve düşük düzeyde klinik bulgu saptandı. 40 günlük dönemde ise çok sayıda hayvanda 25 günde klinik zaaf maksimum düzeydeydi. 25 günden itibaren klinik bulgu şiddeti azalmakla birlikte devam etti. Böylece daha hafif (15 gün) ve daha ağır (40 gün) EAE klinik özelliklerine sahip iki hayvan grubu elde edilmiş oldu (Kuerten ve Angelov, 2007).

Verifikasyona yönelik olarak yapılan ELISA testinde anti-MOG antikor düzeyi MOG ile immünize fare gruplarında kendi kontrol gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur. Zamansal olarak EAE modeli değerlendirildiğinde, 40 günlük EAE grubunda 15 günlük gruba göre daha yüksek miktarda antikor titresi elde edilmiştir.

Luxol fast boyamasında ve inflamatuvar faktörlerin işaretlendiği immünohistokimya boyamalarında hem 15 hem de 40 günlük EAE gruplarında demiyelinizan ve T lenfosit ve makrofaj bakımından zengin lezyonlar saptandı. İlginç olarak, IHC boyamasında hücrel infiltrasyonun yoğun olduğu beyin parankimal bölgelerde perisit yoğunluğunun da yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulgu, perisitlerin

endotel cidarından ayrılarak demiyelinizan inflamatuvar lezyon bölgesine göç etmesi ile açıklanabileceği düşünüldü (Iacobaeus ve ark., 2017). Bu durum daha önce post-mortem MS hastaları beyinde gösterilmiş olması, bu mekanizma ile ilgili verilerimizin gücünü arttırmaktadır.

Bu aşamada EAE oluşturulmuş farelerin serumlarının perisit sağkalımı üzerine etkilerinin araştırılması planlandı. Bu amaçla EAE ve kontrol farelerinin serumları insan beyin vasküler perisit hücre hattı ile 24 saat inkübe edildi (Ampofo ve ark., 2019). Hem 15 gün hem de 40 günlük EAE serumlarının perisitlerde erken ve geç apoptozdaki hücre yüzdesinde kontrole göre yüksek olma eğilimi saptandı. Özellikle 40 günlük EAE serumları ile inkübe edilen perisitlerde 15 günlüklere göre erken ve geç apoptoz yüzdesi anlamlı derecede yüksekken, canlı hücre oranı anlamlı düzeyde düşüktü. Bu bulgular EAE oluşturulmuş fare serumlarında apoptoz indükleyici faktörlerin varlığına işaret etti. Bu sonucun özellikle klinik tablosu daha ağır olan 40 günlük EAE grubunda elde edilmesi dikkat çekicidir. Çalışmamız EAE’de perisitlerin apoptoza uğradığını ilk defa göstermiştir. Bu durumun KBB’nin bütünlüğünü olumsuz yönde etkileyerek daha fazla inflamasyon ve demiyelinizasyona neden olması ve böylece EAE klinik gidişatını olumsuz etkilemesi mümkündür (Balabanov ve Dore-Duffy, 1998).

Sonraki aşamada perisitlerin EAE gelişimi esnasında inflamasyona katkısı araştırıldı. EAE ve kontrol fare serumları ile yapılan inkübasyon sonrasında elde edilen hücre üst sıvılarında MS patogenezi ile ilişkili olduğu bilinen iki sitokin (IL-6 ve IL-17a) düzeyi ölçüldü. IL-17a düzeyinde 15 günlük EAE grubunda 40 günlük gruba göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. IL-6 düzeyinden 40 günlük EAE grubunda diğer gruplara göre artma eğilimi saptanmıştır. Bu bulgular EAE gelişimi sırasında periferik dolaşımda artan inflamatuvar faktörlerin perisitleri bir yandan öldürürken, diğer yandan proinflamatuvar sitokin salgılayan inflamatuvar bir fenotipe dönüştürdüğü düşünüldü (Kovac ve ark.,2011; Matsumoto ve ark.,2014). EAE serumları ile karşılaşan perisitlerin IL-6 üreterek mikrogliaı aktive etmeleri ve böylece EAE beyindeki inflamasyonu arttırması mümkündür (Kovac ve ark.,2011). Bu savın desteklenmesi için insan yerine fare perisitlerinin kullanılması, EAE fare beyinlerindeki perisitlerin izole edilip sağkalım, apoptoz ve sitokin parametrelerine bakılması ve perisit migrasyonunda etkili olabilecek faktörlerin incelenmesi gereklidir.

