

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTIİNFLAMATUVAR SİTOKİNLERİN, NÖROTROFİK FAKTÖRLERİN VE  
İNTERFERON-BETA'NIN FARE OLİGODENDROSİTLERİNİN İN VİTRO  
APOPTOTİK ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Kemal Kürşad GENÇ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

115048

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ  
Prof. Dr. İlgi ŞEMİN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANİZYON MERKEZİ

İZMİR  
2002

“ANTIİNFLAMATUVAR SİTOKİNLERİN, NÖROTROFİK FAKTÖRLERİN VE İNTERFERON-BETA’NİN FARE OLİGODENDROSİTLERİNİN İN VİTRO APOPTOTİK ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİLERİ” isimli bu tez 18. 06. 2002 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

  
Prof. Dr. İlgi ŞEMİN

Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Şakire PÖĞÜN

Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Ataman GÜRE

Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Abdullah ARSLAN

Jüri Üyesi

  
Yrd. Doç. Dr. Oğuz ALTINGÖZ

Jüri Üyesi

## İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	4
Şekil Listesi	5
Kısaltmalar	6
1. Özet	10
2. İngilizce özet	12
3. Giriş ve amaç	14
4. Genel Bilgiler	17
4.1. Glial hücreler ve oligodendrositler	17
4.2. Hücre ölümü mekanizmaları	21
4.2.1. Hücre ölümünün efektörleri : Apoptotik hücre ölümünün tipik morfolojik değişikliklerinden sorumlu mekanizmalar	21
4.2.2. Initiator kaspazların adaptör moleküller aracılığıyla ölüm reseptörleriyle etkileşerek aktivasyonu	22
4.2.3. Initiator kaspazların mitokondrial sitokrom c salınımına bağımlı aktivasyonu	22
4.2.4. Bcl-2/Bax/Bad sistemindeki değişikliklere bağımlı sitokrom c salınması	22
4.2.5. Effektör kaspazlar	24
4.3. Beyaz cevher hasarı ve oligodendrosit ölümü	24
4.3.1. Travmada oligodendrosit hasarı ve ölümü	25
4.3.2. İskemide oligodendrosit ölümü ve beyaz cevher etkilenmesi	26
4.3.3. Hipokside oligodendrosit ölümü ve beyaz cevher etkilenmesi	27
4.3.4. Alzheimer hastalığında beyaz cevher etkilenmesi ve oligodendrosit ölümü	28
4.3.5. Multipl skleroz, oligodendrosit hasarı ve ölümü	29
4.4. Oligodendrosit hasarını ve ölümünü önleyici farmakolojik tedavi yaklaşımları	34
4.4.1. Anti-oksidan ajanlar	34
4.4.2. AMPA glutamat reseptör aktivasyonunu önleyen ajanlar	34
4.4.3. Anti-inflamatuvar ajanlar	34
4.4.4. Anti-apoptotik ve oligodendroglioprotektif ajanlar	35
4.4.5. Oligodendrosit öncü hücrelerinin çoğalmasını ya da farklılaşmasını uyaran ajanlar	35

4.5. Olası oligodendroglioprotektif ajanlar	36
4.5.1. Transforming growth faktör-beta	36
4.5.2. İnterferon-beta	36
4.5.3. Hepatosit growth faktör	36
4.5.4. Nerve growth faktör	37
4.5.5. Eritropoetin	39
4.5.5.1. Sinir sisteminde eritropoetin ve eritropoetin reseptörünün oksijene bağımlı ekspresyonu	40
4.5.5.2. Beyinde eritropoetin ve eritropoetin reseptörü ekspresyonu : gelişim sırasında ve hasardan sonra değişen ekspresyon	41
4.5.5.3. Eritropoetin nöröprotektif özellikleri	42
4.5.5.4. Eritropoetin protektif etkisinin mekanizmaları	42
4.5.5.5. Eritropoetin insanda nöröprotektif bir ajan olarak kullanımı	46
5. Gereç ve yöntemler	47
5.1. Gereçler	47
5.2. Deney hayvanları	47
5.3. Hücre kültürü	47
5.3.1. Lamellerin hazırlanması	47
5.3.2. Kültür kapları	48
5.3.3. Kültür kaplarının ve lamellerin polilizin ile kaplanması	48
5.3.4. Deney hayvanlarından beyin dokularının çıkarılması	48
5.3.5. Beyin dokusunun dissosiasyonu	49
5.3.6. Mikst glial hücre kültürlerinin kurulması	50
5.3.7. Sallama-aderans yöntemiyle saf oligodendrosit kültürlerinin kurulması	50
5.3.8. Mikst glia kültürlerinden astrosit kültürlerinin hazırlanması	52
5.3.9. N20.1 hücre hattı kültürü	53
5.4. İn vitro deneyler	54
5.5. İmmünfloresan boyama	55
5.6. Laktik dehidrogenaz testi	57
5.7. MTT testi	60
5.8. Apostain immünfloresan boyama yöntemi	61
5.9. RT-PCR	64

5.10. Western blotting-immünpresipitasyon	67
5.11. İstatistik değerlendirme	71
6. Bulgular	72
6.1. Oligodendrosit kültürünün saflığı	72
6.2. N20.1 hücre hattının fenotipik özelliği	73
6.3. İnterferon- $\gamma$ , tümör nekrozis faktör- $\alpha$ , lipopolisakkarid ve serum deprivasyonunun oligodendrosit ölümünü indükleyici etkisi	74
6.4. İnterferon- $\gamma$ , tümör nekrozis faktör- $\alpha$ , lipopolisakkarid ve serum deprivasyonunun apoptotik oligodendrosit ölümünü indükleyici etkisi	75
6.5. İnterferon- $\beta$ , transforming growth faktör- $\beta$ , hepatosit growth faktör ve nerve growth faktör oligodendrosit ölümüne karşı koruyucu değildir	75
6.6. Eritropoetinin oligodendrosit ölümüne karşı koruyucu etkisi	75
6.7. Eritropoetinin apoptotik oligodendrosit ölümüne karşı koruyucu etkisi	80
6.8. Oligodendroglial eritropoetin reseptör ekspresyonu	83
6.9. Oligodendroglial eritropoetin reseptörü mRNA ekspresyonu	85
6.10. Oligodendroglial eritropoetin reseptörü mRNA ekspresyonunun inflamatuvar uyaranlarla indüksiyonu	85
7. Tartışma	86
8. Sonuç ve Öneriler	97
9. Kaynakça	100

**TABLO LİSTESİ**

Tablo 1. Oligodendrosit hasarına yol açan etmenler

Tablo 2. Eritropoetin reseptörü ekspresse eden hücreler

Tablo 3. Nöronal ve glial spesifik hücre marker'ları



## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1.** Oligodendroglial hücrelerin gelişim evreleri

**Şekil 2.** Apoptotik hücre ölüm mekanizmaları

**Şekil 3.** Eritropoetin ve hücre içi sinyalleme mekanizmaları

**Şekil 4.** Primer oligodendrosit ve astrosit kültürü

**Şekil 5.** Oligodendrosit kültüründe eritropoetin reseptörü mRNA ekspresyonunun analizi

**Şekil 6.** Primer OL kültüründe anti-GalC ve DAPI immünfloresan boyaması

**Şekil 7.** N20.1 hücre hattı kültüründe anti-GalC ve DAPI immünfloresan boyaması

**Şekil 8.** İnterferon-beta, transforming growth faktör-beta, hepatosit growth faktör ve nerve growth faktörün tümör nekrozis faktör-alfa ve interferon-gamma ile indüklenen oligodendrosit ölümü üzerine etkisi

**Şekil 9.** Eritropoetinin tümör nekrozis faktör-alfa ve interferon-gamma ile indüklenen oligodendrosit ölümü üzerine etkisi

**Şekil 10.** Eritropoetinin lipopolisakkarid ve interferon-gamma ile indüklenen oligodendrosit ölümü üzerine etkisi

**Şekil 11.** Eritropoetinin 72 saatlik serum deprivasyonu ile indüklenen oligodendrosit ölümü üzerine etkisi

**Şekil 12.** Eritropoetinin 96 saatlik serum deprivasyonu ile indüklenen oligodendrosit ölümü üzerine etkisi

**Şekil 13.** Eritropoetinin 72 saatlik serum deprivasyonu ile indüklenen apoptotik oligodendrosit ölümü üzerine etkisi

**Şekil 14.** Eritropoetinin tümör nekrozis faktör-alfa ve interferon-gamma ile indüklenen apoptotik OL ölümü üzerine etkisi

**Şekil 15.** Tümör nekrozis faktör-alfa ve interferon-gamma ile indüklenen apoptotik oligodendrosit ölümü (Apostain boyaması)

**Şekil 16.** Eritropoetinin tümör nekrozis faktör-alfa ve interferon-gamma ile indüklenen apoptotik oligodendrosit ölümü üzerine etkisi (Apostain boyaması)

