

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**NÖROAKTİF STEROİD HORMONLARIN
ERİŞKİN İNSAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
OLİGODENDROGLİAL FARKLILAŞMALARI
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Dr. Bedile İrem TİFTİKCİOĞLU

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2006

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**NÖROAKTİF STEROİD HORMONLARIN
ERİŞKİN İNSAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
OLİGODENDROGLİAL FARKLILAŞMALARI
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Dr. Bedile İrem TİFTİKCİOĞLU

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. Rana Karabudak

ANKARA
2006

TEŞEKKÜR

Eğitimimde ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde her aşamada desteğini gördüğüm, bilgisinden ve klinik deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Rana Karabudak'a,

Ayrıca anabilim dalımızda, başta Prof. Dr. Bülent Elibol olmak üzere eğitimime katkıda bulunmuş, yetişmemde büyük emeği olan tüm öğretim üyelerimize,

Laboratuvar aşamasında desteğini esirgemeyen, bilgisi ve tecrübesi ile beni yönlendiren Sayın Prof. Dr. Neil Scolding, Dr. Claire Rice ve tüm Bristol Üniversitesi, Klinik Nörobilim Enstitüsü, Glial Hücre Biyolojisi Laboratuvarı ekibine,

Yıllardır birlikte keyifle çalıştığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Varlıkları ve sonsuz destekleri ile her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Bedile İrem Tiftikcioğlu (ıkrıkçı)

ÖZET

Tiftikcioğlu Bİ. Nöroaktif Steroid Hormonların Erişkin İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Oligodendroglial Farklılaşmaları Üzerine Olan Etkileri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2006. Nöroaktif steroid hormonlar santral sinir sistemi içerisinde çok sayıda ve önemli etkilere sahiptir. Multipl skleroz(MS) hastalarında cinsiyet farkının klinik seyir ve tedaviye verilen yanıtı etkilediğine dair gözlemler olması, steroid hormonlarının MS patogenezindeki etkilerine dikkati çekmiştir. İnsan erişkin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri(MKH), MS dahil pek çok nörolojik hastalıkta kök hücre tedavisi için ümit vaat etmektedir. Bu çalışmada, nöroaktif steroidlerin *in vitro* ortamda MKHlerinin oligodendroglial farklılaşması üzerine olan etkileri incelenmiştir. MKHler üzerindeki steroid hormon reseptörlerinin varlığına immünohistokimyasal olarak bakılmıştır. Ardından hem erkek hem de kadın vericilerden elde edilen kemik iliği kaynaklı MKHler 17- β östradiol(E2), progesteron (PROG) veya dihidrotestosteron(DHT) ile 7 gün boyunca muamele edilmiş ve oligodendrosit öncül hücre belirleyicilerinin varlığı için incelenmiştir. Son olarak, özgül reseptör antagonistlerinin, hormonların yaptığı farklılaşma etkisi üzerine olan etkilerine bakılmıştır. İnsan MKHleri nöroaktif steroid reseptörlerini taşımakta ve ifade etmektedirler. Nöroaktif steroidler MKH vericisinin cinsiyetine bağlı olarak farklılaşma üzerine etki göstermektedir. Şöyle ki, DHT daha yüksek oranda erkek vericiden elde edilen kemik iliği kaynaklı MKHlerde A2B5 ekspresyonunu arttırırken, E2'nin daha yüksek oranda kadın vericiden elde edilen MKHlerde A2B5 ekspresyonunu arttırdığı izlenmiştir. E2 ve DHT en yüksek etkiyi 100nM konsantrasyonda gösterirken, PROG 250nM konsantrasyonda göstermiştir. Nöroaktif steroidlerin indüklediği oligodendroglial farklılaşma E2, PROG ve DHT'ye karşı geliştirilmiş özgül reseptör antagonistlerinin ortama ilave edilmesiyle engellenmiştir. Nöroaktif steroidlerin yüksek konsantrasyonları cinsiyet farkı gözetmeksizin toksik etki göstermiştir. Bu sonuçlar, steroid hormonların MKHlerin farklılaşmasında rol oynayabileceğini ve daha önemlisi MS ve diğer hastalıklar için MKH nakli tedavisinin geliştirilmesinde önemli bir faktör olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nöroaktif steroidler, mezenkimal kök hücreler, oligodendrositler, hücre farklılaşması, multipl skleroz

ABSTRACT

Tiftikcioğlu BI. Neuroactive Steroid Hormones Modulate The Oligodendroglial Differentiation Of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Neurology, Thesis in Neurology, Ankara, 2006. Neuroactive steroid hormones exert numerous and important effects within the CNS. The observation that gender affects clinical course and therapeutic response of patients with multiple sclerosis (MS) stimulated much interest in the effects of steroid hormones in MS pathogenesis. Adult human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) are a promising candidate cell population for use in reparative cellular therapy for neurological diseases, including MS. We examined the effect of neuroactive steroids on the *in vitro* oligodendroglial differentiation of these cells. The presence of steroid hormone receptors on hMSCs was examined immunocytochemically. Additionally, hMSCs from both male and female donors were cultured with the neuroactive steroids 17- β estradiol(E2), progesterone(PROG) or dihydrotestosterone(DHT) for 7 days. Cells were then examined for the presence of oligodendrocyte precursor markers. Finally, the influence of specific receptor antagonists was examined. Human MSCs express receptors for neuroactive steroids. Neuroactive steroids exert differential effects depending on the gender of the hMSC donor; DHT was responsible for maximal A2B5 expression in hMSCs from male donors whereas E2 exerted the greatest effect on differentiation of 'female' hMSCs. Maximal effects of E2 and DHT were observed at a concentration of 100nM, PROG at 250nM. Specific receptor antagonists for E2, PROG and DHT abrogated the neuroactive steroid-induced increase in oligodendroglial differentiation. High concentrations of neuroactive steroids were toxic for hMSCs, irrespective of gender. These results suggest a role for steroid hormones in the differentiation of hMSCs and may have important implications for the development of MSC transplantation therapy for MS and other diseases.

Keywords: Neuroactive steroids, mesenchymal stem cells, oligodendrocytes, cell differentiation, multiple sclerosis

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mezenkimal Kök Hücreler	3
2.2. Multipl Skleroz	3
2.3. Oligodendrositler	5
2.4. Nöroaktif Steroid Hormonlar	6
2.4.1. Östrojen	9
2.4.2. Progesteron	9
2.4.3. Dihidrotosteron	10
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	12
3.1. Kemik İliği Örneği Alınması	12
3.2. MKHlerin İzole Edilmesi Ve Hücre Kültürü Hazırlanması	12
3.3. MKHler Üzerinde Steroid Hormon Reseptörlerinin İşaretlenmesi	15
3.4. Nöroaktif Steroidlerin MKHlerin İn Vitro Oligodendroglial Farklılaşmaları Üzerine Olan Etkisi	16
3.5. İkili İşaretleme İle Steroid Hormon Reseptörleri Ve A2B5 Ekspresyonunun Gösterilmesi	16
3.6. Steroid Hormon Etkisinin Özgüllüğü	16
3.7. Diğer Oligodendrosit Öncül Hücre Belirleyicileri İle İşaretleme	17
3.8. MTT Hücre Sağkalım Testi	17
3.9. Hücre Sayımı	17
3.10. İstatistiksel Yöntemler	18

4. BULGULAR	19
4.1. MKHlerin Nestin Ekspresyonu	19
4.2. MKHlerin A2B5 Ekspresyonu	19
4.3. Erişkin İnsan MKHler Nöroaktif Steroid Hormon Reseptörlerini Eksprese Etmektedir	21
4.4. Nöroaktif Steroid Hormonlar MKHlerin Oligodendroglial Öncül Hücreler Yönünde Farklılaşmasını Arttırmakta Ve Hücre Artışını Engellemektedir	23
4.5. İkili İşaretleme Yöntemi İle Steroid Hormon Reseptörleri ve A2B5 Ekspresyonunun Birlikte Gösterilmesi	28
4.6. Eş-Zamanlı Nöroaktif steroid Ve Özgül Reseptör Antagonisti Uygulanması Farklılaşma Etkisini Önlemektedir	31
4.7. Diğer Oligodendrosit Öncül Hücre Belirleyicilerinin Ekspresyonu	33
4.8. Nöroaktif steroid Hormonlar Yüksek Konsantrasyonlarda MKHler Üzerine Ölümcül Etkide Bulunmaktadır	35
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

3α -HSOR	3 α -hidroksisteroid oksidoredüktaz
3 β -HSD	3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz
17 β -HSOR	17 β -hidroksisteroid oksidoredüktaz
A2B5	Oligodendrosit öncül hücre belirleyicisi
AR	Androjen reseptörü
CNPase	2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase
DAE	Deneyisel allerjik ensefalomyelit
DHEA-S	dihidroepiandrosteron sülfat
DHT	Dihidrotosteron
E2	17- β östradiol
EDTA	Etilen diamin tetra asetat
ER α	Östrojen reseptörü- α
ER β	Östrojen reseptörü- β
ER-X	Österojen reseptörü-X
FBS	Fetal bovine serum
GABA	Gamma amino bütirik asit
GalC	Galaktozil seramid
GD3	Gangliosid-GD3
<i>In vitro</i>	Canlı organizma dışında, suni ortamda
<i>In vivo</i>	Canlı organizma içinde
MAG	Myelin ilişkili glikoprotein
MBP	Myelin basic protein
MKH	Mezenkimal kök hücre
MOG	Myelin oligodendrosit glikoprotein
MS	Multipl skleroz
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NG2	Proteoglikan NG2
OLG	Oligodendrosit
OP	Oligodendrosit prekürsör hücre
OPC	Oligodendrosit öncül hücre
OPP	Oligodendrosit pre-prekürsör hücre

PDGF α R	Platelet kaynaklı büyüme faktörü- α reseptörü
PLL	Poly-L-lysine
PLP	Proteolipid protein
PR	Progesteron reseptörü
PREG	Pregnenolon
PROG	Progesteron
PS	Pregnenolon sülfat
PSA-NCAM	Polisialik asit-nöral hücre adezyon molekülü
SSS	Santral sinir sistemi
Th	Yardımcı T hücre
THDOC	Tetrahidrodeoksikortikosteron
THP	Tetrahidroprogesteron

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.1	MKHlerin faz kontrast mikroskop ile görüntülenmesi	3
Şekil 2.3.1	Oligodendrosit farklılaşma yolağı ve hücrelerin farklı basamaklarda taşıdıkları belirleyiciler	6
Şekil 2.4.1	Steroidlerin biyosentez basamakları	7
Şekil 3.2.1	Testosteron aromatisasyonu	13
Şekil 3.2.2	Uygulanan nöroaktif steroid hormon konsantrasyonları logaritmik çizelge üzerinde gösterilmiştir	14
Şekil 4.1.1	MKHlerin nestin ekspresyonu	19
Şekil 4.2.1	MKHlerin A2B5 ekspresyonu	20
Şekil 4.2.2	MKHlerde ikili işaretleme ile Nestin ve A2B5 ekspresyonu	20
Şekil 4.3.1	MKHlerde ER α ekspresyonu	21
Şekil 4.3.2	MKHlerde ER β ekspresyonu	22
Şekil 4.3.3	MKHlerde PR ekspresyonu	22
Şekil 4.3.4	MKHlerde AR ekspresyonu	23
Şekil 4.4.1	En etkin konsantrasyonlarda nöroaktif steroidlerin A2B5 ekspresyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması	24
Şekil 4.4.2	En etkin konsantrasyonlarda nöroaktif steroidlerin nestin ekspresyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması	25
Şekil 4.4.3	İkinci erkek vericiden alınan MKHlerde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda A2B5 üzerine olan etkileri	26
Şekil 4.4.4	İkinci erkek vericiden alınan MKHlerde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda Nestin üzerine olan etkileri	26
Şekil 4.4.5	Kadın MKHlerinde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda A2B5 üzerine olan etkileri	27
Şekil 4.4.6	Kadın MKHlerinde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda A2B5 üzerine olan etkileri	28
Şekil 4.5.1	İkili işaretleme ile ER α ve A2B5 ekspresyonu	29
Şekil 4.5.2	İkili işaretleme ile ER β ve A2B5 ekspresyonu	29
Şekil 4.5.3	İkili işaretleme ile PR ve A2B5 ekspresyonu	30
Şekil 4.5.4	İkili işaretleme ile AR ve A2B5 ekspresyonu	30

Şekil 4.6.1	Özgül reseptör antagonisti ve nöroaktif steroidlerin eş-zamanlı uygulanması_A2B5 üzerine olan etki	31
Şekil 4.6.2	Özgül reseptör antagonisti ve nöroaktif steroidlerin eş-zamanlı uygulanması_Nestin üzerine olan etki	32
Şekil 4.7.1	DHT uygulanmış erkek MKHlerinde PDGF α -R ekspresyonu	33
Şekil 4.7.2	DHT uygulanmış erkek MKHlerinde O4 ekspresyonu	34
Şekil 4.7.3	E2 uygulanmış erkek MKHlerinde O4 ekspresyonu	34
Şekil 4.8.1	MTT hücre sağkalım testi sonuçları	36

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.4 Nöroaktif steroidler tarafından modüle edilen nörotransmitter reseptörleri.	8

1. GİRİŞ

Multipl Skleroz (MS) miyelin kılıfının hasarı ile karakterize santral sinir sisteminin (SSS) kronik, inflamatuvar, demiyelinizan, otoimmün kökenli bir hastalığıdır. Batı dünyasında özellikle genç erişkinlerde en sık izlenen nörolojik hastalıktır. Klinik seyir, benign formdan hızlı ilerleyen forma kadar değişkenlik göstermekte, ancak hastaların çoğunda relaps ve remisyonlar ile giden seyir gözlenmektedir. Genetik olarak duyarlı bireylerde çevresel faktörler tarafından tetiklenen otoimmün mekanizmaların etiyopatogenezde sorumlu olduğu düşünülmektedir (1). İlginç bir bulgu olarak, adolesan dönemden sonra kadınları daha çok etkilemektedir (2, 3).

Nöroaktif steroidler, sentez edildikleri yerden bağımsız olarak, nöral aktiviteyi değiştirebilen steroid yapıdaki hormonlardır (4). Santral sinir sistemi içerisinde klasik/genomik ya da hızlı/non-genomik yollar üzerinden etki göstermektedirler (5). Önceleri, steroid hormon sentezinin yalnızca adrenal bezler ve gonadlar gibi periferik organlarda gerçekleştiği düşünülmekteydi. Ancak, 1981'de Baulieu ve arkadaşlarının gonadektomi ve adrenalektomi yapılmış deney hayvanlarında dihidroepiandrosteron sülfat'ın (DHEAS) sinir sisteminde kolesterolden yeni baştan (*de novo*) sentezlendiğini göstermelerinden sonra bu görüş değişmiştir. Takip eden dönemde, pregnenolon(PREG), progesteron, östradiol, testosteron ve dihidrotosteron gibi cinsiyet hormonları dahil pek çok steroid hormonun ve bunların sentezlenebilmeleri için gerekli çok önemli enzimlerin varlığı nöral dokularda gösterilmiştir (6, 7). Nöroaktif steroidler, özellikle miyelin yapımını sağlayan glial hücreler başta olmak üzere, astrositler ve nöronlarda sentezlenmektedir (8). Nöroaktif steroidler santral sinir sistemi içerisinde, hücrelerin nöral yollarda çoğalma ve farklılaşmasının dışında, birçok değişik etkiye de sahiptir (8-11). Son yıllarda bazı araştırmacılar, miyelin üreten ve MS'de hasar gören hücreler olan oligodendrositlerin nöroaktif steroid hormon reseptörlerini ifade ettiklerini ve nöroaktif steroidlerin oligodendrositler (8, 12-14), oligodendrosit öncülleri (progenitör; OP) (15), ve hatta bunlardan daha önceki bir basamakta olan oligodendrosit öncül-öncül hücreleri (pre-progenitör; OPP)(16, 17) üzerine etkileri

olduğunu bildirmiştir. Daha yeni olarak da, nöroaktif steroidlerin kök hücreler üzerine bir takım farklı etkilerde bulunabildiğine dair kanıtlar ne srlmştir (18).

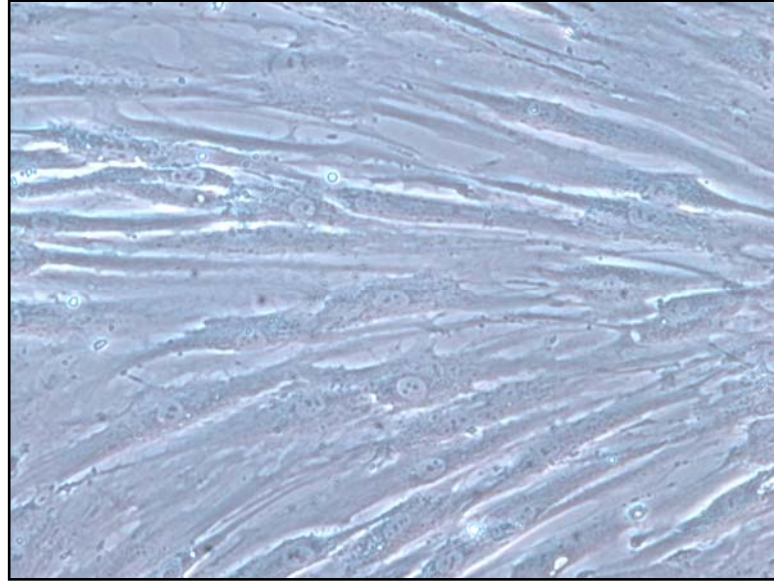
Erişkin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKHler), arasında hepatosit, iskelet ve kalp kası hücreleri, kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerinin de sayılabileceği pek çok farklı hücre fenotipine farklılaşabilen çok yönlü (multipotent) hücrelerdir (19-22). Bu hücrelerin nöroektodermal belirleyicileri de eksprese ettikleri (23-25) ve hem fenotip hem de işlev görme açısından miyelin üreten glial hücrelere farklılaşabildiği (26-28) gösterilmiştir. Bu önemli bulgular, birçok nörodejeneratif hastalığa yaklaşımda yeni potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bir umut kaynağı olmuştur (29).