Son aşamada perisit sağkalımı ve sitokin üretimini etkileyebilecek serumdaki olası faktörler araştırıldı. Özellikle MS patogenezinde önemli rol oynayan IFN γ , IL-17a ve anti-inflamatuvar etkili IL-4 araştırıldı. 15 günlük EAE grubunda bu sitokinlerin serum düzeyinde artış saptanmazken, 40 günlük EAE grubunda anlamlı artış saptanmıştır. Anti-inflamatuvar hücreler tarafından salınan IL-4'ün 40 günlük EAE grubundaki anlamlı yükselişinin inflamasyon regülasyonu amacıyla olduğu düşünüldü. EAE patogenezinde önemli rolleri olan IFN γ ve IL-17a sitokinlerinin yüksek düzeyde olması beklenen bir bulguydu (Rustenhoven ve ark.,2016). Özellikle apoptoza etkisi bilinen IFN γ 'nın 40 günlük grupta anlamlı derecede yüksek çıkması ve aynı grubun serumları ile inkübe edilen perisit hücre hattında daha fazla apoptoz görülmesi dikkat çekicidir. Ancak sitokin düzeylerinin anlamlı derecede yükselmediği 15. günde de EAE farelerinin beyin lezyonlarında perisitlerin etkilendiğinin gösterilmesi, dolaşımdaki apoptotik sitokinlerin perisitler üzerine etkilerinin EAE'nin erken döneminde sınırlı olduğunu ve muhtemelen lezyon oluşumunu ilk tetikleyen faktör olmadığını düşündürmüştür.

Sonuç olarak, EAE'nin daha ağır olduğu ve serum sitokin ve anti-MOG antikor düzeyinin daha yüksek olduğu 40 günlük EAE grubundan elde edilen serumların perisit canlılığını azalttığı ve perisitlerin lezyonların parankimal alanlarına göç ettiği gösterildi. Bu bulgular, EAE gelişimi sırasında perisitlerin olumsuz etkilendiği ve buna bağlı olarak KBB bütünlüğünün bozulduğu ve inflamatuvar lezyon gelişiminin arttığı düşünüldü (Rivera ve ark.,2019). Sonuçlarımızın geçerliliğinin artması için, EAE farelerinin beyinlerinden izole edilecek perisitlerde ve MS hasta beyin lezyonlarında ve serumlarında ilgili parametrelerin araştırılması gereklidir.



KAYNAKLAR

- Aboul-Enein, F.; Bauer, J.; Klein, M. ve ark. (2004). Selective and antigen-dependent effects of myelin degeneration on central nervous system inflammation. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 63. 1284-1296.
- Adler, L. N. Ve ark. (2017). The other function: class II-Restricted Antigen Presentation by B cells. *Front. Immunol.* 8, 319.
- Agrawal S, Anderson P, Durbreej M ve ark. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 203:1007–19.
- Almerighi, C.; Sinistro, A.; Cavazza, A.; Ciaprin, C.; Rocchi, G.; Bergamini, A.(2009). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine.* 45, 190–197.
- Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. (2011). Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1812:252–64.
- Ampofo, E., Berg, J.J., Menger, M.D. ve Lasche, M.W. (2019). Maslinic acid alleviates ischemia/reperfusion-induced inflammation by downregulation of NF κ B-mediated adhesion molecule expression. *Sci. Rep.* 9 (1): 6119
- Angelini, D.F., Serafini, B., Piras, E., Severa, M., Coccia, E.M., Rosicarelli, B., et al. (2013). Increased CD8⁺ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathog.* 9 (4), e1003220.
- Armulik A, Genov  G, M e M, ve ark.(2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468:557–61.
- Azevedo, P.O., Sena, I.F.G., Andreotti, J.P., Carvalho-Tavares, J., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M. ve ark. (2018) Pericytes modulate myelination in the central nervous system. *J Cell Physiol.* 233 (8): 5523-5529.
- Baas, D.; Prufer, K.; Ittel, M.E.; Kuchler-Bopp, S.; Labourdette, G.; Sarlieve, L.L.; Brachet, P. (2000). Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Glia.* 31, 59–68.
- Balabanov, R. ve Dore-Duffy, P. (1998). Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J. Neurosci. Res.* 53, 637–644.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M.(2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16:1–13.

- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A. ve Kuchroo, V.K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* 197.1073–1081.
- Bhalla, A.K.; Amento, E.P.; Clemens, T.L.; Holick, M.F.; Krane, S.M. (1983). Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: Presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57, 1308–1310
- Bielekova, B. Ve ark. (2006). Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/alpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 5941–5946.
- Bitsch A. ve ark. (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain.* 123. 1174-1183.
- Bittner, S., Afzali, A.M. ve Mauth, S.G. (2014). Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Journal of Visualized Experiments.* 86. 51275.
- Blakemore, W.F. ve Franklin, R.J. (2008). Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 318, 193–212.
- Boz, C. (2013). Multipl skleroz: Tanı Kriterleri. İçinde R. Karabudak ve D. Güç (Ed.). *Temel ve Klinik Nöroimmünoloji*. Ada yayınları. 259-264.
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V. ve ark. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequality. *Neurology*, 11, 1022-1024.
- Casiraghi C, Dorovini-Zis K, Horwitz MS. (2011). Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 230:173–7.
- Charcot J. (1868). *Histologie de la sclérose en plaques*. *Gaz Hop Civils et Militaires.* 140.554–5.
- Charcot, J.M. (1889) [1878]. *Clinical lectures on diseases of the nervous system [Leçons sur les maladies du système nerveux]* 3 Thomas Savill (translator Ed.) London: The New Sydenham Society. Retrieved 21 Ekim 2010.
- Chaudhuri, A. (2013). Multiple sclerosis is a primarily a neurodegenerative disease. *Journal of Neural Transmission.* 120:10. 1453-1466.

- Chen, S.; Sims, G.P.; Chen, X.X.; Gu, Y.Y.; Chen, S.; Lipsky, P.E. (2007). Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J. Immunol.* 179, 1634–1647.
- Compston A, Confavreux C, Lassmann ve ark. (2006). *McAlpine's Multiple Sclerosis*, 4th edn. Churchill Livingstone, London.
- Chu, C.Q. et al. (2000) Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon γ -deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 192, 123–128
- Davies AL, Desai RA, Bloomfield PS ve ark. (2013). Neurological deficits caused by tissue hypoxia in neuroinflammatory disease. *Ann Neurol.* 74:815–25
- DeLuca, H.F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1689S–1696S.
- D'haeseleer M, Cambron M, Vanopdenbosch L, ve ark. (2011). Vascular aspects of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 10:657–66.
- Domev, H. ve ark. (2014). Immuno-evasive pericytes from human pluripotent stem cells preferentially modulate induction of allogeneic regulatory T cells. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 1169–1181
- Dunmire, S.K., Hogquist, K.A., Balfour, H.H. (2015). Infectious mononucleosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 390, 211–240.
- Dobson, R. ve Giovannoni, G. (2018). Multiple sclerosis-a review. *European Journal of Neurology.* 26: 27-40.
- Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ ve ark.(1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* 377: 150–151.
- Elkins, J. ve ark. (2015). CD56(bright) natural killer cells and response to daclizumab HYP in relapsing-remitting MS. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2, e65.
- Enkhjargal B, McBride DW, Manaenko A, ve ark. (2017). Intranasal administration of vitamin D attenuates blood-brain barrier disruption through endogenous upregulation of osteopontin and activation of CD44/P-gp glycosylation signaling after subarachnoid hemorrhage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 37:16671147.
- Freund, J. ve McDermott, K. (1942). Sensitisation to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 49, 548–553.
- Friese MA, Fugger L. 2009. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 66:132–41.