**Şekil 17.** Oligodendroglial eritropoetin reseptör ekspresyonu (immünfloresan inceleme)

**Şekil 18.** Oligodendroglial eritropoetin reseptör ekspresyonu (Western blotting-immünpresipitasyon incelemesi)

**Şekil 19.** Oligodendroglial eritropoetin reseptör mRNA ekspresyonu

## **KISALTMALAR**

- A $\beta$**  : Amiloid beta
- ACM** : Astrocyte Conditioned Medium
- AH** : Alzheimer Hastalığı
- AMPA**:  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
- ATP** : Adenosinetriphosphate
- $\beta$ APP** : Beta Amiloid Prekürsör Protein
- bFGF** : basic Fibroblast Growth Factor
- BDNF** : Brain Derived Neurotrophic Factor
- BH** : Bcl-2 Homoloji
- BOS** : Beyin Omurilik Sıvısı
- BSA** : Bovine Serum Albumin
- cAMP** : cyclic Adenosine Monophosphate
- CARD**: Caspase Recruitment Domain
- CNTF** : Ciliary Neurotrophic Factor
- DAPI** : 4',6-diamino-2-phenylindole
- DED** : Death Effector Domain
- DMEM**: Dulbecco's Minimal Essential Medium
- DNA** : Deoksiribonükleik asid
- DNase** : Deoxyribonuclease
- EAE** : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
- ELISA**: Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
- EPO** : Eritropoetin
- EPOR** : Eritropoetin Reseptörü
- ERK** : Ekstrasellüler Reseptör Kinaz
- FITC** : Fluorescein Isothiocyanate
- G3PDH** : Glyseraldehid 3-phosphatdehidrogenase
- GalC** : Galactocerebrosid C
- GFAP** : Glial Fibriler Asidik Protein
- GPX** : Glutathione Peroxidase
- HBSS** : Hank's Balanced Salt Solution
- HGF** : Hepatosit Growth Factor



**HIF** : Hypoxia Inducible Factor  
**ICAD** : Inhibitor of Caspase Activated DNase  
**IF** : İmmünfloresan  
**IFN $\beta$**  : İnterferon-beta  
**IFN $\gamma$**  : İnterferon-gamma  
**IGF** : Insulin-like Growth Factor  
**IL-1 $\beta$**  : İnterlökin-1beta  
**IL-4** : İnterlökin-4  
**IL-10** : İnterlökin-10  
**iNOS** : inducible Nitric Oxide Synthase  
**INT** : Iodotetrazolium klorid  
**IP** : İmmunpresipitasyon  
**ITS** : İnsulin-Transferrin-Selenit  
**JAK-2** : Janus Kinase-2  
**KBB** : Kan Beyin Bariyeri  
**LDH** : Laktik Dehidrogenaz  
**LPS** : Lipopolisakkarid  
**MAPK**: Mitogen Activated Protein Kinase  
**MBP** : Miyelin Basic Protein  
**MGCM**: Mixt Glia-Conditioned Medium  
**MMP** : Matriks Metalloproteinaz  
**MOG** : Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein  
**MPTP**: 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine  
**MRG** : Manyetik Rezonans Görüntüleme  
**mRNA**: mesajcı RNA  
**MS** : Multipl Skleroz  
**MSS** : Merkezi Sinir Sistemi  
**MTT** : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
**NAC** : N-Acetyl Cysteine  
**NBQX**: 6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline-2,3-dione  
**NF-160**: Nörofilament-160

**NFκB** : Nükleer FaktörκB  
**NGF** : Nerve Growth Factor  
**NK** : Natural Killer  
**NMDA**: N-metil-D-aspartat  
**NO** : Nitrik Oksid  
**NOS** : Nitric Oxide Synthase  
**NP-40** : Non-idet P-40  
**NT** : Nörotrofin  
**OGD** : Oksijen-Glukoz Deprivasyonu  
**OL** : Oligodendrosit  
**O-2A** : Oligodendrosit-tip 2 Astrosit  
**PARP** : Poli-ADP-riboz polimeraz  
**PBS** : Phosphated Buffered Solution  
**PDGF** : Platelet Derived Growth Factor  
**PDL** : Poli-D-lizin  
**PET** : Pozitron Emisyon Tomografi  
**PI(3)K**: Phosphatidyl Inositol (3) Kinase  
**PLL** : Poli-L-lizin  
**PLP** : Proteolipid Protein  
**RNA** : Ribonükleik asid  
**RT-PCR**: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction  
**SD** : Serum Deprivasyonu  
**SDS** : Sodyum Dodesil Sülfat  
**SDS-PAGE** : SDS-Poliakrilamid Gel Elektroforez  
**SOD** : Süperoksid dismutaz  
**ssDNA**: single strand DNA  
**Stat** : Signal Transducers and Activators of Transcription  
**TGFβ** : Transforming Growth Factor-beta  
**TNFα** : Tümör Nekrozis Faktör-alfa  
**TR** : Texas Red  
**TrkA** : Tirozin kinaz A

**TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling**

**WB : Western Blotting**



## 1. ÖZET

**Antiinflamatuvar sitokinlerin, nörotrofik faktörlerin ve interferon-beta'nın fare oligodendrositlerinin *in vitro* apoptotik ölümü üzerine etkileri**

Dr. Kemal Kürşad GENÇ

**Giriş ve Amaç :** Oligodendrositler (OL) miyelin yapımından sorumlu glial hücrelerdir. Akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarda OL hasarı ve apoptotik ölümü görülmektedir. Bu nedenle *in vitro* değişik hücre hasarı modellerinde OL ölümünü önleyebilecek ajanların belirlenmesi bu hastalıklar için etkin tedavi yöntemlerinin bulunmasına katkıda bulunabilir. Bu amaçla, bu tez çalışmasında interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF $\alpha$ ), lipopolisakkarid (LPS) ve serum deprivasyonu (SD) ile oluşturulan OL ölümüne karşı interferon-beta (IFN $\beta$ ), transforming growth faktör-beta (TGF $\beta$ ), hepatosit growth faktör (HGF), nerve growth faktör (NGF) ve eritropoetin (EPO) koruyucu etkisinin bulunup bulunmadığı araştırıldı.

**Gereç ve Yöntemler :** Bu çalışmada yenidoğan fare OL ve N20.1 immatür OL hücre hattı kültürlerinde hücre hasarı 100 U/ml IFN $\gamma$  + 100 ng/ml TNF $\alpha$ , 100 U/ml IFN $\gamma$  + 1  $\mu$ g/ml LPS ve SD ile oluşturuldu. OL hasarının ve test edilen maddelerin olası koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesinde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hücre canlılık ve Laktik dehidrogenaz (LDH) sitotoksikite testleri, apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesinde ise apostain immünfloresan (IF) boyaması kullanıldı. Hücre kültürlerinde EPO reseptörü (EPOR) ekspresyonu IF boyama, Western blotting (WB)-immünpresipitasyon (IP) ve reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) yöntemleriyle değerlendirildi.

**Sonuçlar :** Bu çalışmanın sonuçları uygulanan hücre hasarı modellerinde IFN $\beta$ , TGF $\beta$ , HGF ve NGF'ün OL'i koruyucu etkisinin olmadığını, EPO'in ise OL'i koruyucu etki gösterdiğini ve apoptotik hücre ölümünü önlediğini gösterdi. IF boyama ile OL'in bazal EPOR ekspresyonu ettiğini, WB-IP ve RT-PCR teknikleriyle N20.1 hücrelerinin hem EPOR proteini hem de EPOR mRNA ekspresyonu ettiğini saptandı. N20.1 hücrelerinde EPOR mRNA ekspresyonunun IFN $\gamma$  ve LPS uygulamalarıyla indüklendiği gösterildi.

**Tartışma :** Bu sonuçlar çalışmada test edilen maddelerden EPO'in çeşitli *in vitro* hasar modellerinde OL hasarını ve apoptotik hücre ölümünü önlediğini ve OL'de bazal ve inflamatuvar uyaranlarla indüklenebilir EPOR protein ve mRNA ekspresyonunun bulunduğunu göstermektedir. Bu çalışma daha önceki çalışmalarla çeşitli *in vivo* hastalık ve *in vitro* hasar modellerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiş olan EPO'in oligodendrogliprotektif etkisini gösteren ilk *in vitro* çalışmadır. Bu sonuçlar kronik anemi tedavisi endikasyonu ile zaten klinik kullanımı bulunan EPO'in, OL ölümü ve beyaz cevher hasarı görülen stroke, travma gibi akut ve multipl skleroz, Alzheimer hastalığı gibi kronik nörodejeneratif hastalıkların tedavisine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler :** Oligodendrosit; apoptoz; eritropoetin; nörotrofik faktörler; interferon-beta; anti-inflamatuvar sitokinler; fare



## 2. İNGİLİZCE ÖZET

**The effects of anti-inflammatory cytokines, neurotrophic factors and interferon-beta on *in vitro* apoptotic death of murine oligodendrocytes**

Dr. Kemal Kürşad GENÇ

**Background, purpose, aim of the study :** Oligodendrocytes (OL) are glial cells that are responsible for myelin production. OL injury and apoptotic cell death occur in acute and chronic neurodegenerative disorders. Therefore, determining the agents that may prevent OL death in various injury models *in vitro* might contribute to establish effective treatment strategies for these disorders. For this purpose, in the present study it has been investigated that whether interferon-beta (IFN $\beta$ ), transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ), hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor (NGF) and erythropoietin (EPO) have protective action against OL death that is induced by interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ), lipopolysaccharide (LPS) and serum deprivation (SD).

**Material and methods :** In this study, OL injury has been induced by 100 U/ml IFN $\gamma$  + 100 ng/ml TNF $\alpha$ , 100 U/ml IFN $\gamma$  + 1  $\mu$ g/ml LPS and SD in neonatal mice OL and N20.1 immature OL cell line cultures. The OL injury and the possible protective actions of candidate agents have been evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell viability assay and Lactic dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay. Apostain immunofluorescein (IF) staining has been used for the evaluation of apoptotic cell death. The protein and mRNA expression of EPO receptor (EPOR) has been searched by IF staining, Western blotting (WB)-Immunoprecipitation (IP) and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) techniques respectively.

**Results :** The results of the present study shows that IFN $\beta$ , TGF $\beta$ , HGF and NGF have no protective action in the injury models that have been used. In contrast to this, EPO shows protective action on OL and prevents apoptotic cell death. It has been demonstrated that OL expresses baseline EPOR as shown by IF staining and N20.1 cells express both EPOR protein and EPOR mRNA as shown by WP-IP and RT-PCR techniques respectively. It has been shown that EPOR mRNA expression is induced by IFN $\gamma$  and LPS treatment of cultures.