Bu alışma ile, nöroaktif steroid hormonların MKHlerin davranışları ve biyolojisi üzerine olası etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu olasılığı araştırmak üzere insan MKHlerinde seçilen nöroaktif steroid reseptör ekspresyonları bakılmış ve nöroaktif steroidlerin (17β-stradiol (E2), progesteron (PROG) ve dihidrotestosteron (DHT)) MKHlerin *in vitro* ortamda oligodendroglial farklılaşmaları üzerine etkileri özgül belirleyicilere bakılarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKHler) ilk kez 1961’de Friedenstein tarafından tanımlanmıştır (30). İnsan kemik iliğinden elde edilen erişkin MKHleri hepatosit, myosit, kardiyomyosit, osteoblast, kondrosit ve adipositlere farklılaşabilen çok yönlü hücrelerdir (19). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu hücrelerin değişik nöral fenotiplere de farklılaşabildiği gösterilmiştir (31). Bu nedenle, multipl skleroz dahil birçok nörodejeneratif hastalıkta hücre sel onarım tedavileri için potansiyel bir kaynak haline gelmiştir. İzole edilmeleri ve kültür ortamında yetiştirilmeleri kolaydır (Şekil 2.1.1).



Şekil 2.1.1. MKHlerin faz kontrast mikroskop ile görüntülenmesi (x20)

2.2. Multipl Skleroz

Multipl skleroz, santral sinir sisteminin (SSS) otoimmün, demiyelinizan, kronik bir hastalığıdır. SSS beyaz cevherinde inflamasyon, demiyelinizasyon ve glial skar alanları gelişmekte, beraberinde aksonal ve nöronal hasar da meydana

gelmektedir. Özellikle 20-40 yaş arasında, nüfusun nispeten genç ve üretken kesimini etkilemesi nedeniyle de topluma önemli ölçüde sosyal ve ekonomik bir yük getirmektedir. Hastaların yarısından fazlası hastalık başlangıcından onbeş yıl sonra yardımcı yürüme araçlarına ihtiyaç duyar hale gelmektedir. Hastalık patogenezinde öncelikle SSS’de miyelin yapımından sorumlu hücreler olan oligodendrositlerin otoimmün ataklar sonucunda hasar görmesi sorumlu tutulmaktadır (1). Miyelin onarımı MS tedavisinin önemli bir hedefini oluşturmakta ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Hastalıkla ilgili ilk bilgiler 1824’te, Charles Prosper Ollivier tarafından yayınlanmıştır (32). İzleyen yıllarda yapılan diğer vaka bildirimleri ile hastalığın klinik ve patolojik ayrıntıları tanımlanmıştır. Ancak MS’in epidemiyolojik, genetik ve immünoopatolojik özelliklerine ait ayrıntılı veriler son 50 yılda yapılan araştırmalar neticesinde elde edilmiştir.

İlk kez 1965’te, ultrayapıyı inceleyen çalışmalar ile MS lezyonlarında spontan remiyelinizasyonun gerçekleştiğine dair kesin deliller tespit edilmiştir (33). Bu bulgu miyelin onarım tedavilerinde yeni bir çığır açmış; onarım mekanizmasını baştan yaratmaya çalışmak yerine, zaten işleyen, ancak pek de başarılı olamayan spontan mekanizmayı uyarmak ve desteklemek hedeflerden biri haline gelmiştir. Erişkin oligodendrositlerden ziyade, oligodendrosit öncül hücrelerinin (OPC) spontan remiyelinizasyonun büyük kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir (34).

Spontan remiyelinizasyon mekanizmalarının hangi yollar üzerinden nasıl işlediğine dair kesin kanıtlar elde olmamakla birlikte, bir hipoteze göre erişkin MKHler bunda rol oynamaktadır (34-37). MKHlerin birkaç mekanizma ile bu işleyişe katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Birincisi, hasarlı bölgeye ulaştıktan sonra salgıladığı trofik faktörler ile mikroçevreyi düzenleyerek ve lokal öncül hücreleri harekete geçirerek; ikincisi, öncül hücrelere farklılaşarak ve bir diğeri de, yerel hücrelerle füzyon yoluyla etki gösterdiği düşünülmektedir. Nitekim, MHKlerin intravenöz yol ile enjekte edilmesini takiben hasarlı dokulara ulaştığı, rejenerasyona katkıda bulunduğu, motor ve nörolojik hasarı azalttığı gösterilmiştir (38, 39).

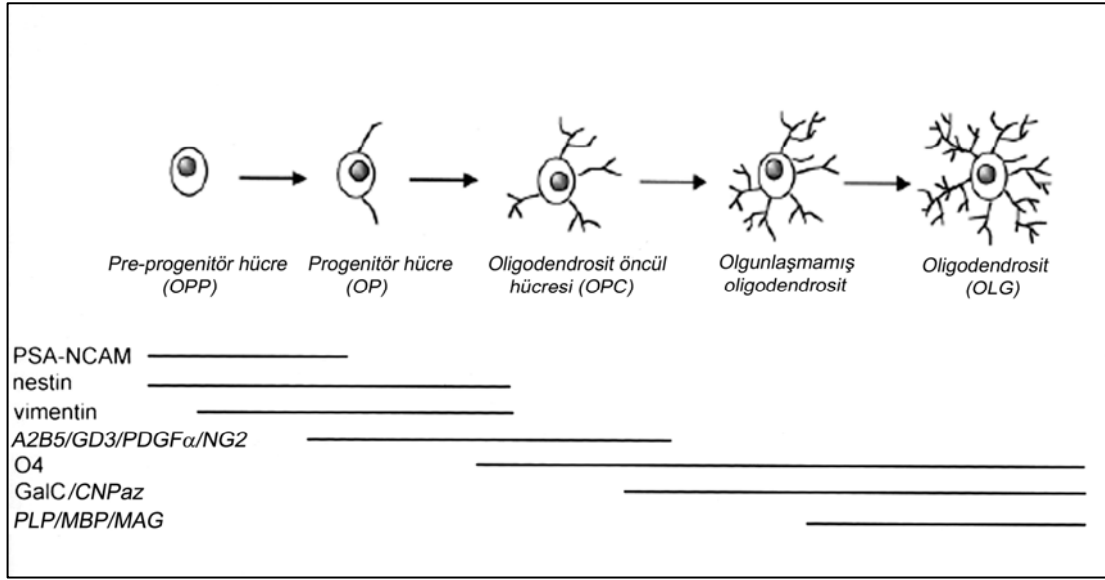
Buna dayanarak kök hücre uygulamalarının bir yerine koyma tedavisinden çok, doğada gerçekleşmekte olan bir işleyişe destek vermek, çeşitli yollar ile bu işleyişi hızlandırmak olarak görülmesi mümkün olabilir (40). Bunu etkileyen faktörleri belirleyebilmek de ancak hastalığın biyolojik temellerinin ve hücrelerin farklı ortamlardaki davranış özelliklerinin anlaşılması ile gerçekleşebilir.

2.3. Oligodendrositler

Oligodendrositler beyinde germinatif alanlarda bulunan (ventriküler ve subventriküler alanlarda yerleşik) öncül hücrelerden kaynaklanırlar. Kemirgenlerde doğumu izleyen dönemde nörogenez büyük ölçüde tamamlanmıştır ancak, glial öncül hücreler aktif olarak çoğalmaya devam etmektedirler. Oligodendrosit öncülleri beyaz cevhere göç ederler ve miyelin üreten olgun oligodendrositlere farklılaşırlar. Bu farklılaşma sırasında oligodendrogliyal hücreler bir seri fonksiyonel, antijenik ve morfolojik değişiklikten geçerler. Oligodendrosit pre-progenitör hücreleri (OPP) hakkındaki bilgiler kısıtlı olmakla birlikte, bir sonraki evrede daha iyi tanımlanmış olan oligodendrosit progenitör (OP) ve öncül hücreler (OPC) bulunmaktadır (Şekil 2.3.1).

OPP, küçük, yuvarlak, hareket etme ve çoğalma yetenekleri olan hücrelerdir (41) ve hücre belirleyicisi olarak PSA-NCAM taşırlar (42). OP, oligodendrosit yolağının iyi tanımlanmış erken bir öncül hücreleridir. Bunların da hareket etme ve çoğalma kapasiteleri bulunur ve bi- ya da tripolar morfolojik karaktere sahiptirler. Hücre belirleyicisi olarak A2B5, NG2, PDGF α ve GD3-gangliosidini taşırlar (43-47). OP ilerleyen basamakta OLG'lere dönüşür. OLG'lerin daha karmaşık, dallanmış membran uzantıları bulunur. OLG'lerin hareket etme yeteneği yoktur ve çoğalamazlar. Galaktozilseramid (GalC), *myelin basic protein* (MBP) gibi bazı miyelin protein ve lipidlerini taşırlar (48)(Şekil 2.3.1).

Oligodendrogliyal hücre biyolojisinin incelenmesi, miyelinizasyon işleminin ve remiyelinizasyon sürecinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.



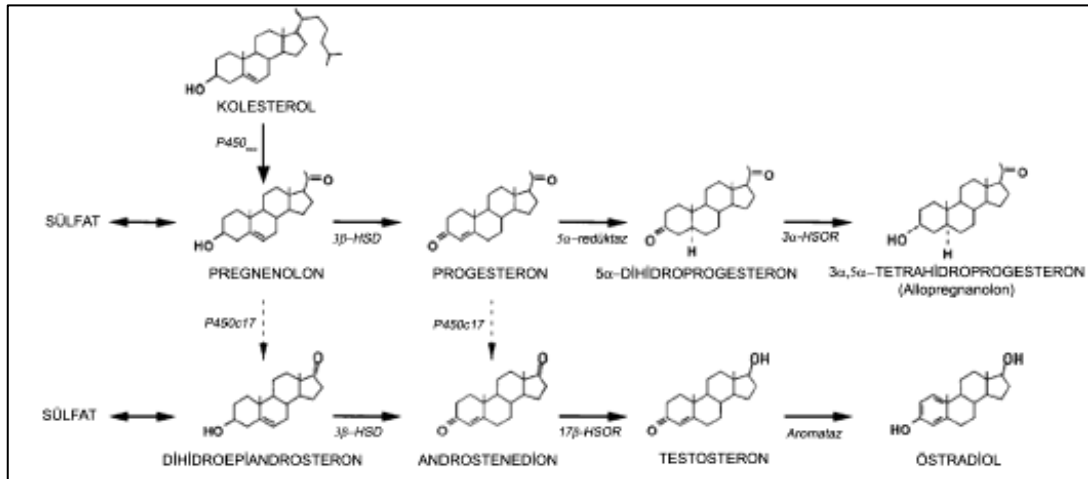
Şekil 2.3.1. Oligodendrosit farklılaşma yolağı ve hücrelerin farklı basamaklarda taşıdıkları belirleyiciler

2.4. Nöroaktif Steroid Hormonlar

Lipofilik yapıları nedeniyle steroid hormonlar endokrin organlardan salgılanmalarının ardından kan-beyin-bariyerini kolaylıkla geçip SSS'ne ulaşabilirler. Ancak, bir grup nöroaktif steroid hormon periferik kaynaklara ihtiyaç duyulmadan beyinde de sentezlenebilmektedir. Bu steroidler beyinde kolesterolden “*de novo*” sentezlenmekte ve nöral aktiviteyi değiştirebildiklerinden dolayı “**nöroaktif steroidler**” olarak adlandırılmaktadır (8). Sıçanlarda adrenalectomi ve gonadectomi yapıldıktan (8, 49) ve maymunlarda da adrenal baskılanma sağlandıktan sonra (50) beyinde steroid hormon varlığı devam etmektedir. İlginç olarak, adrenalectomi ve orşiektomi yapılan ve kontrol grubu olarak da sadece cerrahi insizyon uygulanan erkek sıçanlarda, operasyon sonrası ikinci günde, beyinde muhtemelen strese karşılık nöral lokal cevap olarak, dihidroepiandrosterodion sülfat (DHEAS) düzeylerinde geçici bir yükselme saptanmıştır (51). Beyinde steroid sentezini destekleyen diğer kanıtlar sıçan glial hücre kültürlerinden gelmektedir. Hücreler radyoaktif işaretli

kolesterol öncülleri ve türevleri ile muamele edildikten sonra steroidleri sentezlemişlerdir (8).

Sinir sisteminin pek çok hücresi kolesterolü sentezleyebilmektedir (52). Glial hücreler de bunlardan biridir. 1980'lerin sonunda nöroaktif steroidlerin sentez basamaklarında kritik bir rol oynayan P450_{sc} enziminin beyaz cevherde (53, 54) ve oligodendrositlerde (52, 55) bulunduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda sentez basamaklarındaki diğer enzimlerin de sinir sisteminde bulunduğu kanıtlanmıştır (6, 7, 56, 57). Steroid hormonların biyosentez basamaklarında yer alan enzimler Şekil 2.4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4.1. Steroidlerin biyosentez yolağı. İlk hız kısıtlayıcı basamak sitokrom P450_{sc} tarafından kolesterolün pregnenolona dönüştürüldüğü basamaktır. 3β-HSD=3β-hidroksisteroid dehidrogenaz; 3α-HSOR=3α-hidroksisteroid oksidoredüktaz; 17β-HSOR=17β-hidroksisteroid oksidoredüktaz. (Schumacher M ve diğ., 2000'den değiştirilerek alınmıştır (58)).

Nöroaktif steroidlerin sinir sisteminde, davranış biyolojisinden, bilişsel performansa, hafızaya, gelişim ve yaşlanma süreci ile miyelinizasyon üzerine trofik etkilere kadar uzanan çok geniş, oldukça karmaşık ve önemli etkilere sahip oldukları düşünülmektedir (8). Nöroprotektif, sedatif, hipnotik, anksiyolitik, anestetik,

antikonvülzan, antipsikotik, antidepresan ve uyku düzenleyici etkilerini incelemeye yönelik çalışmalar mevcuttur (59).

Nöroaktif steroidlerin genomik etkilerini (klasik yol) gösterdikleri hücre içi steroid reseptörlerinin dışında, non-genomik (hızlı) sinyal iletimi için GABA_A reseptörleri ve bir çok ligand-kapılı iyon kanalını da modüle edebildikleri çok sayıda araştırma ile gösterilmiştir (59). Bahsedilen reseptörler ile nöroaktif steroidlerin yaptığı etkiler ve etki ettikleri konsantrasyon aralıkları Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Nöroaktif steroidler tarafından modüle edilen nörotransmitter reseptörleri.

Reseptör	Steroid	Etki	Etkin konsantrasyon aralığı	Kaynak
GABA_A	3 α ,5 α -THP	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M	(60)
	3 α ,5 β -THP	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M	(61)
	3 α ,5 α -THDOC	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M	
	PS	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M	
	DHEA-S	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M	
Nikotinic asetilkolin	PROG	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M	(62)
			10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴ M	(63)
Glisin	3 α ,5 α -THP	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴ M	(63)
	PROG	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M	(64)
5-HT₃	PS	Negatif	10 ⁻⁴ M ^a	
	Östradiol (α ve β)	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M	(65)
	PROG	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M	
	Testosteron	Negatif	10 ⁻⁵ M ^a	
	3 α ,5 α -THP	Negatif	10 ⁻⁵ M ^a	
NMDA	PS	Yok	10 ⁻⁵ M ^a	
	E2	Negatif	5 x 10 ⁻⁵ M ^a	(66)
	PREG-S	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻³ M	(67)
	PREG hemisüksinat	Negatif	10 ⁻⁴ M ^a	(68)
	PS	Pozitif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M	(69)
AMPA			10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M	(70)
Kainat	PS	Negatif	10 ⁻⁴ M ^a	(69)
	E2	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M	(71)
Oksitosin	PROG	Pozitif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M	(72)
	PROG	Negatif	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁶ M	(73)
Sigma Tip 1	DHEA-S	Pozitif	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵ M	(74)
	PS	Negatif	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵ M	
	PROG	Antagonist	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶ M	

DHEA-S: dihidroepiandrosteron sülfat; PREG: pregnenolon; PS: pregnenolon sülfat; THDOC: tetrahidrodeoksikortikosteron; THP: tetrahidroprogesteron.

^a:Sadece tek konsantrasyon test edilmiş.

(Rupprecht R. ve Holsboer F., 1999'dan alınmıştır (59))

2.4.1. Östrojen

1966'da, Curry ve Heim östrojen uygulanmasının yenidoğan sıçanlarda SSS miyelinizasyonunu arttırdığını bildirilmişlerdir (75). Bu bulgu, araştırmacıların ilgisini bu yöne çekmiş ve daha sonraki çalışmalar için bir temel olmuştur.

Östrojen genomik etkilerini östrojen reseptörü- α ($ER\alpha$) ve östrojen reseptörü- β ($ER\beta$) ile son yıllarda yeni tanımlanan östrojen reseptörü-X ($ER-X$) üzerinden yapmaktadır. $ER\alpha$ ve $ER\beta$, nükleer reseptör süper ailesinden olan steroid reseptörleridir. Zhang ve diğ., *in vitro* şartlarda oligodendrosit hücre serilerinde $ER\alpha$ ve $ER\beta$ bulunduğunu; $ER\alpha$ 'nın nükleer, $ER\beta$ 'nin ise sitoplazma yerleşimli olduğunu göstermiştir (76). Aynı çalışmada, daha önce Jung-Testas ve diğ., 1992'de bildirdiği gibi (77), primer glial hücre kültürlerine östriol eklenmesinin doza bağımlı olarak OLG farklılaşmasını arttırdığı da saptanmıştır. Takao ve diğ. tarafından östrojen uygulanmasının doza bağımlı olarak OLG ve öncülleri üzerinde toksik uyarılara karşı koruyucu etki gösterdiği ve bu nedenle de nöroprotektif olduğu bildirilmiştir (78).

Östrojenin, kaspaz-6 aracılı nöronal hücre ölümünü önlediği (79), hipokampal nöronlarda amiloid- β peptid toksisitesini azalttığı (80, 81), yine bu hücreleri eksituar amino asitler, kimyasal hipoksi ve hemoglobin ile tetiklenen oksidatif strese karşı koruduğu (82, 83) bildirilmiştir.

2.4.2. Progesteron

PROG 'un sinir sistemi üzerine olan etkileri de uzun yıllardır araştırmalara konu olmuştur. Bildirilen nöroprotektif etkilerinin (84, 85) dışında, PROG yeni miyelin kılıfı yapımı sırasında bir sinyal molekülü olarak da görev yapmaktadır. Bu bulgu ilk olarak periferik sinirlerde gözlenmiştir. Schwann hücreleri tarafından lokal olarak sentezlenen PROG, periferik sinir hasarı sonrasında yeni miyelin kılıflarının oluşmasını (remiyelinizasyonu) arttırmıştır (86, 87). Miyelinizasyon üzerindeki bu etkisini iki farklı sinyal iletim mekanizması üzerinden gerçekleştirmektedir; birincisi,

hücre içi progesteron reseptörü (PR) ve ikincisi, hücre membranında yerleşik GABA_A reseptörleri.