- Geraldes R, Esiri MM, DeLuca GC ve ark. (2017). Age-related small vessel disease: a potential contributor to neurodegeneration in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 27:707–22.
- Gillie O (2006). A new government policy is needed for sunlight and vitamin D. *Br J Dermatol.* 154: 1052–1061.
- Gontika, M.P. ve Anagnostouli, M.C. (2018). Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein and human leukocyte antigens as markers in pediatric and adolescent multiple sclerosis: on diagnosis, clinical phenotypes, and therapeutic responses. *Multiple Sclerosis International*, 2018.
- Goodin, D.S. (2014). The epidemiology of multiple sclerosis: insights to diseases pathogenesis. İçinde D.S. Goodin (Ed.), *The Handbook of Clinical Neurology*; 122, 231-266.
- Goodin, D.S. (2016). The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. . İçinde C. Rosano, M.A. Ikram, M. Ganguli, (Ed.), *The Handbook of Clinical Neurology*; 138, 173-206.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 393–407
- Greenfield, J.G. ve ark. (2008). *Greenfield's neuropathology.* 8. London. Hodder Arnold.
- Guijarro-Munoz, I. ve ark. (2014) Lipopolysaccharide activates TLR4-mediated NF-kB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *J. Biol. Chem.* 289, 2457–2468
- Haines JL, Terwedow HA, Burgess K ve ark. (1998). Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *The Multiple Sclerosis Genetics Group. Hum Mol Genet.* 7: 1229–34.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B ve ark. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 508:55–60.
- Handel, A., Giovannoni, G., Ebers, G., Ramagopalan, S. (2010). Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 156–166.
- Harrison DM, Roy S, Oh J, et al. Association of cortical lesion burden on 7-T magnetic resonance imaging with cognition and disability in multiple sclerosis. *JAMA Neurol* 2015;72:1004–12.

- Heigl, F. ve ark. (2013) Immunoabsorption in steroid-refractory multiple sclerosis: clinical experience in 60 patients. *Atheroscler. Suppl.* 14. 167–173.
- Hemmer, B.; Kerschensteiner, M.; Korn, T. (2015). Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.*14. 406-419.
- Hewison, M. (2012). Vitamin D and immune function: Autocrine, paracrine or endocrine? *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 243, 92–102.
- Huan, J.; Culbertson, N.; Spencer, L. ve ark. (2005). Decreased Foxp3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neuroscience Research.*81. 45-52.
- Iacobaeus, E., Sugars, R.V., Törngvist Andren, A., Alm, J.J., Quian, H., Frantzen, J. ve ark. (2017). Dynamic changes in Brain mesenchymal perivascular cells associated with multiple sclerosis disease duration, active inflammation, and demyelination. *Stem Cells Transl Med.* 6(10): 1840-1851.
- İduman, E. (2013). Multipl skleroz: Klinik özellikler ve seyir. İçinde R. Karabudak ve D. Güç (Ed.). *Temel ve Klinik Nöroimmünoloji*. Ada yayınları.191-203.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, ve ark. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 357: 851–62.
- Jeffery, L.E.; Burke, F.; Mura, M.; Zheng, Y.; Qureshi, O.S.; Hewison, M.;Walker, L.S.; Lammas, D.A.; Raza, K.; Sansom, D.M. (2009). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J. Immunol.* 183, 5458–5467.
- Jurewicz,A.; Biddison, W.E.; Antel, J.P. (1998). MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8+ T lymphocytes. *Journal of Immunology.*160. 3056-3059.
- Kantarci, O.H.; Lebrun, C.; Siva, A.;Keegan, M.B.; Azevedo, C.J.; Inglese, M. ve ark. (2016). Primary progressive multiple sclerosis evolving from radiologically isolated syndrome. *Ann. Neurol.* 79, 288-294.
- Kawachi, I. ve Lassmann, H. (2017). Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromiyelitis optica. *J. Neurol Neurosurge Psychiatry.* 88. 137-145.
- Keegan, M. ve ark.(2005). Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 366. 579–582.

- Kılıç, A.K., Esendağlı, G., Sayat, G., Talim, B., Karabudak, R., Tuncer-Kurte, A. (2015). Promotion of experimental autoimmune encephalomyelitis upon neutrophil granulocytes' stimulation with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) peptide. *Autoimmunity*. 48:6, 423-428.
- Koch MW, Ilnytsky Y, Golubov A, Metz LM, Yong VW, Kovalchuk O. (2018). Global transcriptome profiling of mild relapsing–remitting versus primary progressive multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 25: 651–658.
- Kornek, B.; Lassmann H. (1999). Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol* 9:651–6.
- Kovac, A. ve ark. (2011) Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation* 8, 139
- Kuerten, S. ve Angelov, D.N. (2007). Comparing the CNS morphology and immunobiology of different EAE models in C57BL/6 mice- a step towards understanding the complexity of multiple sclerosis. *Annals of Anatomy*. 190. 1-15.
- Kuo, Y.T.; Kuo, C.H.; Lam, K.P.; Chu, Y.T.; Wang, W.L.; Huang, C.H.; Hung, C.H. (2010). Effects of vitamin D3 on expression of tumor necrosis factor-alpha and chemokines by monocytes. *J. Food Sci.* 75, H200–H204
- Langub, M.C.; Herman, J.P.; Malluche, H.H.; Koszewski, N.J. (2001). Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. *Neuroscience*. 104, 49–56.
- Lassmann, H., Brück, W. ve Lucchinetti, C.F. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 7. 115-121.
- Lassmann, H. ve Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 133. 223-244.
- Laurence, M. ve Benito-Leon, J. (2017). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: Updating Pender's hypothesis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 16, 8–14
- Levin, L.I., Munger, K.L., O'Reilly, E.J., Falk, K.I., Ascherio, A. (2010). Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann. Neurol*. 67 (6), 824–830.
- Lindsey, J.W., Hatfield, L.M. (2010). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: cellular immune response and cross-reactivity. *J. Neuroimmunol*. 229 (1–2), 238–242.