**Discussion :** These results show that EPO which is one of the agents that have been tested in this study prevents cell injury and apoptotic cell death in various *in vitro* cell injury models and that baseline and inflammatory stimuli-induced EPOR protein and mRNA expression exist in OL. This is the first *in vitro* study that presents the oligodendrogliprotective action of EPO which of the neuroprotective action has been demonstrated by recent studies in various disease models *in vivo* and injury models *in vitro*. These results suggest that EPO that is currently used for the treatment of chronic anemia might contribute to the treatment of acute and chronic neurodegenerative disorders such as stroke, trauma, Alzheimer's disease and multiple sclerosis which in OL death and white matter injury occur.

**Keywords :** Oligodendrocyte; apoptosis; eritropoietin; neurotrophic factors; interferon-beta; anti-inflammatory cytokines; mouse

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Oligodendrositler (OL) merkezi sinir sisteminin (MSS) glial hücrelerinden bir grubu oluşturmaktadır ve bu hücreler aksonların miyelin kılıfının yapımından sorumludur. MSS'nin doğumsal (dismiyelinizan hastalıklar) ya da çeşitli etiyolojileri olan (inflamatuvar, toksik, otoimmün) edinsel hastalıklarında [multipl skleroz (MS) gibi demiyelinizan hastalıklar] primer patoloji miyelin hasarı ve OL ölümüdür. Bu hastalıkların yanısıra MSS'nin hipoksi, iskemi gibi akut ve Alzheimer Hastalığı (AH) gibi kronik dejeneratif hastalıklarında gri cevher hasarı ve nöron ölümü yanısıra beyaz cevher etkilenmesi, miyelin kaybı ve OL ölümü de görülmektedir. Bu nedenle primer ya da sekonder OL patolojisinin bulunduğu bu hastalıklarda OL ölümünün kesin mekanizmalarının anlaşılması ve OL ölümünü önleyebilecek ajanların belirlenmesi etkin tedavi yöntemlerinin bulunmasına katkıda bulunabilir.

MSS'nin demiyelinizan ve nörodejeneratif hastalıklarında inflamatuvar süreçler, glutamat eksitotoksitesisi, reaktif nitrojen ve oksijen ürünlerinin oluşumu ve apoptotik hücre ölümü gibi fizyopatolojik süreçler rol oynamaktadır. OL ölümünün kesin mekanizmalarının anlaşılmasında ve tedavi edici potansiyeli bulunan ajanların test edilmesinde bu hastalıkların *in vitro* hücre kültürü modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vitro* çalışmaların avantajı çalışma kolaylığı, yeniden üretilme (reproducibility) oranının yüksek olması ve sistem değişkenlerinin kontrol altında tutulabilmesidir. *In vitro* OL hasar modellerinde hasar yaratıcı etken ya da ajan olarak serum deprivasyonu (SD), hipoksi, oksijen-glukoz deprivasyonu (OGD), hidrojen peroksid, nitrik oksid (NO) verici maddeler, amiloid beta (A $\beta$ ) peptid, lipopolisakkarid (LPS) yanısıra interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) ve tümör nekrozis faktör (TNF) gibi inflamatuvar sitokinler de kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında SD yanısıra *in vitro* apoptotik OL ölümü ve inflamatuvar OL hasar modeli olarak LPS, IFN $\gamma$  ve TNF $\alpha$  kullanılmıştır. Bu ajanların seçilmesinin nedeni *in vivo* inflamatuvar demiyelinizasyona benzeşim ve AH, Parkinson Hastalığı gibi kronik ve stroke, travma gibi akut nörodejeneratif hastalıklarda da inflamatuvar süreçlerin nöron ve glia hasarına katıldığına ilişkin kanıtlar bulunmasıdır.



Bu hastalık tablolarında beyaz cevher hasarını ve OL ölümünü azaltan ajanlar tedaviye katkıda bulunabilir. Ancak deneysel hastalık modellerinde tedavi edici etkinliği sınanacak aday ajanların seçimi için *in vivo* deneylerden önce *in vitro* OL hasar modellerinde değişik ajanların denenmesi uygundur. Bu amaçla bu tez çalışmasında değişik *in vitro* OL hasar modellerinde, değişik gruplardan maddelerin olası koruyucu etkilerinin sınanması planlanmıştır. Bu ajanların *in vitro* etkinliğinin gösterilmesi *in vivo* hastalık modellerinde tedavi edici aday ajan olarak denenmelerini gündeme getirebilir. Bu tez çalışmasında anti-inflamatuvar bir sitokin olan transforming growth faktör-beta'nın (TGF $\beta$ ), nörotrofik faktörlerin [nerve growth faktör (NGF) ve hepatosit growth faktör (HGF)], interferon-beta'nın (IFN $\beta$ ) ve eritropoetinin (EPO) OL ölümüne karşı koruyucu etkilerinin bulunup bulunmadığı yenidoğan fare OL kültürlerinde ve N20.1 fare OL hücre hattı kültürlerinde çeşitli *in vitro* hücre hasarı modelleri (LPS, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  ve SD) kullanılarak araştırılmıştır. Bu maddelerden NGF, HGF, EPO ve TGF $\beta$ 'nin *in vitro* çeşitli hücre hasarı modellerinde nöronları koruyucu etkisi daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Fakat, NGF dışında bu maddelerin OL hasarını önleyici etkilerini bildiren bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. TGF $\beta$  ve IFN $\beta$  anti-inflamatuvar ve immunomodülatör etkileri olan maddelerdir ve bu özellikleri nedeniyle MS'un deneysel hayvan modeli olan eksperimental otoimmün (autoimmune) ensefalomyelitinin (EAE) tedavisinde denenmiş ve etkili bulunmuştur. Benzeri bir etki yine anti-inflamatuvar bir sitokin olan ve inflamatuvar OL hasarını da önleyen interleükin-10 (IL-10) için bildirilmiştir. Benzeri şekilde TGF $\beta$  ve IFN $\beta$ 'nin da inflamatuvar uyaranlarla indüklenen OL hasarına karşı primer koruyucu etkisi bulunuyor olabilir. Bu tez çalışmasında OL hasarının ve denen bu maddelerin olası koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesinde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hücre canlılığı ve Laktik dehidrogenaz (LDH) sitotoksosite testleri, apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesinde ise apostain immünfloresan (IF) boyaması yöntemi kullanıldı.

Çeşitli *in vitro* hasar modellerinde NGF, HGF ve EPO'in nöronal hücreleri koruyucu etkisinin olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Kemirgen OL'nin NGF ve HGF reseptörleri ekspresse ettiği bilinmektedir. Fakat bugüne kadar kemirgen OL'de EPO reseptörünün (EPOR) varlığı henüz bildirilmemiştir. Bu tez çalışmasında EPO'in OL hasarına karşı koruyucu etkisinin saptanması bizi bu hücrelerde EPO reseptörlerinin varlığını da araştırmaya yöneltti. Bu amaçla primer OL hücrelerinde ve N20.1 hücrelerinde bazal EPOR

mesajcı ribonükleik asid (mRNA) ekspresyonu reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) yöntemiyle araştırıldı. Çalışmada primer OL kültürü yanısıra oligodendroglial hücre hattı da kullanılmasındaki amaç primer OL kültürlerinde saf OL hücre eldesinin düşük olmasıdır. Bu durum özellikle fazla sayıda hücrenin kullanılmasının gerektiği moleküler biyolojik yöntemler için önemlidir. Bu çalışmada bazal oligodendroglial EPOR mRNA ekspresyonunun inflamatuvar uyarımlarla (IFN $\gamma$  ve LPS) değişiklik gösterip göstermediğini araştırmak için de RT-PCR tekniği kullanıldı. Oligodendroglial EPOR protein ekspresyonunun varlığı ise IF boyama ve Western Blotting (WB)-immünpresipitasyon (IP) teknikleriyle araştırıldı.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Glial Hücreler ve Oligodendrositler

Omurgalı MSS'de çok sayıda farklı nöron ve glia tipi bulunmaktadır. Evrimle birlikte glial hücrelerin sayısı artmaktadır. MSS'de glial hücrelerin toplam hücre sayısına oranı drosofilada %25, kemirgenlerde % 65 ve insanlarda % 90'dır (78). Glial hücreler astroglia, oligodendroglia ve mikroglia'dır. Astrositler heterojen bir hücre topluluğudur. Bu hücrelerin ortak özellikleri Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) eksprese etmeleridir. Bu hücrelerin fonksiyonları çeşitlidir. Gelişim sırasında astroglia ve öncüleri akson gelişimini desteklemekte ve nöronların migrasyonu için kılavuzluk etmektedir. Erişkin yaşamda astroglia, kan-beyin bariyerinin oluşumuna katılmakta, nöronlara metabolik destek sağlamakta, hasardan sonra glial skar oluşumuna katılmakta, salgıladığı trofik ve toksik faktörler aracılığıyla ya nöron canlılığını desteklemekte ya da ölümünü iletmektedir (95). Astrositlerin bir başka fonksiyonu da nörotransmitter düzeylerinin modülasyonudur (147).