Yenidoğan sıçanlardan alınan glial hücre kültürlerinde dokuz gün süreyle PROG uygulanması, hücre çoğalmasını azaltmış, OLG belirleyicisi olan MBP-pozitif (*myelin basic protein*) ve CNPase-pozitif (2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase) hücre sayısını arttırmıştır (88). Bu bulgu, OPC'lerin PROG etkisi altında OLG yolunda farklılaşma gösterdiğinin bir işaretidir.

Gago ve diğ., PROG'un sadece OPC farklılaşmasının erken evrelerinde sentezlenebildiğini, ancak olgunlaşmış OLG tarafından yüksek miktarlarda kullanıldığı ve metabolize edildiği bildirilmiştir. Üstelik, bir nöroaktif steroid olan 3 α ,5 β -THPROG'un esas olarak OPC tarafından üretildiği de kaydedilmiştir (16).

PROG SSS'de de OLG tarafından sağlanan miyelin yapımını uyarmaktadır. Yedi günlük sıçan ve farelerden alınan serebellum doku kültürlerine PROG uygulanması, cinsiyetten bağımsız olarak, miyelin oluşumunu hızlandırmıştır. Bu etkinin hücre içi PR üzerinden gerçekleştiği saptanmış ve PR antagonisti mifepristone uygulanmasını takiben bu etki önlenmiştir. Aynı çalışmada, PR taşımayan (*PR knock-out*) farelerde PROG'un miyelinizasyon üzerine etkisinin olmadığı da kaydedilmiştir (13). Bir başka araştırmada, erişkin sıçanlarda SSS'de toksinle indüklenen demiyelinizasyon oluşturulmasını takiben beş hafta süreyle verilen PROG tedavisinin, yavaş remiyelinizasyon sürecini desteklediği bildirilmiştir (89).

2.4.3. Dihidrotestosteron

Androjenlerin sinir sistemi üzerine olan etkileri östrojen ve progesterondan daha az araştırılmıştır. Testosteron nöroprotektif etkisini ya doğrudan ya da aromatzasyon ile östrojene dönüşerek gösterir (90). Androjenlerin, özellikle de testosteronun, SSS demiyelinizan hastalıklarının patofizyolojisindeki rolü biraz

tartışmalıdır. MS kadınlarda daha yüksek oranda görülmekle birlikte, erkeklerde bu hastalık daha hızlı ve ilerleyici seyretmektedir (91). Caruso ve diğ., testosteronun OLGleri eksitotoksik hücre ölümüne daha hassas hale getirdiğini bildirmiştir (92). Buna karşın, testosteronun DAE modelinde koruyucu olduğunu ileri süren yayınlar mevcuttur (93).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın tüm laboratuvar aşamaları *European Neurological Society* tarafından sağlanan burs desteği ile, Şubat-Mayıs 2005 tarihleri arasında, Bristol Üniversitesi, Klinik Nörobilim Enstitüsü, Glial Hücre Biyolojisi Laboratuvarı'nda, çalışmacının kendisi tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kemik İliği Örneği Alınması

Araştırma ile ilgili olarak hastalardan kemik iliği örneği alınabilmesi için öncelikle lokal etik komite izni alınmıştır. Kalça protezi yerleştirilmek üzere cerrahi girişim yapılacak olan ortopedi hastaları ile cerrahi öncesinde görüşülerek bilgi verilmiş ve hastalardan bilgilendirilmiş hasta onam formu ile onayları alınmıştır. Cerrahi işlem sırasında çıkartılan ve normal koşullarda atılacak olan kemik dokusu, heparin ve RPMI-1640 içeren tüpe konulmuştur. Örnek, aynı gün içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilerek laboratuvara ulaştırılmış ve işleme alınmıştır.

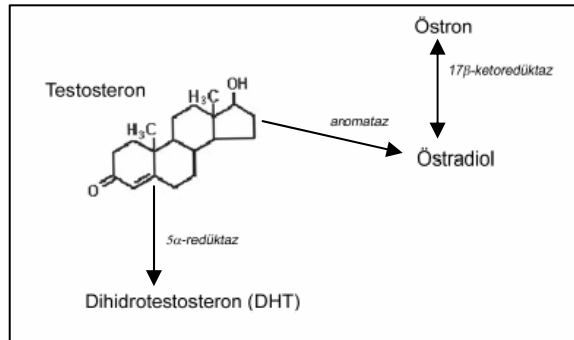
3.2. MKHlerin İzole Edilmesi ve Hücre Kültürü Hazırlanması

Çalışmada iki erkek hasta ile bir kadın hastadan elde edilen kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Steril koşullarda petri kutusuna alınan kemik iliği dokusu Hanks solüsyonu ile birkaç kez yıkandıktan sonra, 50mL tüpe aktarılmıştır. Ardından üzerine lymphoprep (Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS) eklenerek, konsantrasyon gradienti oluşması sağlanmıştır. 3000rpm hızda 30 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan mononükleer hücreler pipet yardımıyla ayrılıp Hanks solüsyonu ile yıkanmıştır. İçerikteki kırmızı küreleri eritmek amacıyla buzdolabında +4°C'de, on dakika boyunca 0,15M amonyum klorid, 0,01M potasyum bikarbonat ve 0,15mM EDTA karışımı ile bekletilip santrifüj edilmiştir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra $4 \times 10^5 / \text{cm}^2$ hücre yoğunluğunda olacak şekilde 25 ve 75 cm^2 hücre kültür ortamına (flask) ekilmiştir. Üzerine MKHler için özel olarak geliştirilmiş hücre solüsyonu [standart MKH solüsyonu; 10% foetal bovine serum (FBS, StemCell Technologies Inc., Canada, 06471) ile zenginleştirilmiş Dulbecco's modified eagle's medium

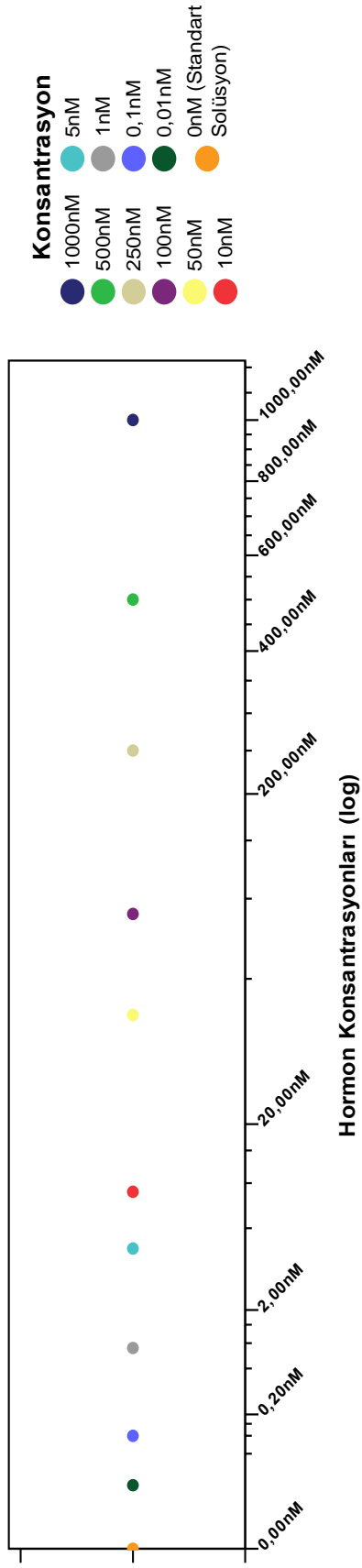
(D5523, Sigma)] eklenmiştir. Hücreler 37°C , %5 CO₂ ve %95 nem ihtiva eden etüvde, hücre kültür ortamı şartlarında tutulmuştur. 72 saat sonra yüzeye yapışmayan hücreler, solüsyon değiştirilerek atılmıştır. Solüsyon 5-7 günde bir değiştirilerek taze kalması sağlanmıştır. Hücre yoğunluğu >%80 olduğunda hücreler pasajlanmıştır.

Pasajlanma işlemi için kültür ortamına yapışmış olan hücreler %25 EDTA içeren trypsin solüsyonuyla (Trypsin-EDTA, BE17-161E, Cambrex) inkübe edilip yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır. Santrifüj edilmiş ve hücre sayısı tespit edildikten sonra $1 \times 10^3 / \text{cm}^2$ hücre yoğunluğunda olacak şekilde PLL-kaplı (P5899, Sigma) cam ortam (*coverslip*; 12mm, No.1) üzerine ekim yapılmıştır. Bu cam ortamlar daha önceden PLL ile kaplanıp, 4-kuyucuklu tabakalara yerleştirilmiş olup, kullanıma hazır olarak bekletilmektedir. Kuyucuklar içerisindeki cam ortamlara ekilen hücreler üzerine standart MKH solüsyonu eklenmiştir. Pasajlanan ve yeniden ekim yapılan hücreler yine etüvde kültür şartlarında takip edilmiştir.

Ekimden 24 saat sonra kuyucuklar içerisindeki solüsyon, farklı konsantrasyonlarda E2 (E2758, Sigma), PROG (P7556, Sigma) ya da DHT (A8380, Sigma) eklenmiş olan MKH solüsyonları ile değiştirilmiştir. Androjen olarak, ortamdaki aromataz enzimi aracılığıyla östrojene dönüşmediği için DHT kullanılmıştır (Şekil 3.2.1). Etanol çözeltisi olarak hazırlanan 1000nM konsantrasyondaki E2, PROG ve DHT stok solüsyonları 0,01nM, 0,1nM, 1nM, 5nM, 10nM, 50nM, 100nM, 250nM, 500nM ve 1000nM konsantrasyonlarına uygun gelecek şekilde dilüe edilerek MKH kültürlerine eklenmiştir (Şekil 3.2.2). Kültür ortamında en son etanol konsantrasyonu %0.03'ten küçüktür.



Sekil 3.2.1. Testosteron aromatisasyonu



Şekil 3.2.2. Uygulanan nöroaktif steroid hormonların konsantrasyonları logaritmik çizelge üzerinde gösterilmiştir.

Nöroaktif steroidlerin en etkin konsantrasyonları tek bir erkek vericiden alınan hücreler üzerinde saptanmıştır. Her bir nöroaktif steroid için saptanan en etkin konsantrasyon daha sonra ikinci bir erkek verici ve bir kadın vericiden alınan MKHler üzerinde de incelenmiştir.

3.3. MKHler Üzerinde Steroid Hormon Reseptörlerinin İşaretlenmesi

Hem erkek, hem de kadın vericiden alınan MKHler cam ortamlara ekildikten sonra standart MKH solüsyonunda bekletilmiş ve immünohistokimyasal boyama yöntemi ile nöroaktif steroidlere ait reseptörlerin varlığı açısından incelenmiştir. Bu amaçla, hücreler %5 NGS ile bloklamayı takiben, %4 paraformaldehit (Alrich 15,812-7) ile fikse edilmiştir. Methanol ile -20°C'de on dakika süreyle bekletilip hücre zarı geçirgenliği sağlanmıştır. Bloklama işlemi otuz dakika süreyle tekrarlandıktan sonra birincil antikolar [anti-östrojen reseptör- α (anti-ER α ; mc-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, 1 μ g/ml), anti-östrojen reseptör- β (anti-ER β ; AB1410, Chemicon, UK, 1:300), anti-progesteron reseptör (anti-PR; MAB462, Chemicon, UK, 1:1000) ve anti-androjen reseptör (anti-AR; PG-21, Chemicon, UK, 1:100) antikoları] ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından uygun ikincil antikolar (AF488 goat anti-rabbit IgG ya da AF488 goat anti-mouse IgG_{2a}, Molecular Probes, Invitrogen, UK, 1:1000) kullanılarak işaretleme yapılmıştır. Hücre çekirdekleri Hoescht ile boyanarak görünür hale getirilmiştir. Boyama işlemlerinin sona ermesiyle birlikte cam ortamlar lam üzerine Vectashield (H1000, Vector Lab., CA) kullanılarak yapıştırılmış ve kenarları hava almayacak şekilde mühürlenmiştir. İmmünofloresan mikroskop altında pozitif hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.4. Nöroaktif Steroidlerin MKHlerin *In Vitro* Oligodendroglial Farklılaşmaları Üzerine Olan Etkisi

Erişkin erkek vericiden alınan MKHler farklı konsantrasyonlardaki E2, PROG ya da DHT ihtiva eden kültür solüsyonlarında 7 gün süreyle bekletilmiş ve bu sürenin sonunda erken oligodendroglial hücre belirleyicilerinin ekspresyonu için incelenmiştir. Hücreler, ikili işaretleme yöntemiyle A2B5 (MAB1416, R&D Systems, UK, 2µg/ml) ve nestin (MAB5326, Chemicon, UK, 1:400) belirleyicileri için boyanmıştır. A2B5 boyaması hücreler henüz canlı iken yapılmıştır. Şöyle ki, hücreler etüvde otuz dakika boyunca %5NGS ile bekletilmiş hemen ardından anti-A2B5 antikoru ile inkübe edilmiştir. Takiben hücre içi boyama için yukarıda bahsedilen yöntem kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında (44, 46, 94), tıpkı daha önceki oligodendrosit yolağı ve steroid yapıdaki cinsiyet hormonları çalışmalarında (95) da tercih edildiği gibi, oligodendroglial yolağın ve bu yöndeki farklılaşmanın (oligodendroglial öncül hücreler) kabul görmüş güçlü bir belirleyicisi olması nedeniyle öncelikle A2B5 ekspresyonunun incelenmesi tercih edilmiştir.

3.5. İkili İşaretleme ile Steroid Hormon Reseptörleri ve A2B5 Ekspresyonun Gösterilmesi

PLL-kaplı cam ortamlar üzerine ekilmiş olan MKHler saptanan en etkin konsantrasyonlardaki E2, PROG ve DHT ile kültür ortamında bekletilmiştir. Ekimin yedinci gününde, cam ortamlar ikili işaretleme yöntemiyle uygun nöroaktif steroid hormon reseptör antikoru ve anti-A2B5 antikoru ile boyanmıştır.

3.6. Steroid Hormon Etkisinin Özgüllüğü

Nöroaktif steroid hormonların saptanan etkilerinin kendi reseptörleri aracılığıyla olup olmadığını araştırmak amacıyla ilgili reseptör antagonistleri ICI 182,780 (1000nM, Tocris, UK), mifepriston (10,000nM, M8046, Sigma, UK) ve

flutamid (100nM, F9397, Sigma, UK), sırasıyla özgül E2, PROG ve DHT reseptör antagonistleri olarak kullanılmıştır (96-98).

3.7. Diğer Oligodendrosit Öncül Hücre Belirleyicileri İle İşaretleme

Saptanan en etkin konsantrasyonlarda (100nM E2, 250nM PROG ya da 100nM DHT) 7 gün süreyle bekletilen MKHler diğer oligodendroglial öncül hücre belirleyicileri olan anti-PDGFR, anti-NG2 ve anti-O4 antikoları için de boyanmıştır.

3.8. MTT Hücre Sağkalımı Testi

Canlı hücre sayısı ya da hücre çoğalma miktarı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; M5655, Sigma, UK) hücre sağkalımı testi ile ölçülmüştür. Yaşayan hücreler aktif mitokondrileri aracılığıyla MTT'yi indirgeyerek gözle görünür koyu lacivert formazan reaksiyonu ürününe dönüştürmektedir. Kısaca, MKHler 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve ertesi gün 1mg/ml MTT içeren standart MKH solüsyonu ile etüvde bir saat bekletilmiştir. Süpernatant aspire edildikten sonra ve hücre içeren kuyucuklara isopropanol konulmuştur. Formazan ürünü isopropanolde çözünmektedir. Spektrofotometre (Multiskan Ascent spectrophotometer) ile 540nm'deki özgül ışığı soğurma miktarı tespit edilerek, çözünmüş formazan ürünü miktarı, dolayısıyla da canlı hücre miktarı saptanmıştır.

3.9. Hücre Sayımı

İmmünohistokimyasal yöntemler ile boyanan cam ortamlardaki hücreler, floresans mikroskobu (Leica FW4000-TZ fluorescent microscope) ile görüntülenmiş ve önceden belirlenmiş alanlar manüel olarak sayılmıştır. Leica DFC350-FX dijital

kamera ve Leica FW4000 Floresan Görüntüleme Yazılımı kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Toplam hücre sayıları Hoescht-pozitif hücre çekirdekleri sayılarak hesaplanmıştır.