- Lucchinetti, C.F.; Bruck, W., Rodriguez, M. ve ark. (1996). Distinct patterns of multiple sclerosis. Pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol.* 6. 259-274.
- Lucchinetti, C.F.; Brück, W.; Parisi, J. ve ark. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for pathogenesis demyelination. *Ann Neurology.* 47. 707-717.
- Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2011;365:2188–97
- Luzuriaga, K. ve Sullivan, J.L., (2010). Infectious mononucleosis. *New Engl. J. Med.* 362 (21), 1993–2000.
- Mahon, B.D.; Gordon, S.A.; Cruz, J.; Cosman, F.; Cantorna, M.T. (2003). Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J. Neuroimmunol.* 134, 128–132.
- Maier, C.L. ve Pober, J.S. (2011). Human placental pericytes poorly stimulate and actively regulate allogeneic CD4 T cell responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 183–189
- Matsumoto, J. ve ark. (2014) Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci. Lett.* 578, 133–138
- McLeod, J., Hammond, S., Kurtzke, J. (2011). Migration and multiple sclerosis in immigrants to Australia from United Kingdom and Ireland: a reassessment. I. Risk of MS by age at immigration. *J. Neurol.* 258, 1140–1149.
- Michel, L. ve ark. (2015) B cells in the multiple sclerosis central nervous system: trafficking and contribution to CNS-compartmentalized inflammation. *Front. Immunol.* 6, 636.
- Miller, D.; Barkoff, F.; Montalban, X.; Thompson, A. (2005a). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis Part 1: Natural history, pathogenesis, diagnosis and prognosis. *Lancet Neurology.* 4 (5), 281-288.
- Miller, D.; Barkoff, F.; Thompson, A; Fillippi, M. (2005b). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis Part 2: Non conventional MRI, recovery processes and management. *Lancet Neurology.* 4 (6), 341-348.
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, ve ark. (2017). Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 376: 209–20.

- Munger, K.L.; Levin, L.I.; Hollis, B.W.; Howard, N.S.; Ascherio, A.(2006). Serum 25-hydroxyvitamin levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 296, 2832–2838.
- Munoz, J.J.,Bernard,C.C. ve Mackay,I.R. (1984).Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen.*Cell.Immunol*.83, 92–100.
- Muris, A.H., Smolders, J., Rolf, L., Klinkenberg, L.J., van der Linden, N., Meex, S. ve ark., (2016). Vitamin D status does not affect disability progression of patients with multiple sclerosis over three year follow-Up. *PLoS One* 11, e0156122.
- Naik P, Cucullo L. (2015).Pathobiology of tobacco smoking and neurovascular disorders: untied strings and alternative products. *Fluids Barriers CNS*. 12:25.
- Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K ve ark. (2005). Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol* 162: 774–778.
- Nielsen, T.R., Rostgaard, K., Nielsen, N.M., Koch-Henriksen, N., Haahr, S., Sorensen, P.S., ve ark. (2007). Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch. Neurol*. 64 (1), 72–75.
- Nieves, J.; Cosman, F.; Herbert, J.; Shen, V.; Lindsay, R. (1994). High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology*. 44, 1687–1692.
- Okuda, D.T.; Mowry, E.M.; Beheshtion, A.; Waunat, E. ve ark. (2009). Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis. *Neurology*. 72: 780-81.
- Oztop-Cakmak, O., Solaroglu, I. ve Gursoy-Ozdemir, Y. (2017). The role of pericytes in neurovascular unit: emphasis on stroke. *Curr Drug Targets*. 18 (12). 1386-1391.
- Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ ve ark. (2013). Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet*. 9: e1003926.
- Peferoen, L.A., Lamers, F., Lodder, L.N., Gerritsen, W.H., Huitinga, I., Melief, J., et al. (2010). Epstein Barr virus is not a characteristic feature in the central nervous system in established multiple sclerosis. *Brain: J. Neurol*. 133 (Pt 5), e137.
- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Lenarczyk, A., Pfluger, C.M., Burrows, S.R.(2009). Decreased T cell reactivity to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 80 (5), 498–505.
- Pihl-Jensen G, Tsakiri A, Frederiksen JL. (2015). Statin treatment in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *CNS Drugs*. 29:277–91.