OL, astroglia'dan farklı olarak daha homojen bir hücre topluluğudur. Beyaz cevherde OL'in rolü miyelin kılıfının yapımı ve yapısının sürdürülmesidir (24). Gri cevherde de çok sayıda OL ve öncü hücresi bulunmakla birlikte bunların fonksiyonu açık değildir. Bu hücreler nöronlara metabolik ve trofik destek sağlıyor olabilir ya da hasar durumunda beyaz cevherdeki OL topluluğunun yenilenmesi için depo görevi görüyor olabilir (78). OL ilk kez 1899 yılında Robertson tarafından değişik uzunlukta birkaç uzantısı olan küçük hücreler olarak tanımlanmıştır (78). 1921'de del Rio Hortega bu hücrelerin ayrıntılı bir histolojik tanımlamasını yapmış ve tanımlayıcı OL terimini kullanmıştır (78). Bu hücrelerin aksonal traktlar boyunca, nöronal hücre gövdelerinin çevresinde ve kapillerin komşuluğundaki lokalizasyonu del Rio Hortega'nın oligodendroglial hücreleri üç alt grup içinde sınıflamasına yol açmıştır: interfasiküler, perinöral satellit ve perivasküler. OL'in heterojenitesi hem ultrastrüktürel düzeyde hem de immünohistokimyasal marker'lar ile de gösterilmiştir. Ancak bugün için birden fazla OL soyu hücre bulunduğuna ilişkin bir kanıt bulunmamaktadır (78).

OL'in başlıca fonksiyonu kompakt çok tabakalı miyelin kılıfını oluşturmak üzere yoğun membran yapılarının aksonların çevresini sarmasıdır (24). Periferik sinir sisteminde bir Schwann hücresinin bir internodun miyelinizasyonunu sağlamanın aksine MSS'de bir OL

farklı aksonlarda 20 ya da daha fazla sayıda internodun miyelin kılıfını oluşturmaktadır. Lipidden zengin yapısıyla miyelin kılıfı sinir impulslarının aksonlar boyunca etkin ve hızlı iletimini sağlamaktadır. Miyelin oluştuktan sonra yapısının sürekliliği ve turnover'ı için de OL gereklidir (24). Proteolipid protein (PLP) ya da miyelin basic protein (MBP) gibi miyelin proteinlerinin mutasyonu biçimindeki miyelin yokluğu insanlarda ve hayvanlarda öldürücü tablolara yol açmaktadır (24). Erişkinlerde MS gibi demiyelinizan hastalıklar da nörolojik disfonksiyona neden olmaktadır (180). OL miyelin yapımının yanısıra demir homeostazı ve MSS'de demir depolanmasında da önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir. OL, demir transport glikoproteininin başlıca kaynağıdır (78).

OL'i astrogliadan ayıran çok sayıda özellik vardır. Hücre gövdesi daha küçüktür, hem sitoplazması hem de çekirdeği daha yoğundur (yoğun kromatin içermektedir), sitoplazmik intermediate filamentleri bulunmamaktadır ve sitoplazmasında glikojen yoktur; uzantılarında çok sayıda mikrotübül vardır ve bu yapıların, hücre uzantılarının stabilitesinin sağlanmasına katkıda bulunması olasıdır (78).

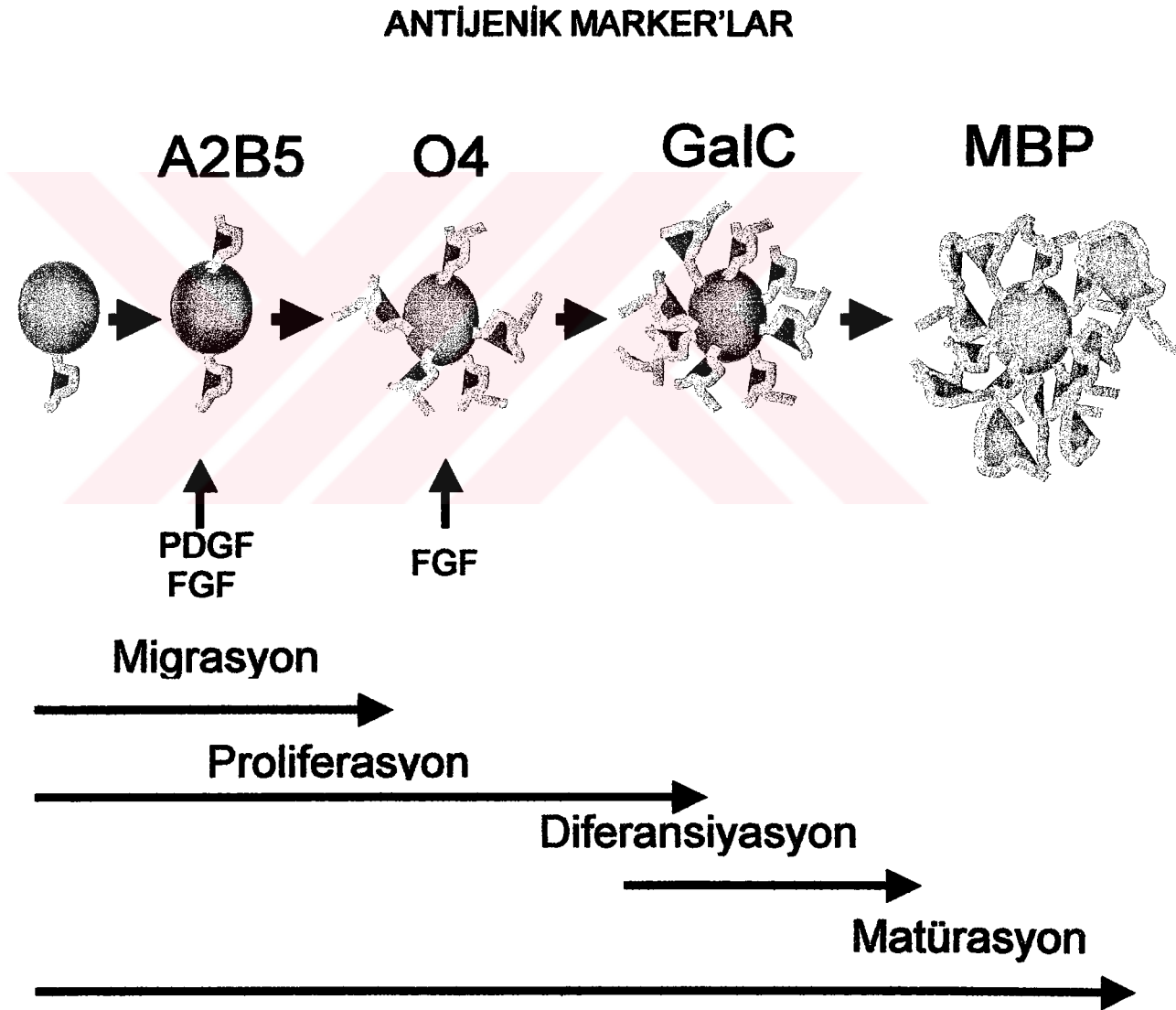
Oligodendroglial hücreler, miyelin oluşturan olgun OL aşamasına gelinceye kadar değişik gelişim basamaklarından geçmektedir. Bu gelişim basamakları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla tanımlanmıştır ve farklı gelişim basamaklarında hücrelerin eksprese ettiği antijenik marker'lar ve bu hücrelerin mitotik ve migratuvar durumları farklılık göstermektedir (205). Bu antijenik marker'ların çoğu ilk önce *in vitro* çalışmalarla saptanmıştır. Farklılaşma süreci ilerledikçe bazı yüzey ya da sitoplazma antijenlerinin ekspresyonu kaybolmakta ve bazı yeni antijenler eksprese edilmeye başlanmaktadır (78). OL gelişimi farklı, fakat zamansal olarak örtüşen iki evreye ayrılabilir. İlk evre öncü hücrelerin (progenitor) oluşması ve çoğalmasını kapsamaktadır. İkincisi ise miyelinogenezise ve demir metabolizmasına katılan genlerin ardışık aktivasyonu ile karakterizedir (205). Miyelin membranının biyokimyasal bileşimi ve moleküler organizasyonu iyi anlaşılırsa da miyelin ve OL genlerinin regülasyonuna ilişkin bilinenler azdır. OL öncüsü hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasının fenotipik ve moleküler mekanizmaları büyük ölçüde hücre kültürü çalışmalarıyla ortaya konmuştur. *In vitro* miyelinizasyon ilk kez 1955'de Murray tarafından eksplant kültürde gösterilmiştir (78). Bu tip kültürde MSS'nin üç boyutlu yapısı sürmektedir ve bu nedenle değişik tipte hücreler arasında bağlantılar ve etkileşimler korunmaktadır. Ayrıca gelişim ve

matürasyon olayları *in vivo* durumdakine benzer bir zamansal seyir izlemektedir. Dissosiyeye perinatal beyin hücrelerinden hazırlanan reagregat kültürlerinde de eksplant kültürlerdekenden daha az olmakla birlikte miyelinizasyon gerçekleşmektedir. Dissosiyeye beyin hücre kültürlerinde de miyelin benzeri yapılar kültürde nöronlar bulunsun ya da bulunmasını gözlenmektedir (78).

Birçok araştırmacı miyelinogenezis mekanizmalarını ve bununla ilgili hücre-hücre etkileşimlerini premiyelinizasyon evresinde ve matür OL kültürleri kullanarak araştırmıştır (78). Yenidoğan dissosiyeye sıçan beyin hücrelerinden hem OL'i hem de astrositleri kapsayan mikst glial kültürler hazırlanmaktadır. Bu kültürlerin mikroskopik incelemesi hücre morfolojisinin ve hücre tiplerinin kültürde zamansal gelişimini göstermektedir. Kültürlerde ekimden 5-6 gün sonra düz, poligonal astrosit tabakası oluşmaktadır. Daha sonraki 48 saatte astrosit tabakasının üzerinde faz kontrast mikroskopta koyu görünen hücreler ortaya çıkmaktadır. Bu hücrelerin sayısı zaman içinde hızla artmaktadır. Bu hücreler tek ya da kümeler biçiminde görülmektedir. 9. günde proliferasyon belirgin olarak yavaşlamaktadır, hücre gövdeleri yuvarlaklaşmakta ve ince, uzun uzantılar ortaya çıkmaktadır; hücre kümelerinin sayısı ve boyutu artmaktadır. Bu hücreler ilk olarak kültürün 5.-6. günlerinde ortaya çıkan ve faz kontrast mikroskopda koyu görünen hücrelerden türemektedir. Kültürler birkaç hafta hem öncü hücreleri hem de olgun OL içermekte ve bu şekilde birkaç hafta heterojen durumda kalmaktadır. 1980'de McCarthy ve De Vellis mikst glial hücre kültürlerinden saf OL kültürü elde etmek için kültürleri sallamaya (shaking) dayanan basit bir yöntem geliştirmişlerdir (78). Bu yöntem mikst glial kültürlerin iki özelliğine dayanmaktadır: Birincisi OL astrosit tabakasının üzerinde yerleşim göstermektedir. İkincisi kültürün erken evrelerinde (6-10. günler arası) OL'in astrositlere tutunma (adezyon) gücü astrositlerin kültür kabına tutunma gücünden daha zayıftır. Bu yöntem *in vitro* nisbeten erken dönemde saf oligodendroglial hücrelerin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu hücrelerin çoğunluğu OL öncüsü hücreler ve pre-OL'dir. *In vitro* 2.-3. haftalarda OL'in adezyonu giderek arttığı için sallama yöntemiyle bu hücrelerin astrosit tabakasından ayrılması zorlaşmaktadır (78).