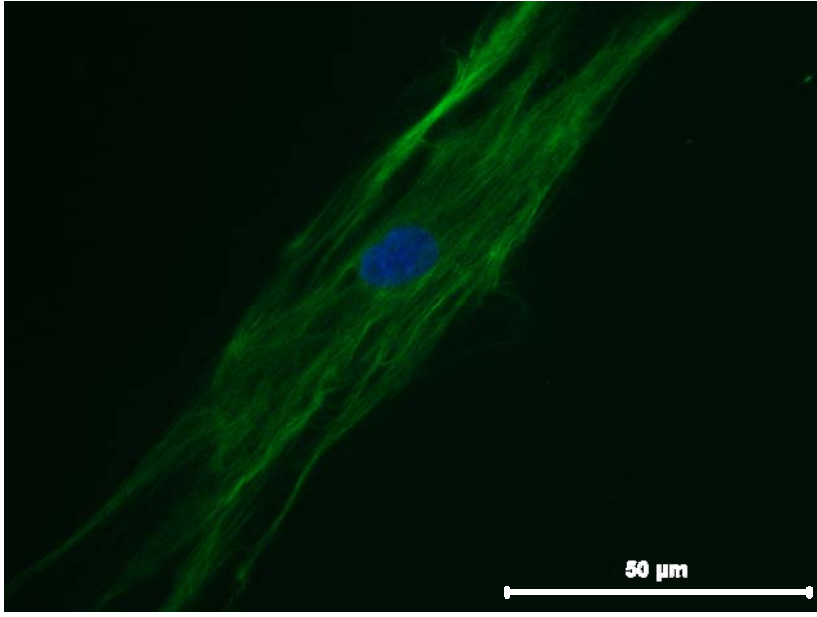
3.10. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel değerlendirme SPSS 13.0 İstatistik Paket Programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama ± 2 standart hata ortalaması ve %95 güven aralığı verileri olarak sunulmuştur. Değişik nöroaktif steroid hormon konsantrasyonlarındaki veriler ile standart solüsyonla muamele edilen hücrelerin farklılaşma verileri, tek yönlü değişkenlik analizi (ANOVA) kullanılarak karşılaştırılmıştır. Post-hoc çoklu karşılaştırmalar ise Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. P değeri 0.05'ten düşük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MKHlerin Nestin Ekspresyonu

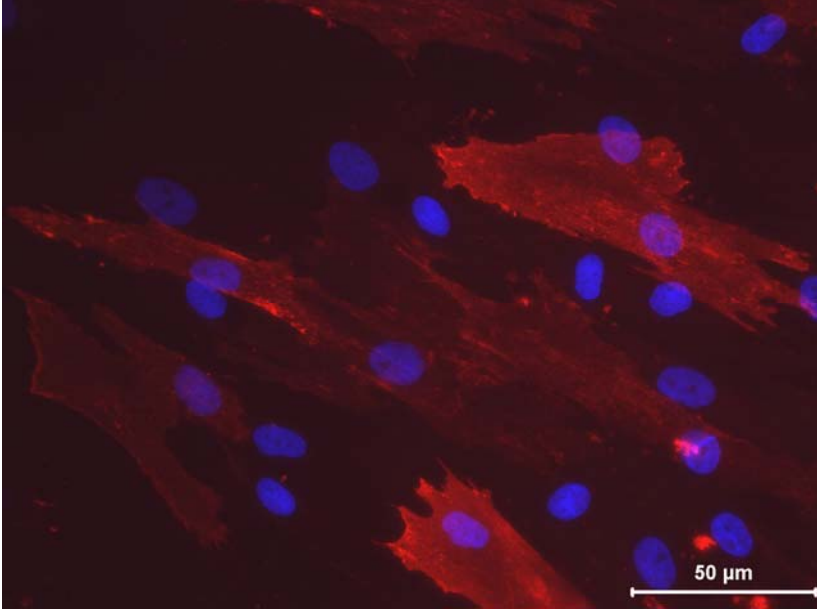
Nestin, erişkin sinir sisteminde değişik n6ral tiplere farklılaşabilen çok y6nl6 h6crelerin bir belirleyicisi olup, h6cre iskeletinin yapısal bir elemanıdır. MKHlerin standart MKH sol6syonuyla bekletilmesini takiben bir grup h6crenin nestin eksprese ettiği g6r6lm6řt6r (şekil 4.1.1).



şekil 4.1.1. MKHlerin nestin ekspresyonu (yeşil: Nestin, mavi: Hoescht)

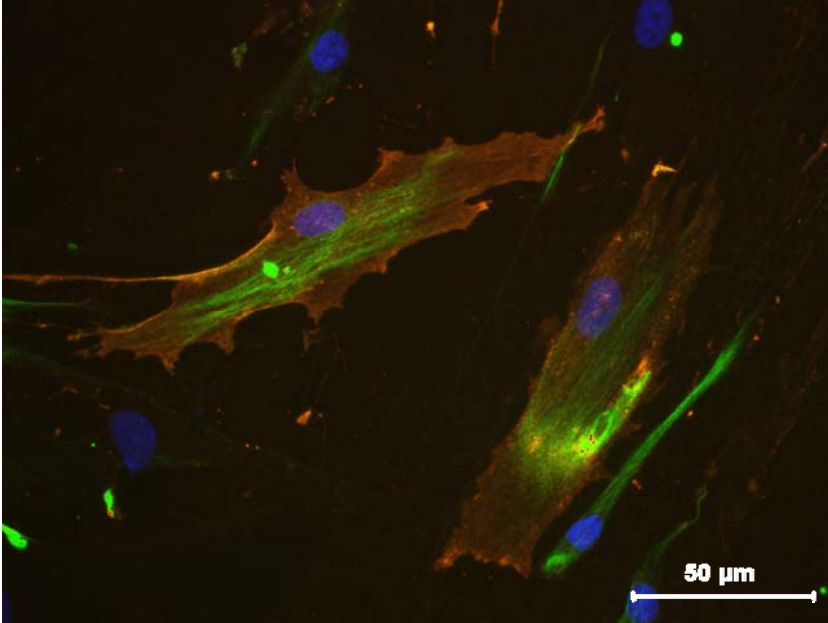
4.2. MKHlerin A2B5 Ekspresyonu

A2B5, oligodendroglial farklılaşma yolundaki 6nc6l h6crelerin h6cre zarında bulunan gangliosid yapısında bir belirleyicisidir. MKHlerin standart MKH sol6syonu ile bekletilmeyi takiben d6ř6k oranlarda A2B5 eksprese ettikleri izlenmiştir (şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1. MKHlerin A2B5 ekspresyonu (kırmızı: A2B5, mavi: Hoescht)

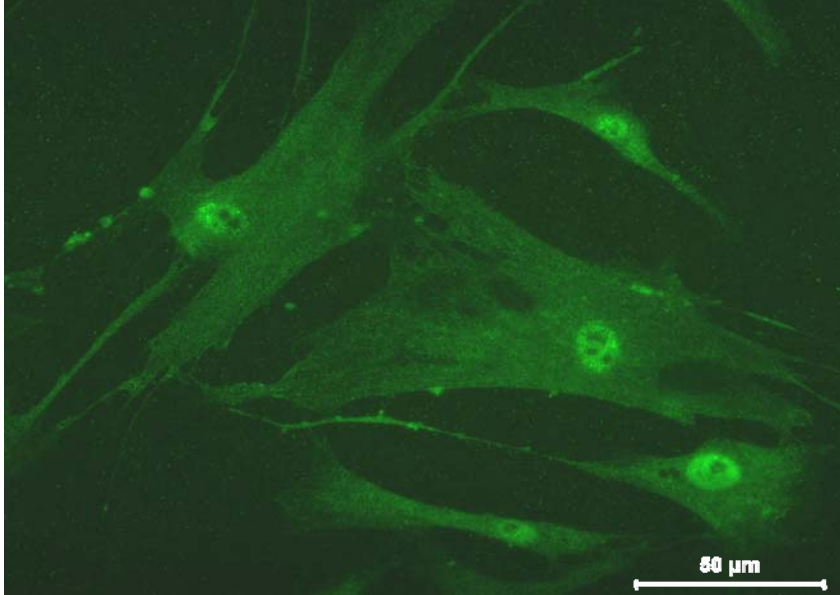
Bazı MKHlerin her iki antijeni de taşıdıklarının saptanması ilginç bir bulgudur (Şekil 4.2.2).



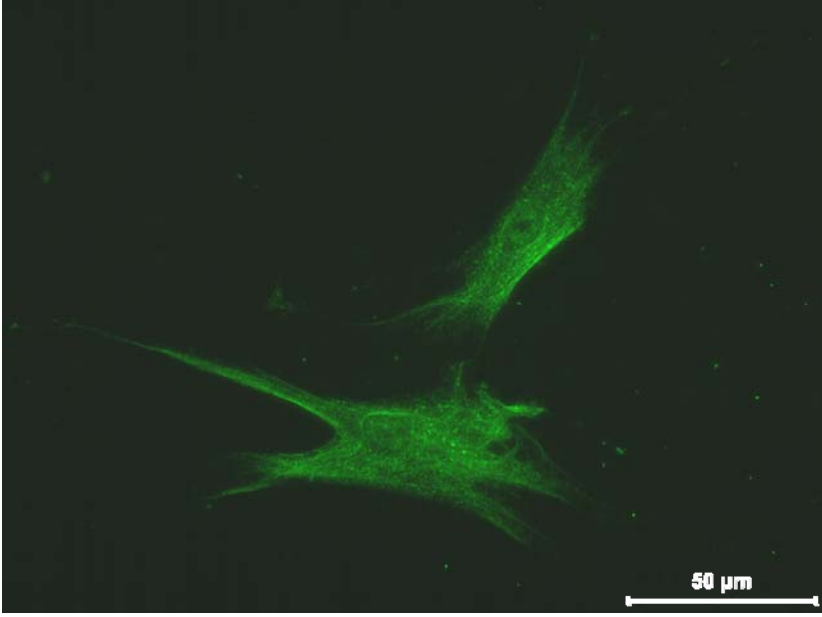
Şekil 4.2.2. MKHlerde ikili işaretleme ile nestin ve A2B5 ekspresyonu (yeşil: nestin; kırmızı: A2B5; mavi: Hoescht).

4.3. Erişkin İnsan MKHler Nöroaktif Steroid Hormon Reseptörlerini Eksprese Etmektedir

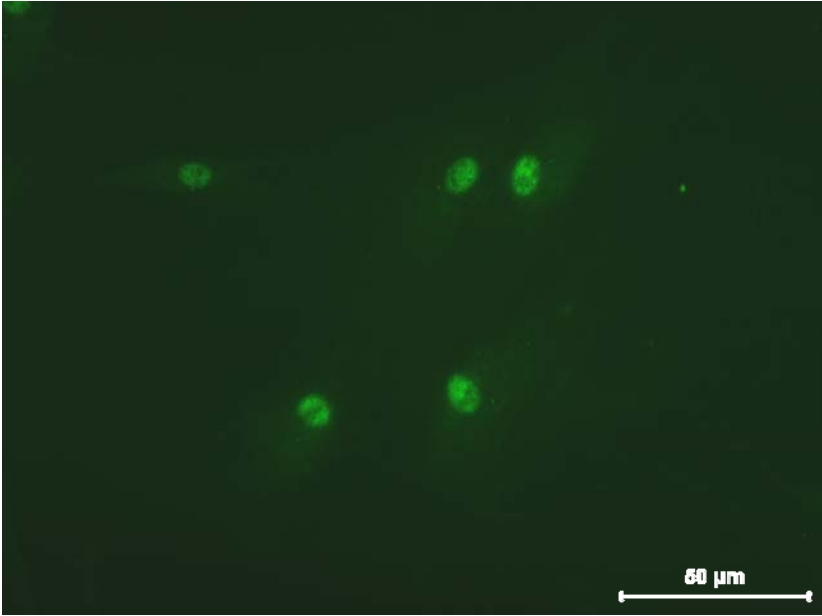
Hem erkek hem de kadın vericilerden alınan MKHler nöroaktif steroid hormon reseptörlerinin varlığı açısından ilgili antikolar ile boyanmış ve tüm hücrelerin E2, PROG ve DHT reseptörlerini taşıdıkları görülmüştür. ER α sitoplazmada da saptanmasına karşın daha yüksek oranda hücre çekirdeğinde eksprese olmaktadır (Şekil 4.3.1). ER β ise esas olarak sitoplazmada yerleşmiştir (Şekil 4.3.2). PR ve AR hücre çekirdeğinde bulunmaktadır (Şekil 4.3.3 ve şekil 4.3.4). İlgili steroid hormonlar ile muamele edilmiş MKHlerde bu reseptörlerin gözlenebilir yoğunluğunda değişim izlenmemiştir. Bir diğer deyişle, MKHler hormonların etkisi altında bırakıldığında ilgili reseptör dağılımı ya da yoğunluğunda belirgin bir değişiklik meydana gelmemektedir.



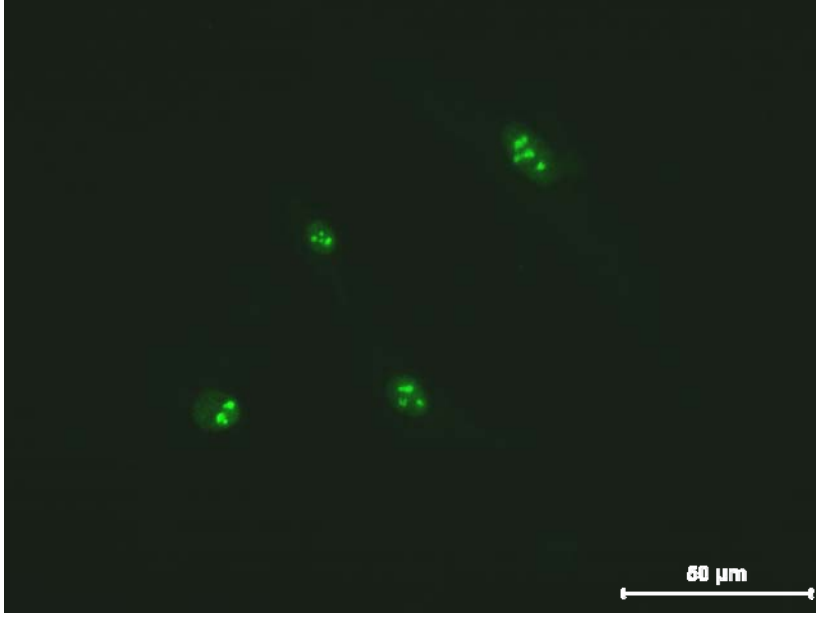
Şekil 4.3.1. MKHlerde ER α ekspresyonu



Şekil 4.3.2. MKHlerde ER β ekspresyonu



Şekil 4.3.3. MKHlerde PR ekspresyonu



Şekil 4.3.4. MKHlerde AR ekspresyonu

4.4. Nöroaktif steroid Hormonlar MKHlerin Oligodendroglial Öncül Hücreler Yönünde Farklılaşmasını Arttırmakta ve Hücre Artışını Engellemektedir

Tek bir erkek vericiden alınan MKHlerin değişik konsantrasyonlardaki nöroaktif steroidler ile muamele edilmesi hücrelerin oligodendroglial öncül hücreler yönünde farklılaşmasını istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttırmıştır.

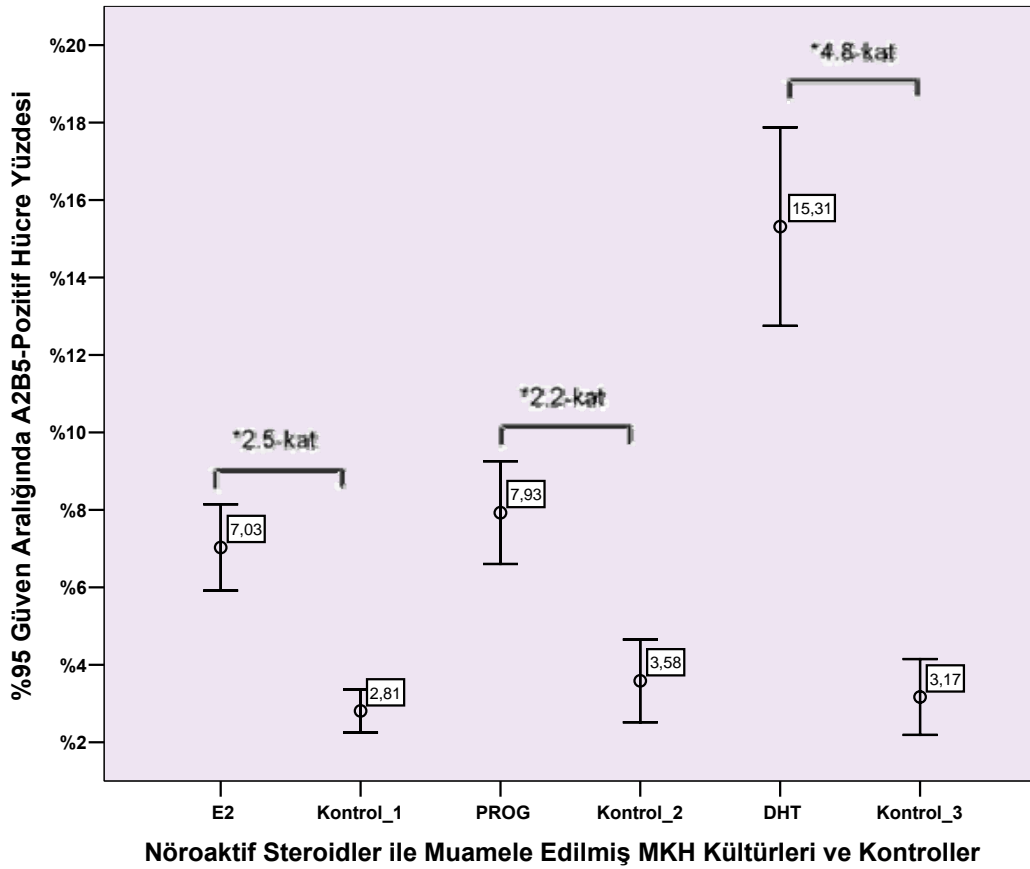
DHT, E2 ve PROG, oligodendrosit öncül hücre belirleyicisi olan A2B5 ekspresyonunu uygulanan tüm konsantrasyonlarda arttırmıştır. Ancak bu etki E2 ve PROG için çok düşük konsantrasyonlarda (0.01nM) ya da PROG için çok yüksek konsantrasyonlarda (1000nM) anlamlı bulunmamıştır. Test edilen her nöroaktif steroid için doz-cevap eğrileri çizilmiş ve en fazla etkinin sağlandığı konsantrasyonlar belirlenmiştir. Tespit edilen en etkin konsantrasyonlar E2 ve DHT için 100nM, PROG için de 250nM'dur ($p < 0.01$). Ortama tek başına etanol eklenmesi A2B5 ekspresyonu üzerine bir etkide bulunmamıştır.