- Piccio, L. ve ark. (2010). Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 67. 707–714.
- Pieper, C. ve ark. (2013) Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood–brain barrier. *Brain Res.* 1524, 1–11.
- Pieper, C. ve ark. (2014). Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro. *Brain Res.* 1550, 1–8
- Pierrot-Deseilligny, C., Rivaud-Péchoux, S., Clerson, P., de Paz, R., Souberbielle, J.C., (2012). Relationship between 25-OH-D serum level and relapse rate in multiple sclerosis patients before and after vitamin D supplementation. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 5, 187–198.
- Pierrot-Deseilligny, C. ve Souberbielle, J.C. (2017). Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 14, 35–45.
- Popescu, B.F. ve Lucchinetti, C.F. (2012). Pathology of demyelinating diseases. *Annual Reviews of Pathology Mechanisms of Disease.* 7. 185–217.
- Procaccini, C., de Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L. ve Matarese, G. (2015). Animal models of multiple sclerosis. *European Journal of Pharmacology.* 759. 182–191.
- Putzki, N., Baranwal, M. K., Tettenborn, B., Limmroth, V. & Kreuzfelder, E. (2010). Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *Eur. Neurol.* 63, 311–317.
- Rigby, W.F.; Waugh, M.; Graziano, R.F. (1990). Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood.* 76, 189–197.
- Ristori G, Cannoni S, Stazi MA ve ark. (2006). Multiple sclerosis in twins from continental Italy and Sardinia: a nationwide study. *Ann Neurol* 59: 27–34.
- Rivera, F.J., Hinrichsen, B. ve Silva, M.E. (2019). Pericytes in Multiple Sclerosis. A. Birbrair (ed.), *Pericyte Biology in Disease.* 167–187.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., Berry, G.P. (1933). Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 58, 39–53.
- Rudick RA, Lee JC, Nakamura K, ve ark. (2009). Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J Neurol Sci.* 282:106–11.
- Rustenhoven, J. ve ark. (2016) TGF- β 1 regulates human brain pericyte inflammatory processes involved in neurovasculature function. *J. Neuroinflammation* 13, 1–15

- Ryu, J.K. ve ark. (2015). Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation. *Nat. Commun.* 6, 8164
- Saraste, M.; Irjala, H. ;Airas, L. (2007).Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol. Sci.* 28, 121–126.
- Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. (2014) Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* 13: 700–09.
- Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, Bongarzone ER, ve ark. (2008) P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation.*5(1):33.
- Silva, M.E., Lange, S., Hinrichsen, B., Philp, A.R., Reyes, A.C.,Halabi, D. ve ark. (2019). Pericytes favor oligodendrocyte fate choice in adult neural stem cells. *Front Cell Neurosci.* 13. 85.
- Simpson Jr., S., Blizzard, L., Otahal, P., Van der Mei, I., Taylor, B. (2011). Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 82, 1132–1141.
- Soilu-Hanninen, M.; Aivo, J.; Lindstrom, B.M.; Elovaara, I.; Sumelahti, M.L.; Farkkila, M.; Tienari, P.; Atula, S.; Sarasoja, T.; Herrala, L. ve ark., (2012).A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon beta-1b in patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 83, 565–571.
- Sotirchos, E.S.; Bhargava, P.; Eckstein, C.; Van Haren, K.; Baynes, M.; Ntranos, A.; Gocke, A.; Steinman, L.; Mowry, E.M.; Calabresi, P.A. (2016). Safety and immunologic effects of high- vs. low-dose cholecalciferol in multiple sclerosis. *Neurology.* 86, 382–390
- Spencer, J.; Bell, J.S. ve DeLuca, G. (2018). Vascular pathology in multiple sclerosis: reframing pathogenesis around the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 89:42-52
- Staun-Ram, E. ve Miller, A. (2017). Effector and regulatory B cells in multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* 184. 11–25.