OL postnatal olarak gelişmektedir ve farklılaşmamış kök hücre aşamasından olgun ve miyelin oluşturan OL hücre aşamasına gelinceye kadar değişik gelişim evrelerinden geçmektedir. Bu aşamalı gelişim süreci kültürde de gözlenmektedir. Kültürde progenitor

hücre [OL-tip 2 astrosit (O-2A)] bipotansiyel bir hücredir. Uygun koşullarda ya OL'e ya da astroglial hücelere farklılaşabilmektedir. Sıçanda *in vitro* OL gelişiminin dört ayrı evresi saptanmıştır (78, 205). O-2A progenitor hücre A2B5 antikoruyla pozitif boyanan, bipolar ve çoğalma gösteren bir hücredir. Bu hücrelerden O4<sup>+</sup>/Galaktoserebrozid C (GalC)<sup>-</sup> pre-OL gelişmektedir. Bu hücreler de çoğalma özelliğine sahiptir. Ardından O4<sup>+</sup>/GalC<sup>+</sup> immatür OL gelişmektedir. Olgun OL ise O4<sup>+</sup>/GalC<sup>+</sup>/MBP<sup>+</sup> boyanma özelliği göstermektedir. Bu hücreler miyelinogenezis yeteneğindedir (78, 23) (Şekil 2).



**Şekil 1. Oligodendroglial hücrelerin gelişim evreleri (78)**

*In vitro* birçok madde O2-A progenitor hücrelerin proliferasyonunu ya da farklılaşmasını uyarır. Örneğin bazik fibroblast growth faktör (bFGF) ve platelet derived growth factor (PDGF) çoğalmayı, tiroid hormonları, dana serumu, hidrokortizon, insulin-like growth factor (IGF) gibi faktörler ve hücre içi siklik adenozin monofosfatı (cAMP) arttıran ajanlar farklılaşmayı uyarır (78).

Mikst glial kültürlerle ilişkin parametreler OL kültürlerinin elde edilmesine etki etmektedir. Örneğin pre-OL başlangıç ekim yoğunluğu yüksek tutulduğunda gelişmektedir. Düşük ekim yoğunluğunda ise kültürlerde astrositler egemen olmaktadır. Ayrıca 0-2 günlük sıçanların beyinlerinden kurulan mikst glial kültürler OL gelişimi için optimum bulunmuştur. Daha büyük sıçanların beyninden OL kültürlerinin kurulması için ise sallama-aderans yöntemi dışında manyetik separasyon, dansite gradient santrifüj, immunopanning gibi farklı kültür teknikleri kullanılmaktadır (78).

## 4.2. Hücre Ölümü Mekanizmaları

Morfolojik ölçütlere dayanılarak hücre ölümünün iki formu tanımlanmıştır (245). Apoptotik hücre ölümü nükleer piknoz, kromatin kondansasyonu, plazma membranının ve hücre organellerinin bütünlüğünü koruması ile karakterizedir. Apoptotik hücre ölümü, aktif enerji tüketimini gerektirmektedir ve bu tip hücre ölümünde internükleozomal deoksiribonükleik asid (DNA) fragmentasyonu, spesifik sistein proteazların (kaspazlar) aktivasyonu ve spesifik substratların aspartik asid rezidü bölgelerinde spesifik ayrılması (cleavage) olmaktadır (245). Bunun tersine nekrotik hücre ölümü sitoplazmik şişme, subsellüler komponentlerin entegrasyonunun ve plazma membranının bütünlüğünün bozulması ve enerji kaybıyla karakterizedir. OL soyundan hücrelerde gelişim sırasında apoptotik hücre ölümü ve patolojik durumlarda ise zararlı uyarının tipine ve hücre ölümü sürecine katılan “downstream” sinyalleme araçlarına bağımlı olarak bu iki hücre ölümü formu da görülebilmektedir (60, 245).

### 4.2.1. Hücre Ölümünün Effektörleri: Apoptotik Hücre Ölümünün Tipik Morfolojik Değişikliklerinden Sorumlu Mekanizmalar

Apoptotik hücre ölümü sürecine katılan biyokimyasal olaylar türler arasında evrimsel olarak iyi korunmuştur ve bu süreç aminoasid sekansları, protein yapısı ve substrat

spesifitesi açısından benzer özellikler taşıyan proteolitik kaspaz kaskad sisteminin aktivasyonu olmaktadır (60). Kaspazlar inaktive pro-kaspaz biçiminde bulunmaktadır ve apoptotik süreç başladığında kaskadik olarak aktive olmaktadır. “Initiator” kaspazların uzun N-terminal “domain”leri vardır ve bu domain’ler prokaspaz-8 ve -10’da DED (death effector domain), prokaspaz-1, -2 ve -9’da CARD (Caspase Recruitment Domain) denilen protein-protein etkileşme motifleri içermektedir (60). Initiator kaspazların aktivasyonu ya kaspaz-8’de olduğu gibi aktive olmuş hücre yüzey ölüm reseptörleriyle etkileşimle ya da kaspaz-9 için olduğu gibi sitozolik komponentlerle mitokondriden salınan sitokrom c arasında aktif komplekslerin oluşumuyla (60) (Şekil 2).

#### **4.2.2. Initiator Kaspazların Adaptör Moleküller Aracılığıyla Ölüm Reseptörleriyle Etkileşerek Aktivasyonu**

Ölüm reseptörleri ekstrasellüler domain’lerinde ortak bir sistein motifi ve intrasellüler bölümlerinde daha zayıf homoloji gösteren ölüm domain’i taşıyan transmembran proteinlerdir. Bu bölgeler protein-protein etkileşim bölgeleridir ve bu bölge aracılığıyla adaptör moleküller (örneğin Fas için FADD ya da p53 için TRADD) “initiator” pro-kaspazların (pro-kaspaz-1, -8 ve -11) N-terminal domain’lerine bağlanmaktadır ve pro-kaspazlar aktive olmaktadır (60) (Şekil 2).

#### **4.2.3. Initiator Kaspazların Mitokondrial Sitokrom c Salınımına Bağımlı Aktivasyonu**

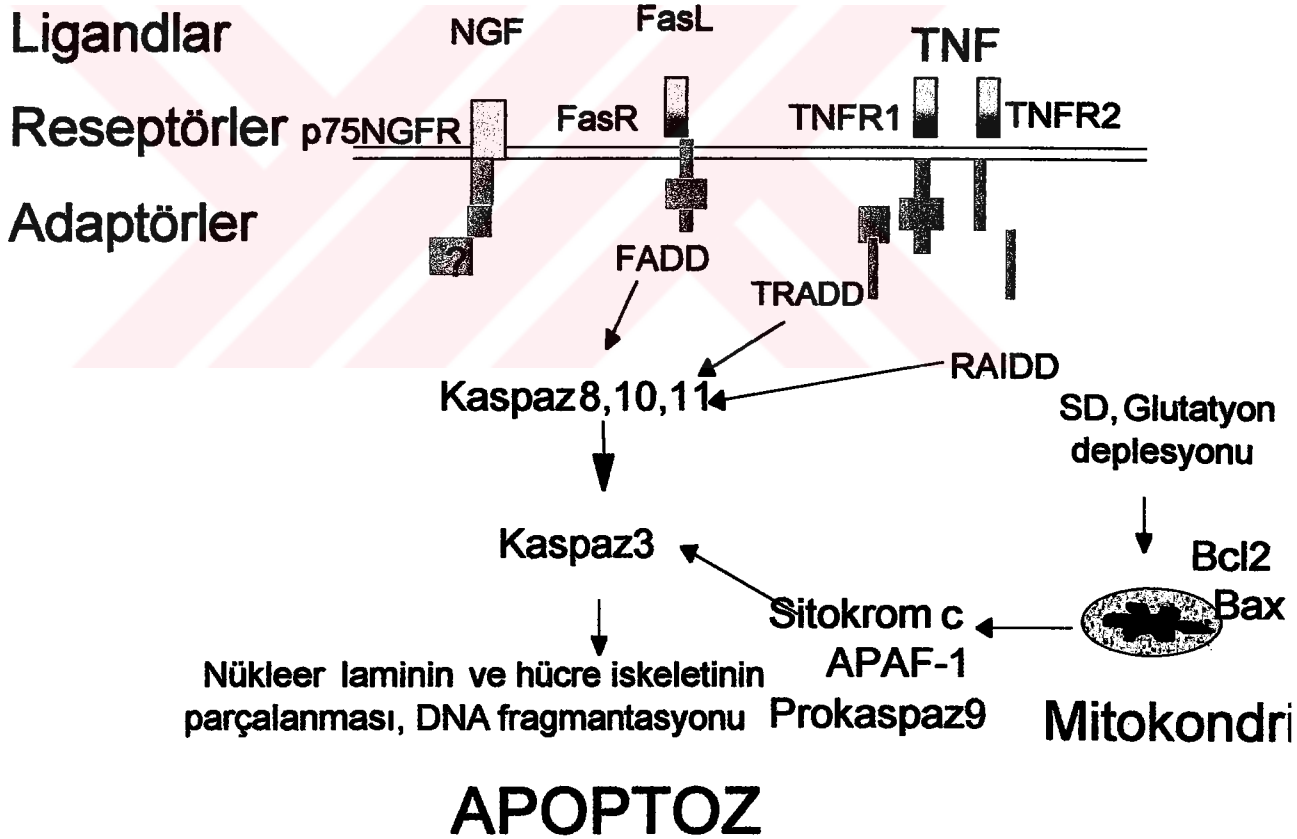
Sitokrom c normal koşullarda mitokondri membran iç aralığında bulunmakta ve solunum zincirine katılmaktadır (60). Mitokondri dış zarının geçirgenliğinin Bcl-2/Bax/Bad sistemindeki değişikliklere bağlı olarak değişmesinin ardından sitokrom c sitozole geçerek Apaf-1’e ve kaspaz-9’a bağlanmakta ve adenosin trifosfatın (ATP) varlığında proteolitik bir kaskadı başlatmaktadır (173) (Şekil 2).