Her üç nöroaktif steroid de nöral kök hücre serisi belirleyicisi olarak kabul edilen nestin ekspresyonunu azaltmıştır. Bu etki DHT için 1-250nM ($p < 0.01$), E2

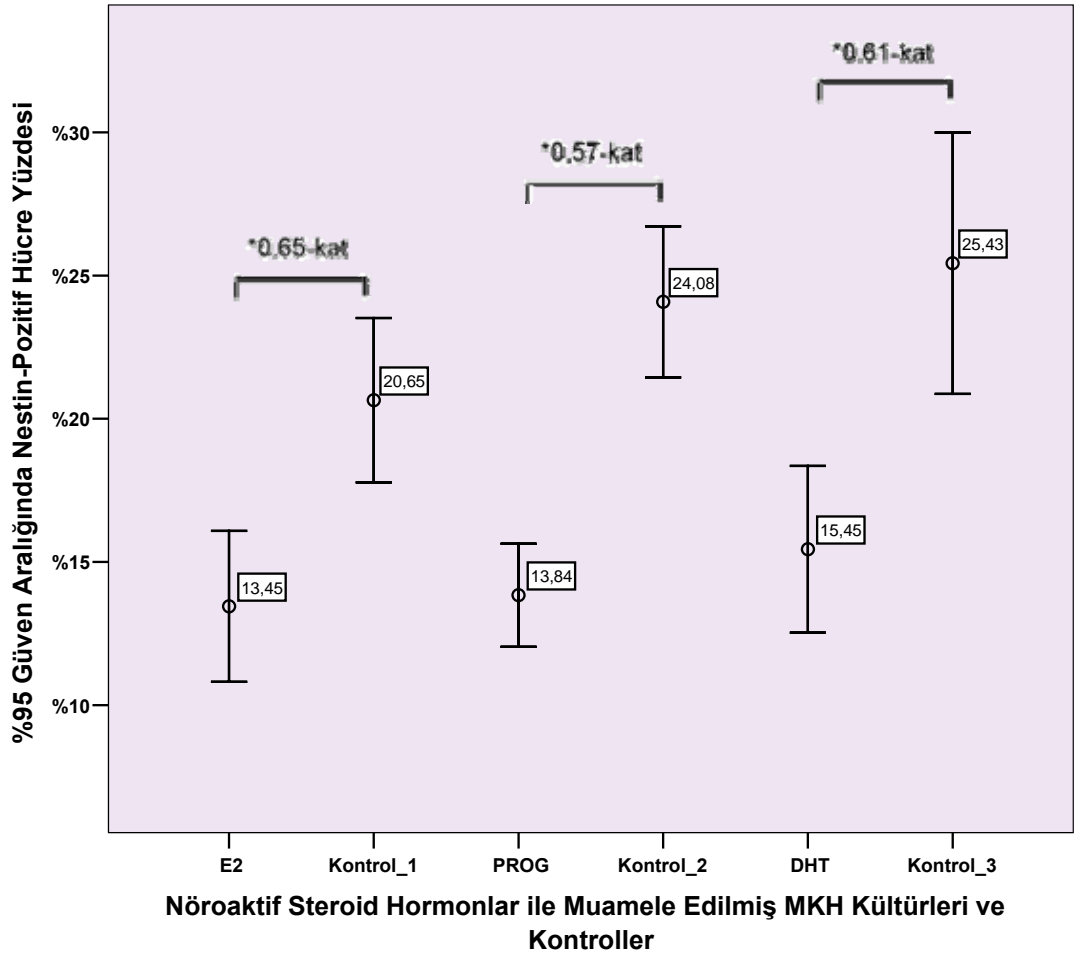
için 0.1-1000nM ($p<0.05$)ve PROG için ise tüm konsantrasyonlarda ($p<0.01$) kaydedilmiştir. Hücre kültürlerine tek başına etanol eklenmesi (%0.03) nestin ekspresyonu üzerine etkide bulunmamıştır.

Farklı steroid hormonların etkilerini karşılaştırabilmek amacıyla bir indeks değeri kullanılmıştır. Bu indeks değeri, her bir nöroaktif steroid ile muamele edilmiş kültürlerdeki ortalama A2B5(ya da nestin)-pozitif hücre sayısının, standart solüsyonla muamele edilmiş kontrol kültürlerindeki ortalama A2B5(ya da nestin)-pozitif hücre sayısına olan oranı kullanılarak hesaplanmıştır.

A2B5 ekspresyonunu test edilen en etkin konsantrasyonlarda, E2 2.5 kez, PROG 2.2 kez ve DHT de 4.8 kez arttırmıştır (Şekil 4.4.1). Diğer yandan, E2, PROG ve DHT nestin ekspresyonunda sırasıyla 0.65 kez, 0.57 kez ve 0.61 kez azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.4.2).

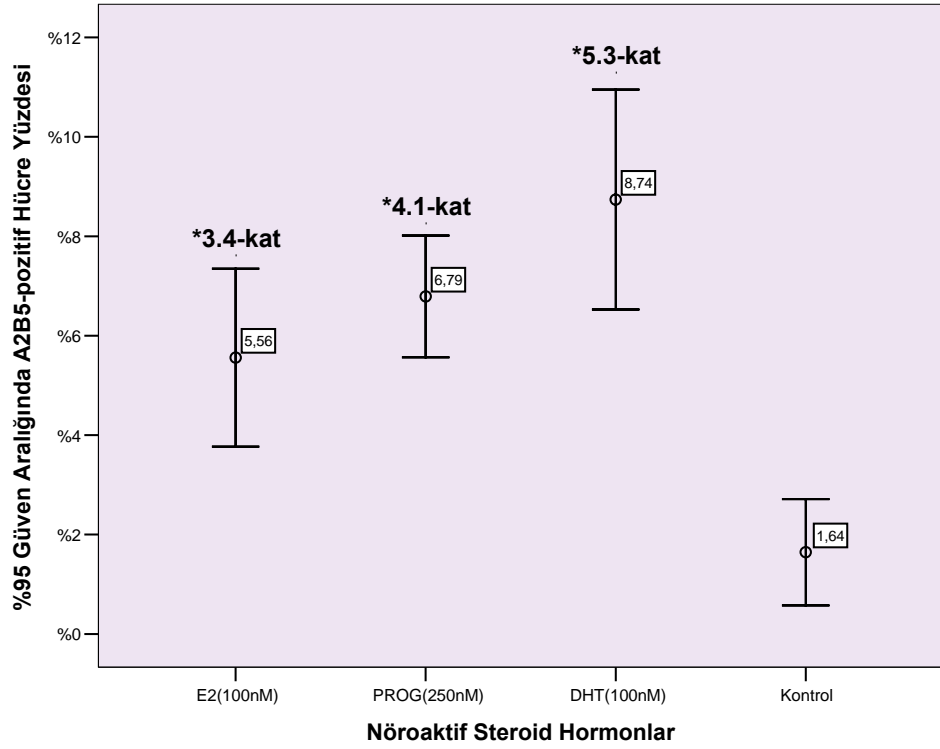


Şekil 4.4.1. En etkin konsantrasyonlarda nöroaktif steroidlerin A2B5 ekspresyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması

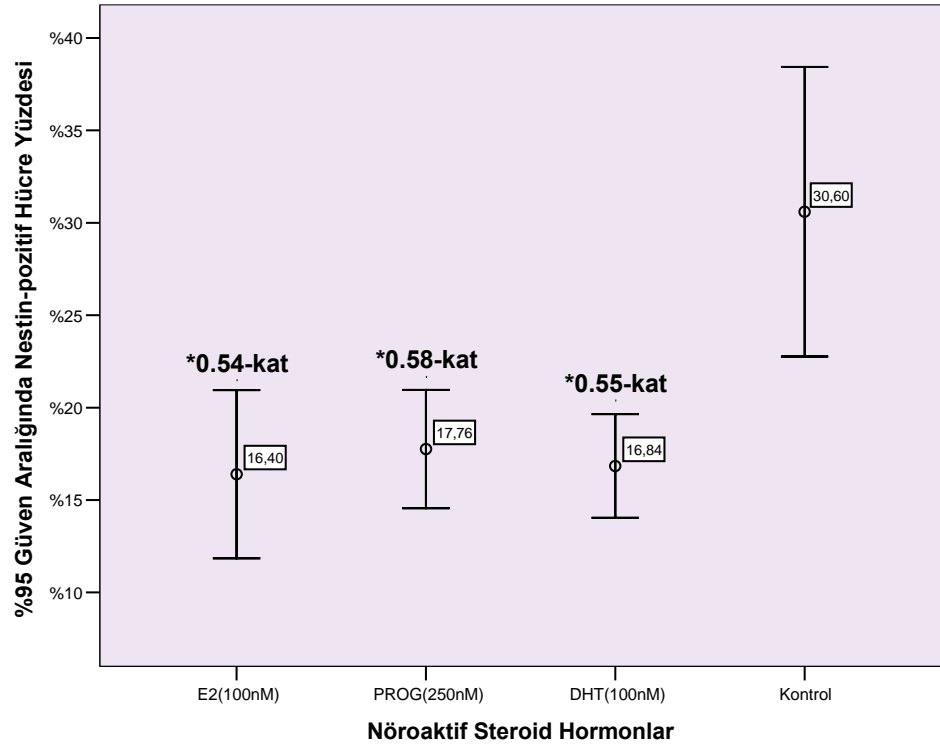


Şekil 4.4.2. En etkin konsantrasyonlarda nöroaktif steroidlerin nestin ekspresyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması

Belirlenen etkin konsantrasyonlar daha sonra ikinci bir erkek vericiden ve bir kadın vericiden alınan MKHler üzerinde de incelenmiştir. İkinci erkek vericiden alınan MKHlerde de elde edilen sonuçlar birinci örnektekini tekrarlamıştır. Nöroaktif steroidlerle muamele edilen kültürlerde E2, PROG ve DHT, A2B5 ekspresyonunu sırasıyla 3.4 kez, 4.1 kez ve 5.3 kez artırırken (Şekil 4.4.3), nestin ekspresyonunu da sırasıyla 0.54 kez, 0.58 kez ve 0.55 kez azaltmıştır (Şekil 4.4.4).

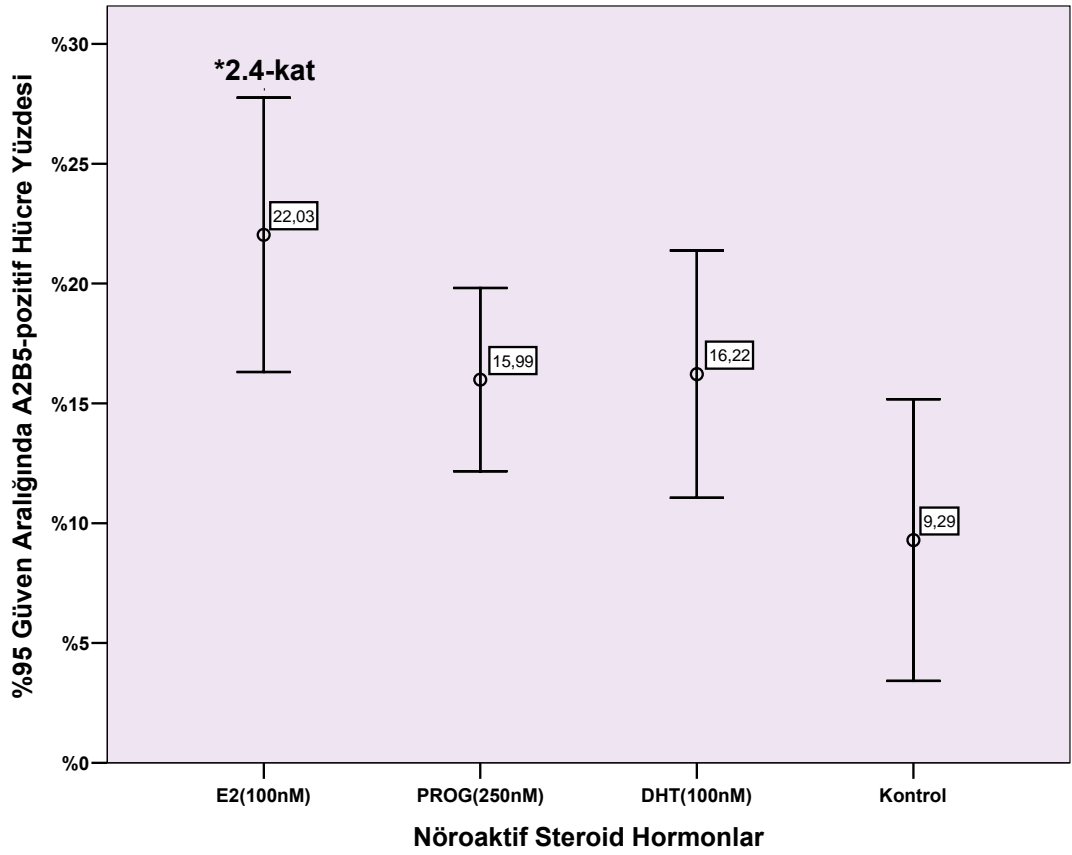


Şekil 4.4.3. İkinci erkek vericiden alınan MKHlerde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda A2B5 üzerine olan etkileri

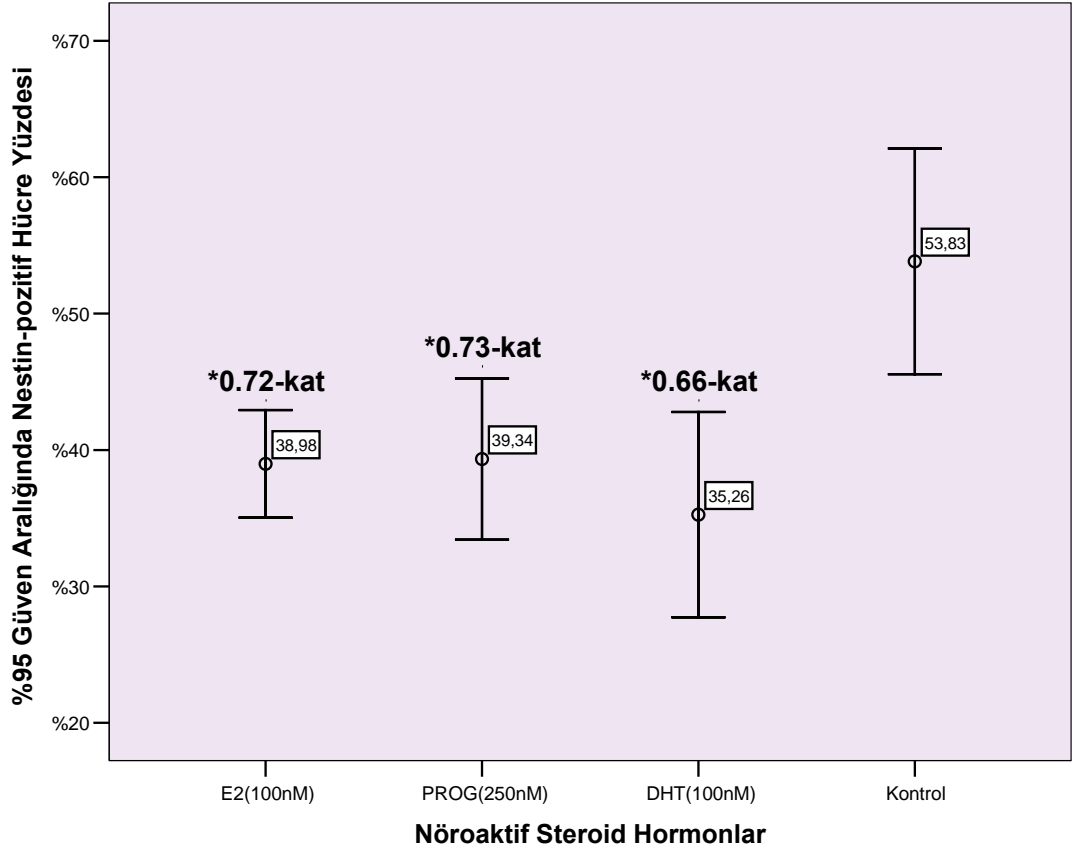


Şekil 4.4.4. İkinci erkek vericiden alınan MKHlerde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda Nestin üzerine olan etkileri

Kadın vericiden alınan MKHlerde ise hormon etkisi altındaki kültürlerde sadece 100nM E2 varlığında A2B5 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir (2.4 kez) (Şekil 4.4.5). E2, PROG ve DHT, kadın MKHlerde de nestin ekspresyonunu 0.72 kez, 0.73 kez ve 0.66 kez azaltmıştır (Şekil 4.4.6).



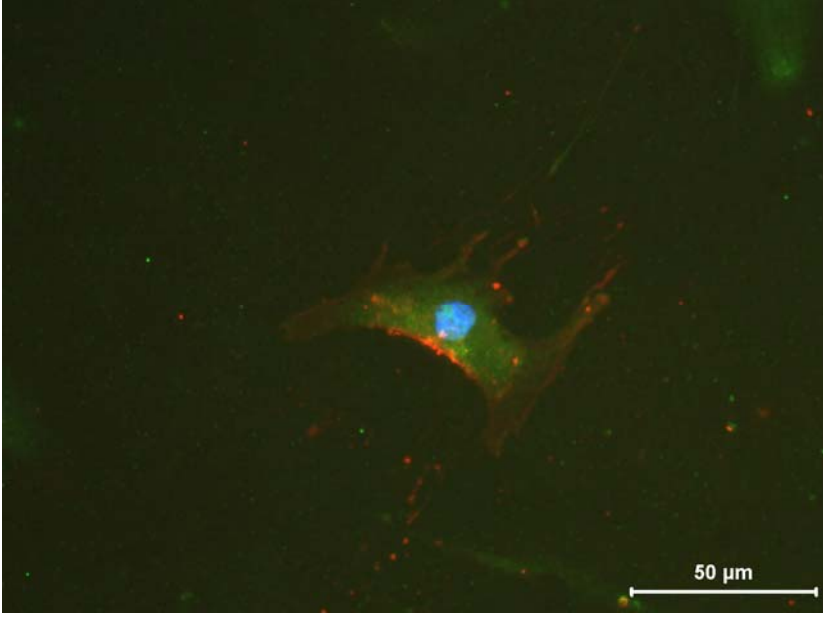
Şekil 4.4.5. Kadın MKHlerinde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda A2B5 üzerine olan etkileri



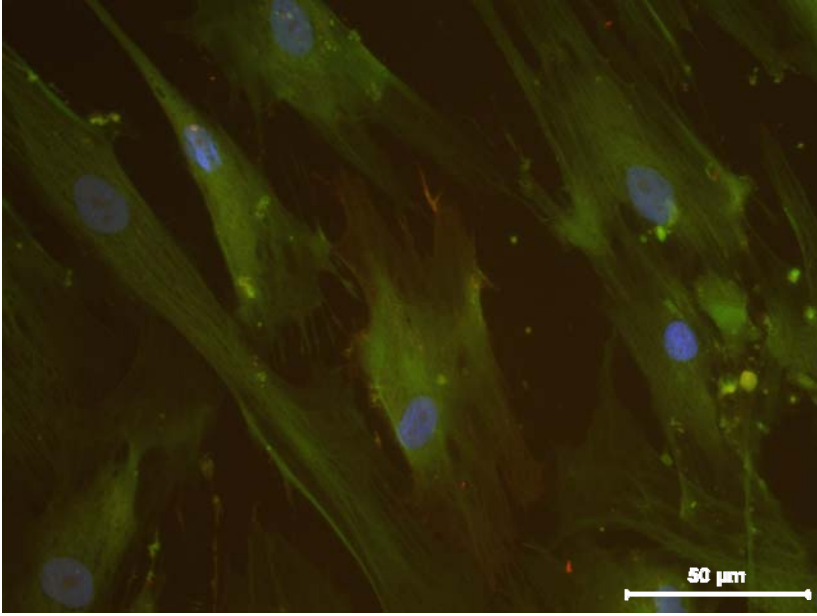
Şekil 4.4.6. Kadın MKHlerinde nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarda Nestin üzerine olan etkileri

4.5. İkili İşaretleme Yöntemi ile Steroid Hormon Reseptörleri ve A2B5 Ekspresyonunun Birlikte Gösterilmesi

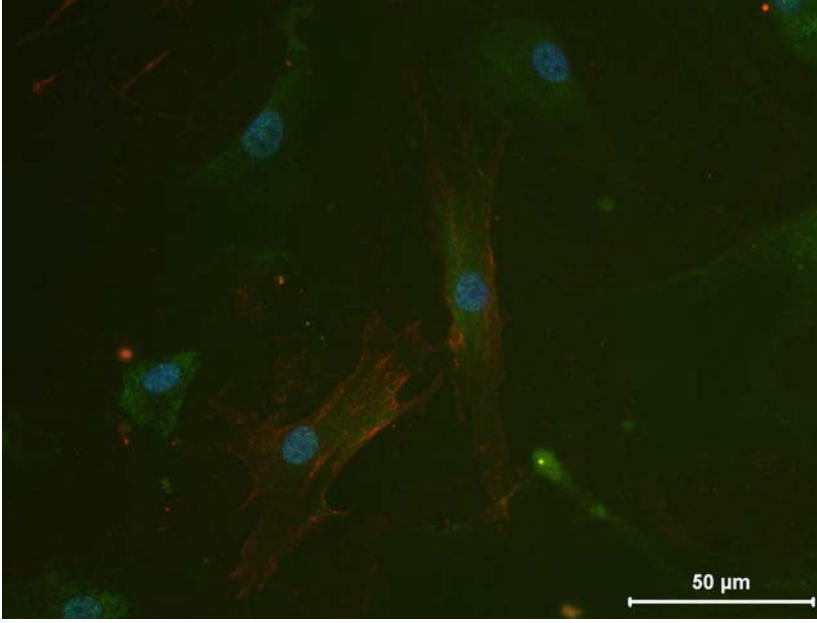
Nöroaktif steroidler ile muamele edilen hücrelerde ilgili reseptör dağılımı açısından fark gözlenmemiş ve A2B5 ile ko-ekspresyonu açısından da bakılmıştır (Şekiller 4.5.1 - 4.5.4). Tüm hücrelerin hormonla maruz bırakılmadan öncesine benzer şekilde reseptör dağılımı gösterdiği izlenmiştir.