- Sundqvist, E., Sundstrom, P., Linden, M., Hedstrom, A.K., Aloisi, F., Hillert, J., ve ark. (2012). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun.* 13 (1), 14–20.
- Sundstrom, P., Nystrom, M., Ruuth, K., Lundgren, E., (2009). Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 215 (1–2), 102–107.
- Tavera-Mendoza, L.E. ve White, J.H. (2007). Cell defenses and the sunshine vitamin. *Sci. Am.* 297, 62–65, 68–70,72.
- Thompson, A.J.; Baranzini, S.E.; Geurts, J.; Hemmer, B. Ve Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *Lancet.* 391, 1622-1636.
- Tompkins, S.M., Padilla, J., DalCanto, M.C., Ting, J.P., VanKaer, L. ve Miller, S.D. (2002). De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 168, 4173e83.
- Trapp, B.D. ve Nave, K.A. (2008). Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?. *Annual Review of Neuroscience.* 31. 347-269
- Tsau S, Emerson MR, Lynch SG ve ark. (2015). Aspirin and multiple sclerosis. *BMC Med.* 13:153.
- Tsunoda, I. ve Fujinami, R.S. (2010). Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virüs infection, an animal model for multiple sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5. 355–369.
- Tuohy, V.K., Lu, Z., Sobel, R.A., Laursen, R.A. ve Lees, M.B. (1989). Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipidprotein for SJL mice. *J. Immunol.* 142, 1523e7.
- Turan, Ö.F. (2013). Multipl skleroz: Klinik özellikler ve seyir. İçinde R. Karabudak ve D. Güç (Ed.). *Temel ve Klinik Nöroimmünoloji.* Ada yayınları. 223-228.
- Türk Börü, Ü.; Duman, A.; Kulualp, A.Ş.; Güler, N.; Taşdemir, M.; Yılmaz, Ü.; Alp, R.; Bölük, C. (2018). The comparison of 3 coastal cities located in the black sea and mediterranean regions of Turkey. *Medicine.* 97. 42.
- University of California, San Francisco MS-EPIC Team, Cree, B.A., Gourraud, P.A., Oksenberg, J.R., Bevan, C., Crabtree-Hartman, E. ve ark. (2016). Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann. Neurol.* 80, 499–510.

- Van der Mei, I.A.; Ponsonby, A.L.; Dwyer, T.; Blizzard, L.; Taylor, B.V.; Kilpatrick, T. Ve ark. (2007) Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *J. Neurol.* 254, 581–590.
- Veldman, C.M.; Cantorna, M.T.; DeLuca, H.F. (2000). Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 334–338.
- Venken, K.; Hellings, N.; Thewissen, M. ve ark. (2008). Compromised CD4+CD25 high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of Foxp3 positive cells and reduced Foxp3 expression at the single cell. *Immunology*.123. 79-89.
- Wacker, M., Holick, M.F. (2013). Sunlight and vitamin D: a global perspective for health. *Dermatoendocrinology*. 5, 51–108.
- Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ ve ark. (2003). Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12877–12882.
- Won S, Sayeed I, Peterson BL, ve ark. (2015). Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF-kB signaling pathways. *PLoS One* .10:e0122821
- Wu, G.F. ve Alvarez, E. (2011). The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurological Clinics*. 29. 257-278.
- Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature Medicine*. 15(9). 1031-1037.
- Zarrabeitia, M.T.; Riancho, J.A.; Amado, J.A.; Olmos, J.M.; Gonzalez-Macias, J. (1992). Effect of calcitriol on the secretion of prostaglandin E2, interleukin 1, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Bone*. 13, 185–189.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Erdem TÜZÜN
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü

Başvuru : 18.05.2017

Toplantı Tarihi : 10.07.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, Araş. Gör. Canan Aysel ULUSOY'ya ait "Multiple Skleroz Patofizyolojisinde Perisitlerin Rolü" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	72
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	15.08.2017/02.12.2018	

Prof. Dr. Alev AKSOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYER Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı I.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar-İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail: hadyek@istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MULTIPLE SKLEROZ PATOFİZYOLOJ İSİNDE PERİSİTLERİN ROLÜ