#### **4.2.4. Bcl-2/Bax/Bad sistemindeki değişikliklere bağlı sitokrom c salınması**

Bcl-2 ailesinin üyeleri Bcl-2 homoloji (BH) domainlerini (BH1, BH2, BH3, BH4) taşıyan ve anti-apoptotik ya da pro-apoptotik fonksiyon gören sitozolik proteinlerdir (60). Bu dört domain bu proteinlerin hücre koruyucu fonksiyonu için gereklidir. Oysa yalnız BH3 domaini ölümü indüklemek için yeterli olmaktadır ve bu domaini taşıyan üyeler (Bad, Bim,



Bik, Blk, Bax ve Bid) pro-apoptotik rol oynamaktadır (60). Bcl-2 ve Bcl-XL ise uygun iyonik gradienti sürdürerek mitokondrial fonksiyonun korunmasına katkıda bulunmalarının yanı sıra Bax pro-apoptotik proteinini heterodimerize ederek onun fonksiyonunu antagonize etmektedir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri ise negatif yüklü moleküllere selektiviteyle mitokondri dış membranında porlar oluşturabilmektedir (60). Bid ve Bax mitokondri membran potansiyelini değiştirmeden de sitokrom c taşıyıcısı olarak fonksiyon görebilmektedir (60). Değişik hücre ölümü uyaranları Bcl-2 ailesinden moleküllerin düzeylerini ve/ya da hücre içi lokalizasyonlarını değiştirerek sitokrom salınımını indüklemektedir (60). Örneğin TNF'nin OL'de Bax proteinini düzeyini arttırdığı saptanmıştır (243).



Şekil 2. Apoptotik hücre ölüm mekanizmaları (60)

#### 4.2.5. Effektör kaspazlar

Effektör kaspazlar apoptozda gözlenen morfolojik değişikliklerin indüksiyonuna yol açan proteolitik substrat yıkımı olayından sorumludur (60). Bu kaspazlar kaspaz-3, -6 ve -7'dir. Bu kaspazların aktivasyonu aktive olmuş initiator kaspazlar tarafından pro-enzimin proteolitik yıkımına bağlıdır. Effektör kaspazların substratları iki ana gruba ayrılmaktadır:

1. Yıkımları sonucu hücrede apoptotik değişikliklerin geliştiği proteinler.
  - a. Yıkıma uğramalarının sonucu olarak hücre iskeleti değişiklikleri ve diğer morfolojik değişikliklerin olduğu proteinler. Nükleer laminler, fodrin, aktin.
  - b. DNA fragmentasyonundan sorumlu Caspase Activated DNase enziminin inhibitörü (ICAD)
  - c. Çift sarmal DNA kırıklarının onarımından sorumlu poli-ADP-riboz polimeraz (PARP)
2. Hücre canlılığının sürdürülmesine katılan Ras, Cbl, Raf-1 ve Akt gibi sinyal iletim molekülleri

Temel hücre fonksiyonlarının ve yapısının sürdürülmesinden sorumlu bu proteinlerin apoptotik hücre ölümü sürecinde efektör kaspazlar tarafından yıkılması apoptozun biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (60, 245).

### 4.3. Beyaz Cevher Hasarı ve Oligodendrosit Ölümü

MSS'nin doğumsal (dismiyelinizan hastalıklar) ya da çeşitli etiyolojili (inflamatuvar, toksik, otoimmün) edinsel hastalıklarında (MS gibi demiyelinizan hastalıklar) primer patoloji miyelin hasarı ve OL ölümüdür. Bu hastalıkların yanısıra MSS'nin hipoksi, iskemi, travma gibi akut ve AH gibi kronik dejeneratif hastalıklarında gri cevher hasarı ve nöron ölümü yanısıra beyaz cevher etkilenmesi, miyelin kaybı ve OL ölümü de görülmektedir. OL'in *in vitro* ve *in vivo* birçok hasar modelinde çok çeşitli etmenlere duyarlı olduğu saptanmıştır (27, 60) (Tablo 1).

**Tablo 1 : Oligodendrosit Hasarına Yol Açan Etmenler**

Uyaran	Kaynaklar
Amiloid beta	211
Hipoksi	135, 282
Radyasyon	309
C2 seramid	42, 59
Isı şoku	145
Kateşolaminler	221
Eksitotoksisite	189, 193, 335, 336
Oksidatif stres	
Glutasyon deplesyonu	18
Hidrojen peroksid	249, 298
Nitrik oksid	38, 202, 208
Sitokin reseptörlerinin aktivasyonu	
TNF $\alpha$	2, 3, 89, 129, 198, 203, 241, 261, 263
Fas	90, 88
IFN $\gamma$	13, 20, 69, 302
NGF (Tirozin kinaza yokluğunda)	58, 124, 87

#### 4.3.1. Travmada Oligodendrosit Hasarı ve Ölümü

MSS'de travmatik hasardan sonra apoptotik hücre ölümünün görülmesi pasif nekroz yanısıra apoptozun da hasara aracılık edebileceğini düşündürmektedir (287). Omurilik travmasından sonraki 6. saat-3. hafta döneminde özellikle beyaz cevherde apoptotik hücre ölümü olmaktadır ve bu hücreler OL marker'ları ile pozitif boyanmaktadır. Bu nedenle hasar bölgesindeki kronik dejenerasyon ve traktusların kronik demiyelinizasyonu en azından kısmen apoptoza bağlı görünmektedir (73, 174). Deneysel omurilik travması çalışmalarında seçilen modele ve hasarın şiddetine bağlı olarak apoptotik OL ölümünün en fazla görüldüğü zaman değişkenlik göstermekle birlikte bu bulgu genellikle geç dönemde (hasarı izleyen birkaç günden sonra) ortaya çıkmaktadır (287). Şiddetli alt torasik kontüzyon modelinde

apoptotik nöronal ve OL ölümü travmadan sonraki geç dönemde ve bifazik (3.-14. günler) olarak saptanmıştır (332). Anevrizma klipi ile oluşturulan deneysel omurilik travmasından sonra aksonal dejenerasyonunun apoptotik glial ve özellikle oligodendroglial hücre ölümüyle birlikte olduğu ve apoptotik OL ölümüne FAS ve p75 hücre yüzey ölüm reseptörü ekspresyonu artışının eşlik ettiği bildirilmiştir (61). Sıçanlarda tam olmayan orta torasik omurilik hasarından sonra nöronlarda ve OL'de apoptotik hücre ölümü saptanmıştır (123).

Travmanın ardından geç dönemde ortaya çıkan apoptotik OL ölümünün kesin mekanizmaları henüz aydınlatılamamakla birlikte inflamatuvar sitokinler ve inflamatuvar hücreler, trofik destek yoksunluğu, glutamat eksitotoksitesisi, sekonder iskemi gibi mekanizmalar bu süreçte rol oynuyor olabilir (287). Sitokinlerin *in vitro* OL ölümüne aracılık ettiği gösterildiği için benzer bir mekanizma travmatik ve iskemik MSS hasarına da katkıda bulunuyor olabilir (107). Apoptotik OL'in aktive mikroglial hücrelerle yakın komşuluğu, apoptotik OL ölümünün mikroglial aktivasyona sekonder olduğunu düşündürmektedir (268). Travmatik MSS hasarından sonra gelişen kronik demiyelinizasyonun MS gibi kronik dejeneratif hastalıklar ile benzer özellikler taşıması olası görünmektedir (73). Omurilik hasar modelinde  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) antagonisti tedavisinin beyaz cevher hasarını koruyucu etki göstermesi AMPA reseptör aktivasyonunun patogeneizde rol oynadığını düşündürmektedir (170).

Omurilik kompresyon travmasından sonra geç dönemde apoptotik OL ölümü miyelin dejenerasyonunu indükleyebilir ve ek aksonal fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Bu süreç (OL ölümü) de travma tedavisinde ek bir hedef olabilir (169, 170). Apoptotik OL ölümünün travmanın ardından geç dönemde görülmesi farmakolojik girişimler için bir avantaj sağlayabilir (268). Bu nedenle çeşitli uyaranlarla oluşan apoptotik OL ölümüne karşı *in vitro* koruyucu etkinlik gösteren maddeler MSS travma tablolarında yararlı etki gösterebilir.