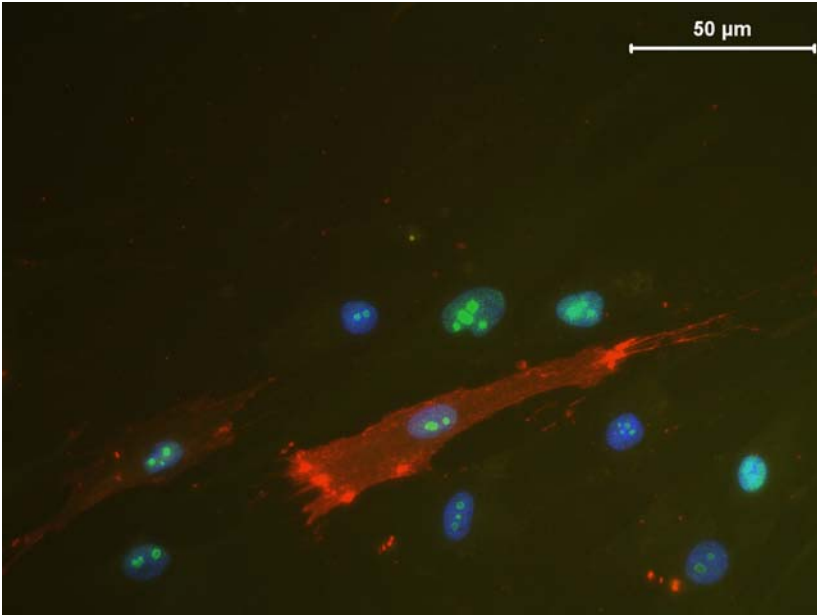
Şekil 4.5.1. İkili işaretleme ile ER α ve A2B5 ekspresyonu
(yeşil:ER α , kırmızı:A2B5, mavi:Hoescht)



Şekil 4.5.2. İkili işaretleme ile ER β ve A2B5 ekspresyonu
(yeşil:ER β , kırmızı:A2B5, mavi:Hoescht)



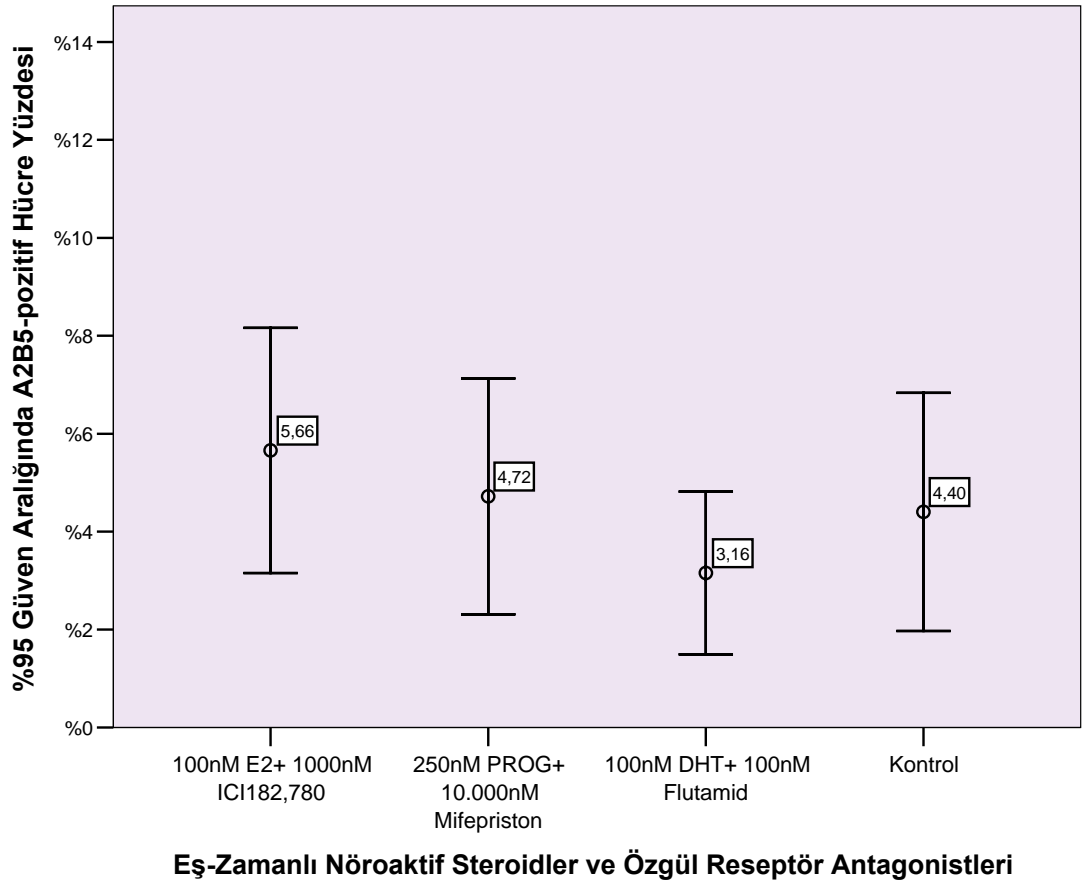
Şekil 4.5.3. İkili işaretleme ile PR ve A2B5 ekspresyonu
(yeşil:PR, kırmızı:A2B5, mavi:Hoescht)



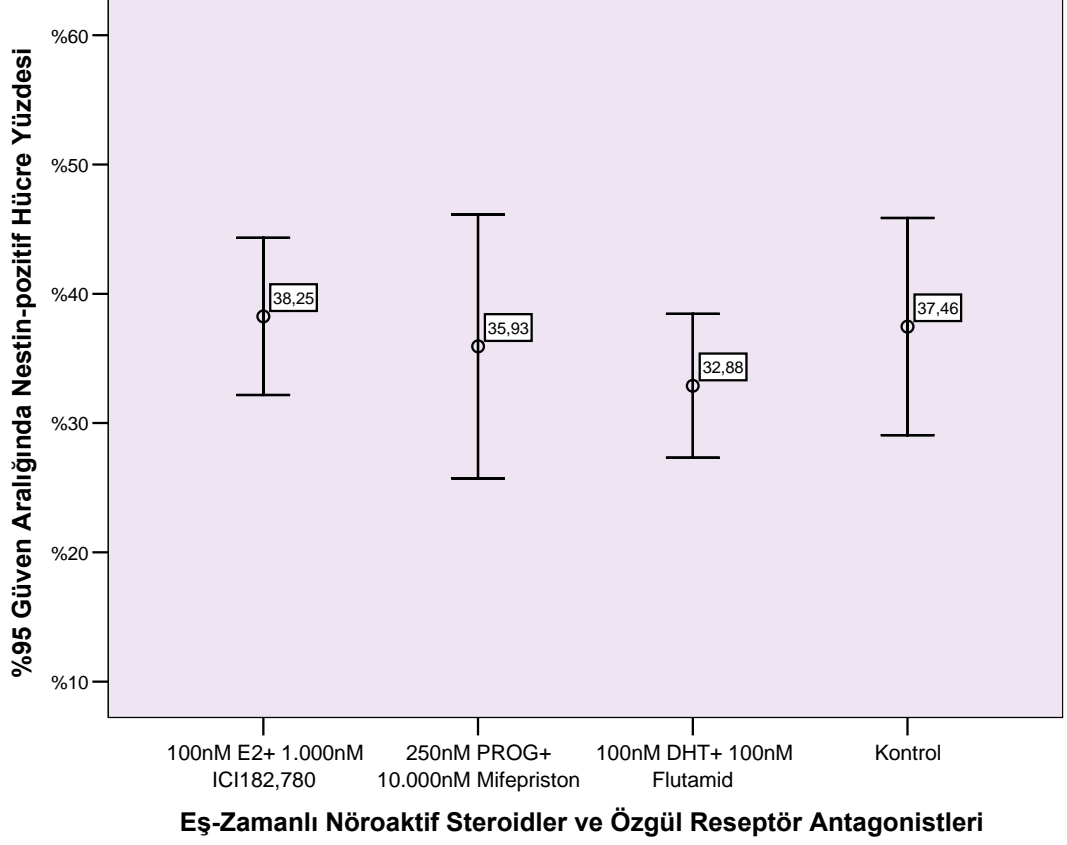
Şekil 4.5.4. İkili işaretleme ile AR ve A2B5 ekspresyonu
(yeşil:AR, kırmızı:A2B5, mavi:Hoescht)

4.6. Eş-zamanlı Nöroaktif steroid ve Özgül Reseptör Antagonisti Uygulanması Farklılaşma Etkisini Önlemektedir

Özgül reseptör antagonistlerinin ICI 182,780, mifepriston ve flutamid'in sırasıyla E2, PROG ve DHT ile birlikte MKHlere uygulanması neticesinde önceki deneylerle tespit edilen farklılaşmayı arttırıcı etki gözlenmemiştir. Yedinci günde, ortamdaki A2B5 (Şekil 4.6.1) ve nestin (Şekil 4.6.2) pozitif hücre sayılarının kontrol kültürlerindeki hücre sayılarından farklı olmadığı saptanmıştır. Bu bulgu, nöroaktif steroidlerin etkilerini ilgili steroid reseptörleri üzerlerinden gerçekleştiğini ve ER α , ER β , PR ve AR'nin MKHlerin oligodendroglial farklılaşması üzerinde işlevsel görevleri olduğuna işaret etmektedir.



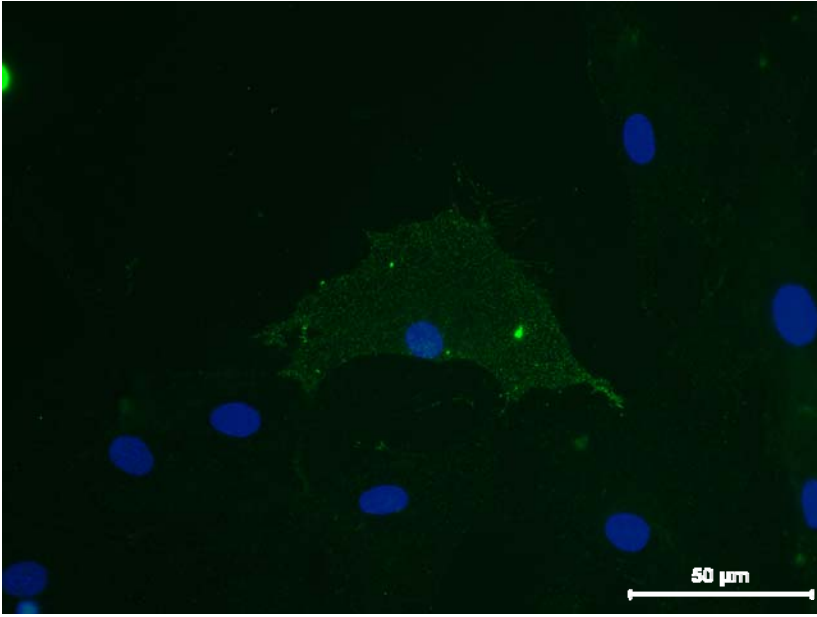
Şekil 4.6.1. Özgül reseptör antagonisti ve nöroaktif steroidlerin eş-zamanlı uygulanması_A2B5 üzerine olan etki (p>0.05)



Şekil 4.6.2. Özgül reseptör antagonisti ve nöroaktif steroidlerin eş-zamanlı uygulanması_Nestin üzerine olan etki ($p>0.05$)

4.7. Diğer Oligodendrosit Öncül Hücre Belirleyicilerinin Ekspresyonu

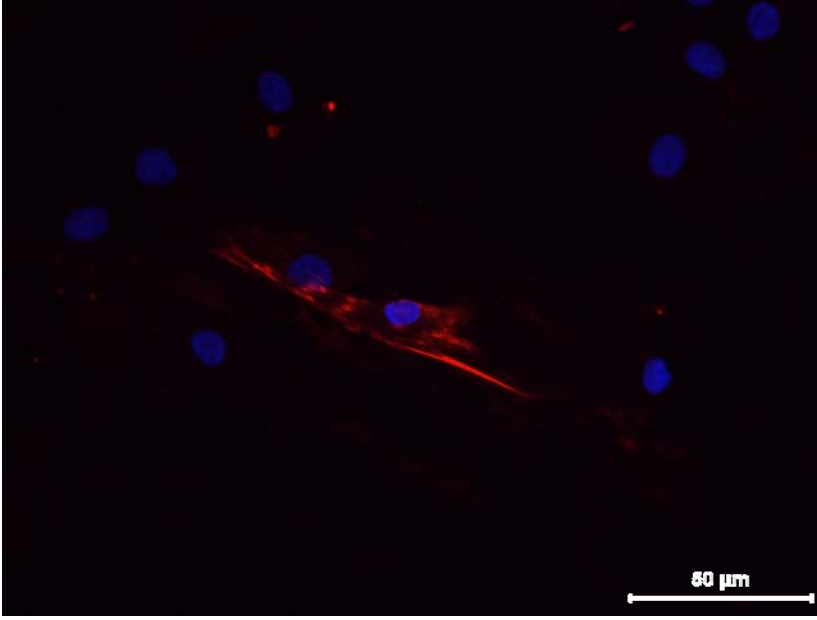
Nöroaktif steroidlerin etkin konsantrasyonlarında (100nM E2, 250nM PROG ve 100nM DHT) yedi günlük sürenin sonunda MKHler, diğer alternatif oligodendrosit öncül hücre belirleyicileri olarak kabul edilen PDGF α R, NG2 ve O4 ekspresyonu açısından da incelenmiştir. Hormon etkisi altında bırakılan hücrelerde PDGF α R ekspresyonunun arttığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaşmadığı görülmüştür (Şekil 4.7.1). Beklenmedik bir şekilde, tüm hücrelerin NG2 antikoları ile pozitif boyanma göstermiştir.



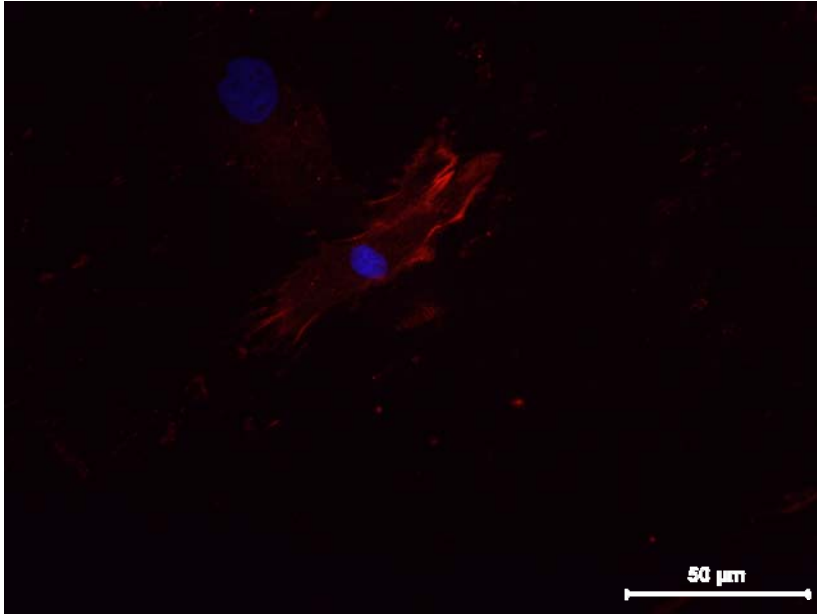
Şekil 4.7.1. DHT uygulanmış erkek MKHlerinde PDGF α -R ekspresyonu
(yeşil: PDGF α R, mavi: Hoescht)

İlginç olarak, 100nM DHT etkisi altında bırakılan erkek verici kaynaklı MKHleri O4 antikoları ile boyandığında, üç *coverslipten* sadece 1 tanesinde tek bir pozitif hücre varlığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.7.2). Aynı şekilde E2 etkisi altındaki

hücreler arasında da tek bir hücrenin O4 antikorları ile boyanmış olması ilginç bir bulgu olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.7.3).