ORJİNALLİK RAPORU

% 2	% 1	% 0	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	<% 1
2	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	ÖZTÜRK, Serra, AYTAÇ, Güneş, KIZILAY, Ferah and SİNDEL, Muzaffer. "Multipl Skleroz", Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2017. Yayın	<% 1
6	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	epdf.tips	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Canan Aysel	Soyadı	Ulusoy
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	11.07.1987
Email	canan.ulusoy@istanbul.edu.tr	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Sinirbilim AD	2013
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	FMV Nişantaşı Işık Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Sinirbilim AD	2014-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	iyi	İyi	95	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	83,32	85,45	79,74
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Kinay D, Oliver KL, Tüzün E, Damiano JA, **Ulusoy C**, Andermann E, Hildebrand MS, Bahlo M, Berkovic SF. Evidence of linkage to chromosome 5p13.2-q11.1 in a

large inbred family with genetic generalized epilepsy. *Epilepsia*. 2018;59(8):e125-e129. **IF: 5,067**

2. Ayşit-Altuncu N, **Ulusoy C**, Öztürk G, Tüzün E. Effect of LGI1 antibody-positive IgG on hippocampal neuron survival: a preliminary study. *Neuroreport*. 2018;29(11):932-938. **IF: 1,266**

3. Orhun G, Esen F, Özcan PE, Sencer S, Bilgiç B, **Ulusoy C**, Noyan H, Küçükerden M, Ali A, Barburoğlu M, Tüzün E. Neuroimaging Findings in Sepsis-Induced Brain Dysfunction: Association with Clinical and Laboratory Findings. *Neurocritical Care*. 2018. doi: 10.1007/s12028-018-0581-1. **IF: 3,163**

4. Aktura ŞD, Yılmaz V, Özkan-Yaşargün D, **Ulusoy C**, Tüzün E, Türkoğlu R. Peripheral blood memory B cell frequency predicts conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2018;23:9-14. **IF: 3,199**

5. Aydın Ç, Çelik ŞY, İçöz S, **Ulusoy C**, Gündüz T, Demir GA, Kürtüncü M, Tüzün E. Prognostic Factors in Anti-Neuronal Antibody Positive Patients. *Archives of Neuropsychiatry*. 2018;55(2):189-194. **IF: 0,359**

6. Karaaslan, Z., Özçelik, P., Ulukan, C., **Ulusoy, C.**, Orhan, K. S., Kocasoy Orhan, E., Küçükali, C. İ., Tüzün, E., Baykan, B., Akdal, G. (2018, Haziran). Do the inflammatory factors contribute to the pathogenesis of vestibular migraine? 4th Congress of EAN, Lizbon, Portekiz. *European Journal of Neurology*, 25(2), 113.

7. Yavuz-Vanlı, E., Tüzün E., Sezgin M., **Ulusoy C.**, Küçükali C. İ., Bebek N., Sencer S., Baykan B. (2018, Ağustos). Is the frequency of neuronal autoantibodies higher in patients with bilateral hippocampal sclerosis compared to unilateral ones? 13th European Congress on Epileptology, Vienna, Austria. *Epilepsia*, 59 (S3), 230.

8. Timirci-Kahraman, Ö., Küçükali, C. İ., Tüzün, E., Ulusoy, C., Ergen, A. (2018, Mayıs). Parkinson Hastalığında Mikroarray Ekspresyon Verilerinin Biyoinformatik

Yöntemlerle İncelenmesi. Nörodejenerasyon / Nörorejenerasyon Çalıştayı, İstanbul, Türkiye.

9. Vanlı Yavuz E. N., Ulusoy C., Küçükali, C. İ., Bebek N., Tüzün E. Baykan B. (2018, Kasım-Aralık). Fokal Epilepsilerde İnflamasyonun Rolü. 54. Ulusal Nöroloji Kongresi, Antalya, Türkiye.

10. Şekerdağ E., Atak D., Yılmaz A. B., Ulusoy C., Zeybel M., Çakmak Öztıp Ö., Vural A., Küçükali, C. İ., Tüzün E., Gürsoy-Özdemir Y. (2018, Kasım-Aralık). Multiple Skleroz Patofizyolojisinde Perisitlerin Rolünün Deneysel Allerjik Ensefalomyelit Modelinde İncelenmesi. 54. Ulusal Nöroloji Kongresi, Antalya, Türkiye.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):