#### 4.3.2. İskemide Oligodendrosit Ölümü ve Beyaz Cevher Etkilenmesi

Deneysel fokal serebral iskemi modelinde beyaz cevherin iskemik hasara duyarlı olduğu gösterilmiştir (231). Bu nedenle inme tedavisinde beyaz cevher hasarını da önleyici farmakolojik tedavi yaklaşımları klinik tablonun düzelmesine katkıda bulunabilir (81).

OL, non-N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamat reseptörleri taşımaktadır ve glutamat reseptörü aracılı eksitotoksositeye duyarlıdır. OL ve öncülerinin AMPA/kainat reseptör eksitotoksitesine çok duyarlı olması, bu mekanizmanın perinatal ve erişkin MSS'de travma ya da iskemiye bağlı beyaz cevher hasarının önemli mekanizmalarından biri olduğunu düşündürmektedir (193, 194). Apoptotik hücre ölümünün efektör moleküllerinden olan kaspaz-11, iskeminin indüklediği OL ölümüne katılmaktadır (266). Anti-oksidan bir madde olan Ebselen'in sıçan fokal serebral iskemi modelinde gri cevher yanısıra beyaz cevheri de koruyucu etkisinin bulunması iskemik beyaz cevher hasarına ve OL ölümüne katılan mekanizmalardan birinin de serbest radikal hasarı olduğunu düşündürmektedir (136).

#### 4.3.3. Hipokside Oligodendrosit Ölümü ve Beyaz Cevher Etkilenmesi

Prematüre bebeklerde beyin beyaz cevherinin hipoksik-iskemik hasarı (periventriküler lökomalazi) sık olarak serebral palsy ile sonuçlanan kronik nörolojik engelliliğin yaygın bir nedenidir. Hipoksik-iskemik ensefalopatili bebeklerde yapılan radyolojik görüntüleme ve pozitron emisyon tomografi (PET) çalışmaları beyin hasarının primer miyelinizasyon alanlarında belirgin olduğunu göstermiştir (17). Gelişmekte olan beynin erişkin beynine göre beyaz cevher etkilenmesine daha duyarlı olmasının nedeni bilinmemekle birlikte geç OL öncüsü hücrelerin erken OL öncüsü hücrelere ve olgun OL'e göre hipoksik-iskemik hasara daha duyarlı olduğu saptanmıştır ve geç OL öncüsü hücrelerin MSS'de ortaya çıktığı dönem beyaz cevherin hipoksik-iskemik hasara en duyarlı olduğu döneme uymaktadır (19). Deneysel perinatal hipoksik-iskemi, periventriküler beyaz cevherde OL öncülerinin apoptotik ve eksitotoksik ölümünü indüklemektedir (218). Hipoksik-iskemik hasar OL öncülerinin ölümü yanısıra miyelin gen ekspresyonunun akut bozulmasına da yol açmaktadır (274).

AMPA antagonisti olan 6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline-2,3-dione (NBQX)'in hipoksik-iskemik beyin hasarında OL ölümünü önleyici etkisinin gösterilmesi hipoksik-iskemik beyaz cevher hasarı ve OL ölümünde rol oynayan mekanizmalardan birinin AMPA/kainat reseptörü aracılı eksitotoksosite olduğunu düşündürmektedir (98).

#### 4.3.4. Alzheimer Hastalığında Beyaz Cevher Etkilenmesi ve Oligodendrosit Ölümü

AH ilerleyici demans ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. AH'nın patolojik özellikleri amiloid- $\beta$  peptid ( $A\beta$ ) içeren nöritik ve serebrovasküler plaklar, nörofibriler yumaklar, aktive glia hücreleri ve nöronal dejenerasyondur (265).  $A\beta$ ,  $\beta$ -Amiloid Prekürsör Protein'den ( $\beta$ APP) oluşan ve 39-43 amino asid uzunluğunda bir fragmandır. Bu peptid, AH hastalarının beyinlerinde nöronal ve vasküler dejenerasyon ile bağlantılı olduğu düşünülen çözünmez fibriler agregatlar oluşturmaktadır (184, 327, 292).

Yakın zamana kadar AH'da daha çok gri cevher patolojisine yoğunlaşmışsa da bu hastalıkta beyaz cevherin de etkilendiğini düşündüren kanıtlar giderek artmaktadır. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) çalışmaları AH'da beyaz cevher hasarının varlığını göstermiştir ve bu hasarın büyüklüğü demansın şiddetiyle bağlantılıdır (258, 222, 255, 281). Görsel ve beyin sapı işitsel uyartılmış potansiyellerinde latans gecikmesini gösteren nörofizyolojik çalışmalar AH'da miyelin disfonksiyonunun olduğunu düşündürmektedir (286). Beyaz cevherde AH patolojisi, miyelin ve akson kaybı (44), OL kaybı ve DNA fragmentasyonudur (44, 164). İnsan beyin otopsi materyallerinde  $A\beta$  depozitlerinin hem gri cevherde, hem de beyaz cevherde hasara uğramış OL ile yakın komşulukta bulunduğu gösterilmiştir (325). AH'da beyaz cevherde gözlenen patoloji gri cevherde nöronal hasarın dolaylı bir sonucu olabilir ya da beyaz cevherde vasküler yetmezliğe bağlı olabilir (44). Bir başka olasılık da beyaz cevher hasarının doğrudan beyaz cevherdeki  $A\beta$  birikimiyle olmasıdır. Beyaz cevherde  $A\beta$  birikimi AH beyin örneklerinde (318) ve AH'nın hayvan modellerinde gösterilmiştir (132). Beyaz cevherde  $A\beta$  birikimi travmatik beyin hasarı, inme, MS, deneysel kafa travması ve deneysel serebral iskemi gibi başka nörolojik hastalıklarda ve hastalık modellerinde de gösterilmiştir (34, 96, 138, 251, 275, 324, 331). Bu nedenle  $A\beta$ 'nin indüklediği OL ölümü bu hastalıkların patogenezine de katkıda bulunuyor olabilir.

$A\beta$ 'nin *in vitro* nöronlar (26, 327), endotel hücreleri (292) ve OL (323) üzerine sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir.  $A\beta$ 'nin 1-40 ve 25-35 fragmanları *in vitro* doza bağımlı olarak OL'in apoptotik ölümüne yol açmaktadır ve oksidatif hasar  $A\beta$  sitotoksitesine katılmaktadır (323).  $A\beta$ , sitotoksik etkisinin yanı sıra OL'i kemokin üretmek üzere aktive etmektedir (141). Bu maddeler lezyon bölgelerine mikroglia göçünü

uyarabilmektedir. AH patogenezinde inflamatuvar süreçlerin (kompleman sistemi, pro-inflamatuvar sitokinler) de rol oynadığını düşündüren kanıtlar giderek artmaktadır ve anti-inflamatuvar tedavi yaklaşımlarının deneysel modellerde ve klinik ön çalışmalarda etkili olduğu gösterilmiştir (4, 28). Ayrıca hipotetik olarak AH'da inflamatuvar süreçlerin nöron hasarı yanısıra OL ve beyaz cevher hasarına da katkıda bulunuyor olması olasıdır. Fakat bu konuda yapılmış herhangi bir *in situ* post-mortem insan çalışması ya da *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışma bulunmamaktadır.

#### 4.3.5. Multipl Skleroz, Oligodendrosit Hasarı ve Ölümü

İnsan hastalıklarında demiyelinizasyonun birçok nedeni olabilir. Primer demiyelinizasyonun başlıca nedenleri genetik (lökodistrofiler), inflamatuvar ve immün (MS gibi), viral ya da toksik nedenlerdir. MS ve hayvan modeli EAE, MSS'nin T hücre aracılı kronik ve inflamatuvar demiyelinizan hastalığıdır (117). Bugünkü bilgilerimize göre MS'un ve diğer demiyelinizan hastalıkların etiyojisi genetik, viral ve otoimmün faktörleri kapsıyor olabilir.

MS lezyonlarının patolojisinde ve immünopatogenezinde belirgin bir heterojenite söz konusudur. MS lezyonlarında aynı hastada değişkenlik düşük olmakla birlikte hastalar arasındaki patolojik tablo değişkenliği çok yüksektir (178, 179, 228). MS'da MSS patolojisinin spektrumu şu şekildedir :

1. Düşük düzeyde OL hasarıyla birlikte primer demiyelinizasyon
2. Demiyelinizasyonun gidişi sırasında yaygın OL kaybı
3. Sekonder demiyelinizasyon ile birlikte OL kaybı

4. Seçici olmayan doku kaybıyla birlikte belirgin makrofaj aktivasyonu. Bu durumda miyelin ve OL hasarı yanısıra akson, nöron ve astrosit hasarı da bulunmaktadır. Aksonal hasar ve kayıp da MS'un belirgin bir özelliğidir ve bu hastalıktaki geri dönüşsüz nörolojik bozulmanın patolojik karşılığı olabilir (96, 177, 196, 297). Deneysel MS modellerinde de nöronal apoptoz gösterilmiştir (204).

Kan-beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğünün bozulması MS gibi MSS demiyelinizan hastalıklarında, EAE'in demiyelinizan formlarında (117, 311, 312) ve virüs ile indüklenen demiyelinizasyonda ilk patolojik belirtidir (244). Bu süreçte aktive T lenfositler önemli bir rol

oynamaktadır (314). Bu hücreler MSS'de inflamasyonu ve doku hasarını başlatmaktadır. T hücreleri, mikrogliya, makrofajlar ve astrositler TNF $\alpha$ , lenfotoksin ve IFN $\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinler üretmektedir. Ayrıca KBB'nin bütünlüğünün bozulması dolaşımdaki antikorların ve özellikle anti-miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) gibi demiyelinizan antikorların MSS'ne geçişini sağlamaktadır (111). Aktive T hücrelerinin MSS'ne geçişiyle birlikte inflamatuvar hücrelerden ve glial hücrelerden TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinler salınmaktadır. Miyelin hasarı ve OL ölümüne bu proinflamatuvar sitokinlerin, komplemanın ve antikorların katılıyor olması olasıdır (27).