Şekil 4.7.2. DHT uygulanmış erkek MKHlerinde O4 ekspresyonu
(kırmızı: O4, mavi:Hoescht)

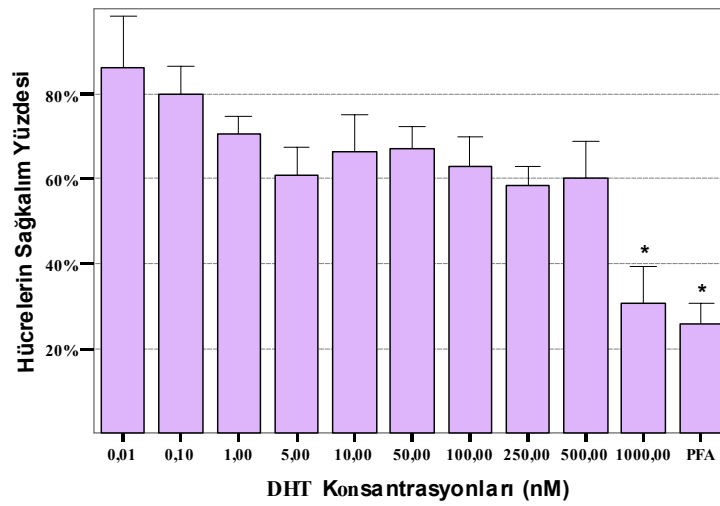
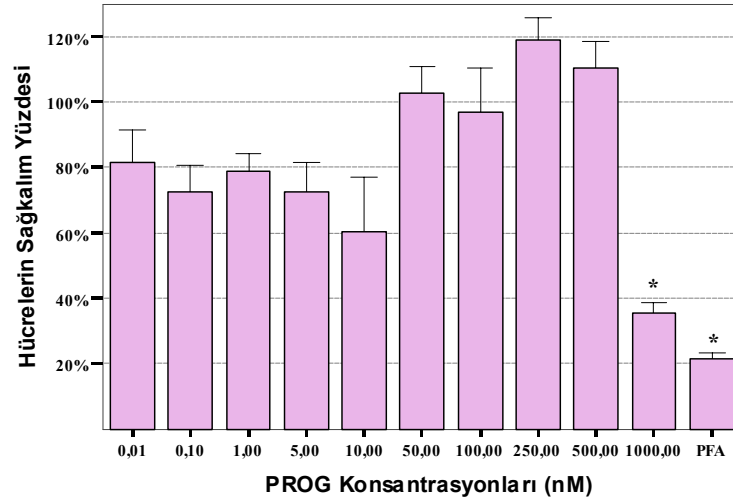
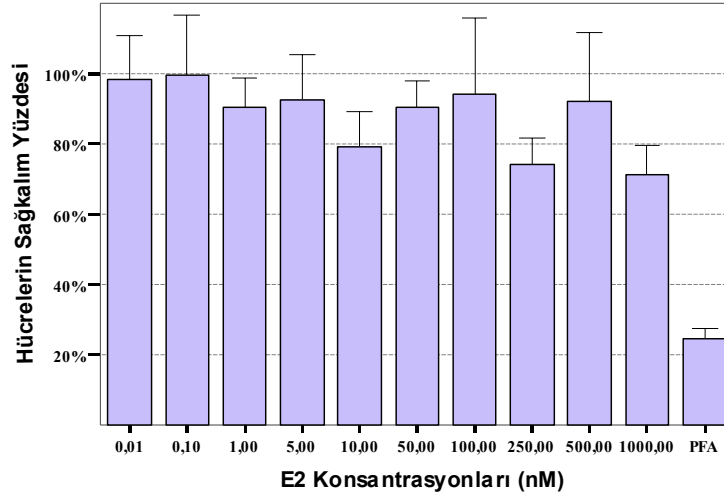


Şekil 4.7.3. E2 uygulanmış erkek MKHlerinde O4 ekspresyonu
(kırmızı:O4, mavi:Hoescht)

4.8. Nöroaktif steroid Hormonlar Yüksek Konsantrasyonlarda MKHler Üzerine Ölümcül Etkide Bulunmaktadır

MTT testi ile bakıldığında her üç nöroaktif steroidin de yüksek konsantrasyonlara çıkıldığında erişkin insan MKHlerin sayılarında azalmaya neden oldukları görülmüştür. PROG ve DHT'nin 1000nM ve üzerlerindeki konsantrasyonlarda hücreler üzerine paraformaldehit uygulanmasına benzer şekilde belirgin hücre ölümü ile sonuçlanan toksik etki gösterdikleri tespit edilmiştir.

E2'nin yüksek dozları hücre sayılarında azalmaya neden olmuş ancak bu azalma PFA etkisi kadar ölümcül olmamış ve PFA etkisi ile karşılaştırıldığında toksik etki açısından anlamlı bir benzerlik saptanmamıştır (Şekil 4.8.1).



Şekil 4.8.1. MTT hücre sağkalım testi sonuçları

(*: istatistiksel olarak anlamlı fark yok)

5. TARTIŞMA

Günümüzde MS tedavisinde üç temel stratejik hedef vardır. Birincisi, atak hızını ve inflamasyonu azaltmak; ikincisi, beyin dokusunu dejenerasyondan korumak; üçüncüsü de, hasar görmüş miyelin dokusunu, nöronal bütünlüğü koruyarak, yeni ve fonksiyonel miyelin kılıfları oluşturmak suretiyle tamir etmektir.

MS'de spontan remiyelinizasyon olduğu 1965'ten beri bilinmektedir (33). Fakat problem, hastalıkta bu mekanizmanın gerektiği kadar etkin işleyememesidir. Remiyelinizasyon süreci için çok sayıda öncül hücreye ve yeterli yoğunlukta uyarıcı ve destekleyici sinyale gereksinim vardır. Sorunun, remiyelinizasyon için gerekli hücrelerin (OLG, OPC vb.) ortamda olmaması değil, elimizdeki bilgiler ışığında mekanizmanın işlemesi için gerekli sinyallerin yetersizliği olduğu düşünülmektedir. Bu sinyallerin neler olduğunu tespit etmek yıllardır, remiyelinizasyon üzerine yapılan çalışmaların en temel hedefini oluşturmaktadır.

Kök hücre tedavileri taşıdıkları birçok etik, genetik ve yönetsel sorunların dışında, bir grup hastalıkta eksojen hücre desteği sağlayabileceği için son yıllarda ilgi odağı olmuştur. Mezenkimal kök hücreleri erişkin kaynaklı olması, kolay elde edilebilir ve kolay işlenebilir olması dolayısıyla öne çıkmaktadır. MKHlerin remiyelinizasyon mekanizmasına hem salgıladıkları lokal trofik faktörler hem de bizzat öncül hücrelere farklılaşma suretiyle katkıda bulunabilecekleri öne sürülmüştür (34-37).

MS'de hem hastalık insidansı hem de prevalansı kadınlarda erkeklere oranla iki kat fazladır (2). Diğer yardımcı T hücre Tip-1 (Th-1) aracılı otoimmün hastalıklar, (romatoid artrit, psöriazis, otoimmün tiroidit vb.) gibi kadınlarda daha baskın halde izlenmektedir. Buna karşın, erkeklerde MS hastalığının fenotipi daha ağır seyretmekte, özür lülüğün daha erken ve ağır olduğu primer progresif seyir ile daha çok karşılaşılmaktadır (99).

MS ve bu hastalığın kabul edilen hayvan modeli olan deneysel allerjik ensefalomyelit (DEA)'te hipotalamo-hipofizer-gonadal hormon döngüsünde bozulma ve cinsiyet hormon düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, MS hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha düşük östron sülfat düzeyleri saptanmıştır ancak bu durum ile hastalık şiddeti arasında korelasyon bulunmamıştır (100). DAE geliştirilmiş erkek farelerde ve erkek MS hastalarında serum testosteron düzeyleri düşük tespit edilmiştir (101). Gebelikte östrojenler vücut bağışıklık sistemde Th1'den Th2'ye kayma sağlayarak MS aktivitesini düzenlemektedir (102, 103). Gebelikte vücutta baskın östrojen olan östriol ile tedavi uygulanması, *relapsing-remitting* MS hastalarında aktif lezyon sayısında geçici olarak azalma sağlamaktadır (104). Benzer etki DAE modelinde de gözlenmiştir. Gebelik, DAE modelinde hem hastalık başlama zamanını (105), hem de atakları baskılamaktadır (106). Dahası, gonadektomi yapılması cinsiyetten bağımsız olarak DAE modelinde hastalık seyrini şiddetlendirmektedir (107, 108); diğer yandan östrojen ya da androjen ile tedavi uygulanması ise hastalığı hafifletmektedir (109-112).

Çalışmada kullanılan nöroaktif steroid hormonlar lipofilik yapıları dolayısıyla kan-beyin-bariyerinden kolaylıkla geçebilmekte ve periferik konsantrasyonları beyindeki konsantrasyonlarını etkileyebilmektedir. Ancak bu hormonlar *de novo* sentezlenebildiği için serum düzeylerinin beyindeki varlıklarını ya da miktarlarını yansıtması şart değildir. Steroid hormon miktarlarının beyinde bölgesel olarak farklılık gösterdiği, dolayısıyla da bu hormonların lokal sentezlerinde de değişkenlik olabileceği bildirilmiştir (113, 114). Tüm bu sebeplerden dolayı, beyin ya da serum düzeylerindeki değişikliklerin otoimmün aracılı hastalıkların klinik seyri üzerine etkide bulunması muhtemeldir.

Bu çalışmada MKHler kültür ortamı içinde oligodendroglial farklılaşma yönünde artış sağlayacak herhangi bir indüksiyon serumuna maruz bırakılmadan yalnızca steroid hormon varlığında incelenmişlerdir. Dolayısıyla elde edilen verilerde steroid hormonlarına bağlı değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

MKHler, uygun birkaç günlük kültür ortamı şartlarında inkübasyonu takiben spontan olarak düşük oranlarda Nestin ve çok düşük oranlarda A2B5 ekspresyonu göstermektedirler. Oligodendroglial farklılaşma sırasında hücrelerin eksprese ettikleri belirleyiciler ve dönemler Şekil. 2.3.1’de gösterilmiştir. Nestin, farklılaşma yolunun çok başında olan ve henüz farklı hücre fenotiplere dönüşme potansiyeli taşıyan hücrelerin eksprese ettikleri bir hücre içi yapısal proteindir. A2B5 ise, oligodendrosit farklılaşma yolağına daha özgül, ancak yine farklılaşmanın erken evrelerinde eksprese edilen bir yüzey belirleyicisidir. Aynı hücrenin hem Nestin, hem A2B5 taşıyor olması da, hücrenin bu iki belirleyiciyi de birlikte eksprese ettiği, kısa geçiş döneminde olduğunu düşündürmektedir. Bu şekilde her iki belirleyiciyi de eksprese eden hücre sayısı oldukça azdır. Ne yazık ki, çalışma sırasında kullanılan immünohistokimyasal boyama yöntemi ile aynı hücrede Nestin varlığı azalırken, A2B5 ekspresyonunun artışı göstermek teknik nedenlerle mümkün değildir. Böyle bir veri elbette ki, hipoteze daha güçlü bir destek sağlayacaktı.

Çalışma sırasında farklılaşmanın daha ileri evrelerindeki alternatif belirleyicilere de bakılmış ve istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan PDGF α R ekspresyonu artışı ile, ilginç olarak iki hücrede O4 pozitifliği saptanmıştır. Yalnızca iki hücrede O4 ekspresyonu izlenmiş olması, bu sonucu hipotezi destekler tarzda yorumlamayı güç kılıyor olsa da, yine de düşündürücü ve ümitlendirici olarak kabul edilmiştir. Bu sonuç, hormonlara maruz bırakılma süresinin kısalığı (7 gün) ya da indüksiyon serumlarının kullanılmamış olmasına bağlanabilir. Farklılaşmanın erken-orta evresinde eksprese olması beklenen NG2 antikoru ile tüm hücrelerin pozitif boyanma göstermiş olması, bu belirleyicinin perivasküler hücreler tarafından da yüksek yoğunlukta eksprese edilmesi ile açıklanabilir. Kullanılan kök hücrelerin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler olması bu belirleyicinin anlamlı netice vermesine engel teşkil etmiştir.

MKHler çalışmada kullanılan nöroaktif steroid hormonların reseptörlerinin varlığı açısından ilgili antikoru ile boyanmış ve tüm hücrelerin E2, PROG ve DHT

reseptörlerini taşıdıkları tespit edilmiştir. Reseptörlerin, ilgili hormonlarla muameleyi takiben, hormonların uyarısı neticesinde *down-regülasyon*, *up-regülasyon* ya da *translokasyon* nedeniyle hücre içi dağılım ve yoğunluğunda değişme olabileceği göz önünde bulundurularak, hücreler hormon etkilerine maruz bırakıldıktan sonra tekrar reseptör dağılımı açısından incelenmiştir. Bu değişime immünfloresan mikroskop altında gözlem yapılarak bakılmış ve yine tüm hücrelerin, hormona maruz bırakılmadan önceki dağılımda ve yoğunlukta reseptörleri eksprese ettikleri gözlemlenmiştir. Hormonların etkisiyle A2B5 ekspresyonunun arttığı hücrelerde de, ilgili reseptörlerin dağılımı ve yoğunluğu açısından değişim kaydedilmemiştir.

Bu çalışma neticesinde elde edilen ve ilk kez bildirilen en önemli bulgu, MKHlerin nöroaktif steroidlerin etkisine duyarlı olduğu ve herhangi bir induksiyon ortamı kullanılmadığı halde MKHlerin nöroaktif steroidlerin varlığında nöroektodermal farklılaşma yolunda ilk adımları attığıdır. Erkek vericiden elde edilen MKHlerin daha yüksek oranda DHT'ye, kadın vericiden elde edilen MKHlerin ise östrojene daha fazla oranlarda yanıt vermiş olması da hem fizyolojik hem de klinik açıdan önemlidir.

PROG ve DHT hormonlarının 1000nM gibi yüksek dozlarına çıkıldığında hücrelere PFA uygulanmasına benzer ölümcül etkide bulunduğu görülmüştür. PROG, dozun artmasıyla birlikte hücre sayılarında bir miktar artışa neden olsa da 1000nM dozda toksik etki göstermekte ve yaşayan hücre sayısını fazlasıyla azaltmaktadır. DHT de doz artışı ile birlikte hücre sayılarında azalmaya yol açmakta ve 1000nM dozda toksik etki göstermektedir. E2'nin yüksek dozlarına çıkılmasıyla birlikte hücre sayılarında azalma olmakta ama bu etki toksik değerlere ulaşmamaktadır. Bu bulgular ışığında nörosteroid hormonların uygun dozlarda uygulanmasının önemi açığa çıkmaktadır. Nöroaktif steroid hormonlar, maksimal etkin dozların (E2:100nM, PROG:250nM, DHT:100nM) çok üzerindeki yüksek dozlarda (1000nM) hücrelerin farklılaşma sürecine katkı sağlamadığı gibi yaşamsal fonksiyonlarını da bozup, toksik etki göstermektedirler.

Sonuçlar, oldukça erken ve ilerideki çalışmalar ile desteklenmesi gereken bulgular sunmakta ise de, elde edilen verilerin, klinik seyir sırasında izlenen remiyelinizasyon sürecini hızlandırmak ve destek vermek amacı ile ve MKH tedavilerinin geliştirilmesinde hem klinisyenlere, hem de araştırmacılara değerli katkılarda bulunacağı inancındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Özetle, multipl sklerozun klinik seyrini inceleyen çalışmalar ve miyelinizasyon biyolojisi hakkında bilinenler ışığında, kadın cinsiyet hormonlarının MS seyrini hafifletici etkiye sahip olduğu ve SSS'de miyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecindeki glial hücreler üzerine de olumlu etkileri olduğu görülmektedir. Bu bulgu bazı araştırmacıların da dikkatini çekmiştir (12, 115)

Bu çalışmanın bulguları, nöroaktif steroidlerin hücre farklılaşmasında sahip oldukları görevin aydınlatılmasında daha da faydalı olacaktır. Elde edilen veriler, erişkin mezenkimal kök hücrelerinin nöroaktif steroidlere duyarlı olduğuna, nöroaktif steroidlerin nestin ekspresyonunu, dolayısıyla da hücre çoğalmasını, azalttığını ve oligodendroglial farklılaşmayı arttırdığına işaret eden ilk kanıtları ortaya koymaktadır. Bu gözlemler, nöroaktif steroidlerin hastalığın remiyelinizasyon sürecini hızlandırmak amacıyla tedavi olarak da kullanılabilir. Dahası, gelecekte kök hücre tedavilerinin geliştirilmesi hakkındaki bilgiler artıp derinleştikçe, mevcut nöroaktif steroidlerin kök hücre onarım tedavilerini destekleyici ve hızlandırıcı olarak kullanımının gündeme gelmesine yardımcı olabilir.

Ancak bu çalışmadan ortaya çıkan ve dikkat edilecek bir diğer önemli nokta ise, nöroaktif steroidlerin, özellikle PROG ve DHT, yüksek dozlarda toksik etkiye sahip olduklarıdır. Bu da, uygunsuz ve fizyolojik dozun çok üzerinde kullanılacak hormonların, onarım mekanizmalarına ve doğal işleyişe olumlu katkıda bulunmanın ötesinde, SSS rejenerasyonuna hasar verebileceği olasılığını düşündürmektedir.

Remiyelinizasyon işleyişini hızlandırmak önemli olduğu kadar ilginç ve gerçekçi bir tedavi hedefidir. Mekanizmanın işleyişindeki eksiklikler ve hatalar anlaşıldıkça, etkin tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve bunların klinikte uygulanması mümkün hale gelecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B. G. Multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 2000; **343** :938-952.
2. Duquette, P., Pleines, J., Girard, M., Charest, L., Senecal-Quevillon, M., and Masse, C. The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can.J.Neurol.Sci.* 1992; **19** :466-471.
3. Haliloglu, G., Anlar, B., Aysun, S., Topcu, M., Topaloglu, H., Turanli, G., and Yalnizoglu, D. Gender prevalence in childhood multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J.Child Neurol.* 2002; **17** :390-392.
4. Dubrovsky, B. O. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 2005; **29** :169-192.
5. Melcangi, R. C. and Panzica, G. C. Neuroactive steroids: old players in a new game. *Neuroscience* 2006; **138** :733-739.
6. Hojo, Y., Hattori, T. A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H. T., Mukai, H., Morrison, J. H., Janssen, W. G., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T., and Kawato, S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; **101** :865-870.
7. Murakami, G., Tanabe, N., Ishii, H. T., Ogiue-Ikeda, M., Tsurugizawa, T., Mukai, H., Hojo, Y., Takata, N., Furukawa, A., Kimoto, T., and Kawato, S. Role of cytochrome p450 in synaptocrinology: endogenous estrogen synthesis in the brain hippocampus. *Drug Metab Rev.* 2006; **38** :353-369.
8. Baulieu, E. E. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 1998; **23** :963-987.
9. Mellon, S. H. and Griffin, L. D. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol.Metab* 2002; **13** :35-43.
10. Stoffel-Wagner, B. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003; **1007** :64-78.
11. Plassart-Schiess, E. and Baulieu, E. E. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2001; **37** :133-140.
12. Baulieu, E. and Schumacher, M. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* 2000; **65** :605-612.
13. Ghomari, A. M., Ibanez, C., El Etr, M., Leclerc, P., Eychenne, B., O'Malley, B. W., Baulieu, E. E., and Schumacher, M. Progesterone and its metabolites

- increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J.Neurochem.* 2003; **86** :848-859.
14. Guzman, C. B., Deighton-Collins, S., Martinez, A., Kleerekoper, M., Zhao, C., Benjamins, J. A., and Skafar, D. F. Activity of estradiol and selective estrogen receptor modulators in the mouse N20.1 oligodendrocyte/astrocytes cell line. *Neuro.Endocrinol.Lett.* 2005; **26** :526-532.
 15. Marin-Husstege, M., Muggironi, M., Raban, D., Skoff, R. P., and Casaccia-Bonnel, P. Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones. *Dev.Neurosci.* 2004; **26** :245-254.
 16. Gago, N., Akwa, Y., Sananes, N., Guennoun, R., Baulieu, E. E., El Etr, M., and Schumacher, M. Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia* 2001; **36** :295-308.
 17. Gago, N., El Etr, M., Sananes, N., Cadepond, F., Samuel, D., Avellana-Adalid, V., Baron-Van Evercooren, A., and Schumacher, M. 3alpha,5alpha-Tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) and gamma-aminobutyric acid: autocrine/paracrine interactions in the control of neonatal PSA-NCAM+ progenitor proliferation. *J.Neurosci.Res.* 2004; **78** :770-783.
 18. Suzuki, M., Wright, L. S., Marwah, P., Lardy, H. A., and Svendsen, C. N. Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; **101** :3202-3207.
 19. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284** :143-147.
 20. Lagasse, E., Connors, H., Al Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., and Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat.Med.* 2000; **6** :1229-1234.
 21. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; **279** :1528-1530.
 22. Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K., and Goodell, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J.Clin.Invest* 2001; **107** :1395-1402.
 23. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J.,

- Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418** :41-49.
24. Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., and McKay, R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; **418** :50-56.
 25. Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R., and Sanberg, P. R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp.Neurol.* 2000; **164** :247-256.
 26. Bonilla, S., Alarcon, P., Villaverde, R., Aparicio, P., Silva, A., and Martinez, S. Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain. *Eur.J.Neurosci.* 2002; **15** :575-582.
 27. Kocsis, J. D., Akiyama, Y., and Radtke, C. Neural precursors as a cell source to repair the demyelinated spinal cord. *J.Neurotrauma* 2004; **21** :441-449.
 28. Suzuki, H., Taguchi, T., Tanaka, H., Kataoka, H., Li, Z., Muramatsu, K., Gondo, T., and Kawai, S. Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004; **322** :918-922.
 29. Rice, C. M., Halfpenny, C. A., and Scolding, N. J. Stem cells for the treatment of neurological disease. *Transfus.Med.* 2003; **13** :351-361.
 30. Friedenstein, A. J. Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. *Acta Anat.(Basel)* 1961; **45** :31-59.
 31. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., and Black, I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J.Neurosci.Res.* 2000; **61** :364-370.
 32. Ollivier CP. *Traite de la moelle epiniere et de ses maladies.* Paris, Crevot, 1827: 1978 pp.
 33. Prineas, J. W. and Connell, F. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 1979; **5** :22-31.
 34. Stangel, M. and Hartung, H. P. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog.Neurobiol.* 2002; **68** :361-376.
 35. Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., and McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; **290** :1779-1782.

36. Lubetzki, C., Williams, A., and Stankoff, B. Promoting repair in multiple sclerosis: problems and prospects. *Curr.Opin.Neurol.* 2005; **18** :237-244.
37. Pluchino, S., Furlan, R., and Martino, G. Cell-based remyelinating therapies in multiple sclerosis: evidence from experimental studies. *Curr.Opin.Neurol.* 2004; **17** :247-255.
38. Lu, D., Mahmood, A., Wang, L., Li, Y., Lu, M., and Chopp, M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001; **12** :559-563.
39. Phinney, D. G. and Isakova, I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr.Pharm.Des* 2005; **11** :1255-1265.
40. Rice, C., Halfpenny, C., and Scolding, N. Cell therapy in demyelinating diseases. *NeuroRx.* 2004; **1** :415-423.
41. Decker, L., Avellana-Adalid, V., Nait-Oumesmar, B., Durbec, P., and Baron-Van Evercooren, A. Oligodendrocyte precursor migration and differentiation: combined effects of PSA residues, growth factors, and substrates. *Mol.Cell Neurosci.* 2000; **16** :422-439.
42. Grinspan, J. B. and Franceschini, B. Platelet-derived growth factor is a survival factor for PSA-NCAM+ oligodendrocyte pre-progenitor cells. *J.Neurosci.Res.* 1995; **41** :540-551.
43. Goldman, J. E., Hirano, M., Yu, R. K., and Seyfried, T. N. GD3 ganglioside is a glycolipid characteristic of immature neuroectodermal cells. *J.Neuroimmunol.* 1984; **7** :179-192.
44. Dietrich, J., Noble, M., and Mayer-Proschel, M. Characterization of A2B5+ glial precursor cells from cryopreserved human fetal brain progenitor cells. *Glia* 2002; **40** :65-77.
45. Wilson, H. C., Onischke, C., and Raine, C. S. Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia* 2003; **44** :153-165.
46. Ruffini, F., Arbour, N., Blain, M., Olivier, A., and Antel, J. P. Distinctive properties of human adult brain-derived myelin progenitor cells. *Am.J.Pathol.* 2004; **165** :2167-2175.
47. Wilson, H. C., Scolding, N. J., and Raine, C. S. Co-expression of PDGF alpha receptor and NG2 by oligodendrocyte precursors in human CNS and multiple sclerosis lesions. *J.Neuroimmunol.* 2006; **176** :162-173.

48. Compston, A., Zajicek, J., Sussman, J., Webb, A., Hall, G., Muir, D., Shaw, C., Wood, A., and Scolding, N. Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J.Anat.* 1997; **190 (Pt 2)** :161-200.
49. Robel, P., Synguelakis, M., Halberg, F., and Baulieu, E. E. [Persistence of the circadian rhythm of dehydroepiandrosterone in the brain, but not in the plasma, of castrated and adrenalectomized rats]. *C.R.Acad.Sci.III* 1986; **303** :235-238.
50. Robel, P., Bourreau, E., Corpechot, C., Dang, D. C., Halberg, F., Clarke, C., Haug, M., Schlegel, M. L., Synguelakis, M., Vourch, C., and . Neurosteroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain. *J.Steroid Biochem.* 1987; **27** :649-655.
51. Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjovall, J., and Baulieu, E. E. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1981; **78** :4704-4707.
52. Jung-Testas, I., Hu, Z. Y., Baulieu, E. E., and Robel, P. Steroid synthesis in rat brain cell cultures. *J.Steroid Biochem.* 1989; **34** :511-519.
53. Iwahashi, K., Ozaki, H. S., Tsubaki, M., Ohnishi, J., Takeuchi, Y., and Ichikawa, Y. Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P-450_{scc}-linked monooxygenase system in the adult rat brain. *Biochim.Biophys.Acta* 1990; **1035** :182-189.
54. Le Goascogne, C., Robel, P., Gouezou, M., Sananes, N., Baulieu, E. E., and Waterman, M. Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science* 1987; **237** :1212-1215.
55. Hu, Z. Y., Bourreau, E., Jung-Testas, I., Robel, P., and Baulieu, E. E. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987; **84** :8215-8219.
56. Sanne, J. L. and Krueger, K. E. Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J.Neurochem.* 1995; **65** :528-536.
57. Poletti, A., Celotti, F., Rumio, C., Rabuffetti, M., and Martini, L. Identification of type 1 5alpha-reductase in myelin membranes of male and female rat brain. *Mol.Cell Endocrinol.* 1997; **129** :181-190.
58. Schumacher, M., Akwa, Y., Guennoun, R., Robert, F., Labombarda, F., Desarnaud, F., Robel, P., De Nicola, A. F., and Baulieu, E. E. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J.Neurocytol.* 2000; **29** :307-326.

59. Rupprecht, R. and Holsboer, F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 1999; **22** :410-416.
60. Paul, S. M. and Purdy, R. H. Neuroactive steroids. *FASEB J.* 1992; **6** :2311-2322.
61. Lambert, J. J., Belelli, D., Hill-Venning, C., and Peters, J. A. Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol.Sci.* 1995; **16** :295-303.
62. Valera, S., Ballivet, M., and Bertrand, D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; **89** :9949-9953.
63. Bullock, A. E., Clark, A. L., Grady, S. R., Robinson, S. F., Slobe, B. S., Marks, M. J., and Collins, A. C. Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *J.Neurochem.* 1997; **68** :2412-2423.
64. Wu, F. S., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol.Pharmacol.* 1990; **37** :597-602.
65. Wetzel, C. H., Hermann, B., Behl, C., Pestel, E., Rammes, G., Zieglgansberger, W., Holsboer, F., and Rupprecht, R. Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol.Endocrinol.* 1998; **12** :1441-1451.
66. Weaver, C. E., Jr., Park-Chung, M., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* 1997; **761** :338-341.
67. Park-Chung, M., Wu, F. S., and Farb, D. H. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol.Pharmacol.* 1994; **46** :146-150.
68. Weaver, C. E., Jr., Marek, P., Park-Chung, M., Tam, S. W., and Farb, D. H. Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; **94** :10450-10454.
69. Wu, F. S., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol.Pharmacol.* 1991; **40** :333-336.
70. Bowlby, M. R. Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol.Pharmacol.* 1993; **43** :813-819.

71. Gu, Q. and Moss, R. L. 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J.Neurosci.* 1996; **16** :3620-3629.
72. Wu, F. S., Yu, H. M., and Tsai, J. J. Mechanism underlying potentiation by progesterone of the kainate-induced current in cultured neurons. *Brain Res.* 1998; **779** :354-358.
73. Grazzini, E., Guillon, G., Mouillac, B., and Zingg, H. H. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 1998; **392** :509-512.
74. Monnet, F. P., Mahe, V., Robel, P., and Baulieu, E. E. Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995; **92** :3774-3778.
75. Curry, J. J., III and Heim, L. M. Brain myelination after neonatal administration of oestradiol. *Nature* 1966; **209** :915-916.
76. Zhang, Z., Cerghet, M., Mullins, C., Williamson, M., Bessert, D., and Skoff, R. Comparison of in vivo and in vitro subcellular localization of estrogen receptors alpha and beta in oligodendrocytes. *J.Neurochem.* 2004; **89** :674-684.
77. Jung-Testas, I., Renoir, M., Bugnard, H., Greene, G. L., and Baulieu, E. E. Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1992; **41** :621-631.
78. Takao, T., Flint, N., Lee, L., Ying, X., Merrill, J., and Chandross, K. J. 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J.Neurochem.* 2004; **89** :660-673.
79. Zhang, Y., Tounekti, O., Akerman, B., Goodyer, C. G., and LeBlanc, A. 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *J.Neurosci.* 2001; **21** :RC176.
80. Pike, C. J. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J.Neurochem.* 1999; **72** :1552-1563.
81. Goodman, Y., Bruce, A. J., Cheng, B., and Mattson, M. P. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J.Neurochem.* 1996; **66** :1836-1844.
82. Behl, C., Widmann, M., Trapp, T., and Holsboer, F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995; **216** :473-482.

83. Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J., and Holsboer, F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol.Pharmacol.* 1997; **51** :535-541.
84. Chen, J., Chopp, M., and Li, Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J.Neurol.Sci.* 1999; **171** :24-30.
85. Thomas, A. J., Nockels, R. P., Pan, H. Q., Shaffrey, C. I., and Chopp, M. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* 1999; **24** :2134-2138.
86. Koenig, H. L., Schumacher, M., Ferzaz, B., Thi, A. N., Ressouches, A., Guennoun, R., Jung-Testas, I., Robel, P., Akwa, Y., and Baulieu, E. E. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 1995; **268** :1500-1503.
87. Koenig, H. L., Gong, W. H., and Pelissier, P. Role of progesterone in peripheral nerve repair. *Rev.Reprod.* 2000; **5** :189-199.
88. Jung-Testas, I., Schumacher, M., Robel, P., and Baulieu, E. E. Actions of steroid hormones- and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1994; **48** :145-154.
89. Ibanez, C., Shields, S. A., El Etr, M., Baulieu, E. E., Schumacher, M., and Franklin, R. J. Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 2004; **30** :80-89.
90. Balthazart, J. and Ball, G. F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci.* 1998; **21** :243-249.
91. Pozzilli, C., Tomassini, V., Marinelli, F., Paolillo, A., Gasperini, C., and Bastianello, S. 'Gender gap' in multiple sclerosis: magnetic resonance imaging evidence. *Eur.J.Neurol.* 2003; **10** :95-97.
92. Caruso, A., Di, G. G., V, Castiglione, M., Marinelli, F., Tomassini, V., Pozzilli, C., Caricasole, A., Bruno, V., Caciagli, F., Moretti, A., Nicoletti, F., and Melchiorri, D. Testosterone amplifies excitotoxic damage of cultured oligodendrocytes. *J.Neurochem.* 2004; **88** :1179-1185.
93. Voskuhl, R. R. and Palaszynski, K. Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neuroscientist.* 2001; **7** :258-270.
94. Mason, J. L. and Goldman, J. E. A2B5+ and O4+ Cycling progenitors in the adult forebrain white matter respond differentially to PDGF-AA, FGF-2, and IGF-1. *Mol.Cell Neurosci.* 2002; **20** :30-42.

95. Palacios, G., Muro, A., Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Guitart, X., Ovalle, S., and Zamanillo, D. Immunohistochemical localization of the sigma1-receptor in oligodendrocytes in the rat central nervous system. *Brain Res.* 2003; **961** :92-99.
96. Wakeling, A. E., Dukes, M., and Bowler, J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* 1991; **51** :3867-3873.
97. Brogden, R. N., Goa, K. L., and Faulds, D. Mifepristone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs* 1993; **45** :384-409.
98. Brogden, R. N. and Chrisp, P. Flutamide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in advanced prostatic cancer. *Drugs Aging* 1991; **1** :104-115.
99. Whitacre, C. C., Reingold, S. C., and O'Looney, P. A. A gender gap in autoimmunity. *Science* 1999; **283** :1277-1278.
100. Grinsted, L., Heltberg, A., Hagen, C., and Djursing, H. Serum sex hormone and gonadotropin concentrations in premenopausal women with multiple sclerosis. *J.Intern.Med.* 1989; **226** :241-244.
101. Foster, S. C., Daniels, C., Bourdette, D. N., and Bebo, B. F., Jr. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 2003; **140** :78-87.
102. Abramsky, O., Lubetzki-Korn, I., Evron, S., and Brenner, T. Suppressive effect of pregnancy on MS and EAE. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1984; **146** :399-406.
103. Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinovis-Tourniaire, P., and Moreau, T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N.Engl.J.Med.* 1998; **339** :285-291.
104. Sicotte, N. L., Liva, S. M., Klutch, R., Pfeiffer, P., Bouvier, S., Odesa, S., Wu, T. C., and Voskuhl, R. R. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann.Neurol.* 2002; **52** :421-428.
105. Keith, A. B. Effect of pregnancy on experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs and rats. *J.Neurol.Sci.* 1978; **38** :317-326.
106. Langer-Gould, A., Garren, H., Slansky, A., Ruiz, P. J., and Steinman, L. Late pregnancy suppresses relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for a suppressive pregnancy-related serum factor. *J.Immunol.* 2002; **169** :1084-1091.
107. Bebo, B. F., Jr., Zelinka-Vincent, E., Adamus, G., Amundson, D., Vandenbark, A. A., and Offner, H. Gonadal hormones influence the immune

- response to PLP 139-151 and the clinical course of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Neuroimmunol.* 1998; **84** :122-130.
108. Trooster, W. J., Teelken, A. W., Gerrits, P. O., Lijnema, T. H., Loof, J. G., Minderhoud, J. M., and Nieuwenhuis, P. The effect of gonadectomy on the clinical course of chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Clin.Neurol.Neurosurg.* 1996; **98** :222-226.
 109. Palaszynski, K. M., Liu, H., Loo, K. K., and Voskuhl, R. R. Estriol treatment ameliorates disease in males with experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 2004; **149** :84-89.
 110. Palaszynski, K. M., Loo, K. K., Ashouri, J. F., Liu, H. B., and Voskuhl, R. R. Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 2004; **146** :144-152.
 111. Offner, H., Adlard, K., Zamora, A., and Vandenberg, A. A. Estrogen potentiates treatment with T-cell receptor protein of female mice with experimental encephalomyelitis. *J.Clin.Invest* 2000; **105** :1465-1472.
 112. Dalal, M., Kim, S., and Voskuhl, R. R. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J.Immunol.* 1997; **159** :3-6.
 113. Bixo, M., Backstrom, T., Winblad, B., and Andersson, A. Estradiol and testosterone in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1995; **55** :297-303.
 114. Bixo, M., Andersson, A., Winblad, B., Purdy, R. H., and Backstrom, T. Progesterone, 5alpha-pregnane-3,20-dione and 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *Brain Res.* 1997; **764** :173-178.
 115. Ibanez, C., Shields, S. A., El Etr, M., Leonelli, E., Magnaghi, V., Li, W. W., Sim, F. J., Baulieu, E. E., Melcangi, R. C., Schumacher, M., and Franklin, R. J. Steroids and the reversal of age-associated changes in myelination and remyelination. *Prog.Neurobiol.* 2003; **71** :49-56.