Bunların yanısıra başka farklı mekanizmalar da demiyelinizasyon sürecine katılıyor olabilir. OL'in yüksek demir içeriğinin olması bu hücrelerin reaktif oksijen ürünleri ile oksidatif strese girmelerine eğilim yaratmaktadır. Nörotransmitterler ve özellikle glutamat da OL üzerine toksik etki gösterebilir ve demiyelinizasyona yol açabilir (189, 190, 234, 279). Isı şok proteinleri de demiyelinizasyona katılabilmektedir. Bir ısı şok proteini olan  $\alpha$ -B kristallin de MS'da aday ensefalitojenik antijen olabilir (301). Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstrasellüler matriks elemanlarını parçalayabilen ve çinkoya bağımlı enzimlerdir. Bu enzimler MBP'i parçalayabilmektedir (62, 333). MMP'lerden, özellikle MMP-7 ve MMP-9 aktif ve kronik MS lezyonlarında artmış olarak saptanmıştır (70, 180).

Patolojik açıdan OL klasik olarak miyelin hastalıklarında canlılığı bozulan basit bir hücresel hedef olarak değerlendirilmiştir. Fakat yeni kanıtlar bu hücrelerin hedef olmasının yanı sıra inflamatuvar koşullarda sitokin ve NO kaynağı olabildiğini düşündürmektedir (200, 211). Sitokinler MS'da ve onun deneysel hayvan modelleri olan EAE ve Theiler's virüs enfeksiyonunda gözlenen inflamatuvar demiyelinizasyonda önemli aracı maddelerdir (117, 244). Bu patolojilerde endojen MSS hücreleri ya da infiltran makrofajlar ve CD4+ Th1 hücrelerinden salınan proinflamatuvar sitokinler birikmekte ve OL üzerine çok yönlü etkiler göstermektedir (14, 74, 25, 201, 339). Özellikle IFN $\gamma$ , miyelin ve miyelinasyon süreci üzerine belirgin zararlı etki göstermektedir. MS hastalarının IFN $\gamma$  ile tedavisi hastalığın alevlenmesine yol açmıştır (230). MSS'de IFN $\gamma$  eksprese eden transgenik farelerde miyelini etkileyen anormallikler görülmektedir (69, 133). IFN $\gamma$  ya da TNF $\alpha$ , apoptotik OL ölümüne yol açmaktadır (20, 302, 329). OL öncüsü hücreler proinflamatuvar uyaranların indüklediği ölüme daha duyarlıdır (13, 20, 211, 260, 337). IFN $\gamma$  ayrıca OL öncüsü hücrelerin



proliferasyonunu ve farklılaşmasını baskılamaktadır (1). Ayrıca doğal immün yanıt uyaramı olan LPS'in MSS'de hücrel yanıtlar oluşturduğu ve immün infiltratları ve glial hücreleri çeşitli inflamatuvar sitokinler salmaları için tetiklediği gösterilmiştir (110).

TNF $\alpha$ , 17 kDa ağırlığında bir sitokindir. İmmün sistem hücreleri ve MSS'de nöronlar, astrositler ve mikroglia tarafından salgılanmaktadır (217). Hem TNF $\alpha$ , hem IFN $\gamma$  reseptörleri OL soyundan hücrelerde ekspresse edilmektedir ve TNF $\alpha$  reseptörlerinden biri olan TNFR2 gelişime paralel bir ekspresyon artışı göstermektedir (289, 294). İmmatür OL'de hem TNF $\alpha$  hem de IFN $\gamma$ , TNFR1 mRNA düzeyinde artışa yol açmaktadır (85). İnsan TNF $\alpha$  fare hücrelerinde TNFR1'e bağlanmakta, fakat TNFR2'ye bağlanmamaktadır (168).

MS otopsi materyallerinde plaklarda yüksek düzeyde TNF $\alpha$  bulunduğu saptanmıştır (53, 131, 264). TNF $\alpha$  mRNA ekspresyonu ile MS lezyonlarında aktif demiyelinizasyon arasında güçlü bir bağlantı bulunmuştur (33). Klinik alevlenme sırasında MS hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinin TNF $\alpha$  üretiminin arttığı bildirilmiştir (116, 217). T hücre klonlarının ensefalitogenitesi lenfotoksin ve/ya da TNF $\alpha$  üretimleriyle doğru orantılıdır (240). Bazı *in vitro* çalışmalarda bu sitokinin OL üzerine doğrudan hücre hasarı oluşturucu etkisi bulunurken (89, 129, 176, 261, 263, 317), diğer çalışmalarda sitotoksisite saptanamamıştır (51, 92, 197, 203, 276). Ancak sitotoksisitenin saptanamadığı bu çalışmalarda da TNF $\alpha$ 'nın membran depolarizasyonu, potasyum akımlarının azalması ve OL uzantılarının gelişiminin inhibisyonu gibi etkiler oluşturduğu saptanmıştır. TNF $\alpha$  ya da IFN $\gamma$ 'nın sıçanların lomber spinal kord bölgesine tek mikroenjeksiyonu EAE'e benzer bir inflamatuvar yanıtı yol açmaktadır (269). EAE semptomlarının TNF $\alpha$ 'ya yönelik antikörlerle inhibisyonunu gösteren çalışmalar da bu sitokinin patojenik rolünü desteklemektedir (252, 262). Bu sitokinin düzeyinin fosfodiesteraz tip IV inhibitörü olan rolipram tarafından EAE'de azaltılması demiyelinizasyonun ilerlemesini azaltmada etkilidir (112).

TNF $\alpha$ 'nın indüklediği apoptotik hücre ölümü kaspazların aktivasyonu ile oluşmaktadır (209, 290). TNF $\alpha$ 'nın primer OL kültürlerine eklenmesi DNA fragmentasyonunu indüklemekte ve canlı OL sayısını anlamlı olarak azaltmaktadır. Kaspaz-1'in spesifik bir inhibitörü olan asetil-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehid, kaspaz-3'ün spesifik bir inhibitörü olan asetil-

Asp-Glu-Val-Asp-aldehid ve bakulovirüs kaspaz inhibitörü p35'in TNF $\alpha$  ile muamele edilen OL'in canlılığını arttırması kaspaz aracılı hücre ölüm yollarının TNF $\alpha$  ile indüklenen OL ölümünde aktive olduğunu düşündürmektedir (128, 129).

IFN $\gamma$ , T lenfositler ve Natural Killer (NK) hücreler tarafından üretilen ve yaklaşık 15 kDa ağırlığında olan bir sitokindir. Reseptörü çoğu hücre tipinde bulunmaktadır. Bu sitokinin makrofaj yanıtını ve ürünlerini arttırıcı özelliği vardır; Th1 hücre yanıtını arttırırken Th2 hücre yanıtını baskılamaktadır (236, 237). IFN $\gamma$ , oligodendroglial Fas yüzey ölüm reseptörünün ekspresyonunu da arttırmaktadır (238).

Yukarıda sözü edilen proinflamatuvar uyanlarla uyarılan sitotoksik efektör moleküller arasında özellikle NO'in demiyelinizan hastalıklarda gözlenen doku hasarında rolü olduğunu düşündüren kanıtlar giderek artmaktadır (214). Bu patolojilerde anlamlı derecede indüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS) ekspresyonu saptanmıştır (21, 35, 341). EAE'de ve Theiler virüs ile indüklenen demiyelinizasyonda iNOS ekspresyonu hem monosit/makrofaj/mikroglia hücrelerinde (226, 227, 296, 300) hem de reaktif astrositlerde gösterilmiştir (227, 296). MS lezyonlarında iNOS başlıca hipertrofik astrositlerde (35; 43) ve mikroglia da saptanmıştır (21). OL de kültürde LPS/IFN $\gamma$  uyarımının ardından iNOS ekspresyonunda artış ve NO salgılamaktadır (211, 200). Bu bulgunun mikroglial kontaminasyona bağlı olduğu ileri sürülmüşse de (127) CG4 OL hücre hattının da TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 'ya maruz bırakıldığında iNOS protein ve mRNA ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır (31). Hem mikroglial hücrelerden salınan endojen NO, hem de ekzojen NO vericileri tarafından oluşturulan NO kültür ortamında OL ölümünü indüklemektedir (202, 207). LPS/IFN $\gamma$  uyarımıyla OL öncüsü hücrelerde indüklenen ölüm, iNOS inhibisyonuyla kısmen inhibe olmaktadır. Farklılaşmış OL ölümü ise tamamen önlenmektedir. Bu bulgular öncü hücrelerde proinflamatuvar uyanların NO'den bağımsız sitotoksik etkisinin ve antiproliferatif etkisinin olduğunu düşündürmektedir (211). NO vericileri tarafından oluşturulan NO'e farklı duyarlılık değişik farklılaşma evrelerinde bulunan fare OL hücre hatlarında da gösterilmiştir (38, 181). NO sitotoksitesi süperoksitle konjugasyonu nedeniyle peroksinitrit oluşturmak için yüksek konsantrasyonlarda NO'e maruz kalmayı gerektirmektedir (220). NO/peroksinitritin sitotoksik etkileri arasında proteinlerin nitrasyonu, lipidlerin peroksidasyonu, tiol gruplarının S-nitrozilasyonu ve mitokondrial aktivitenin inhibisyonu bulunmaktadır (36). OL'in kısa

sürekli uyarımıyla oluşan düşük konsantrasyonlarda NO toksik olmayabilirse de proinflamatuvar moleküllere kronik maruz kalmaya bağlı sürekli NO üretimi hücre hasarına neden olabilir. Ayrıca azalmış glutatyon ve glutatyon peroksidaz [glutathione peroxidase; (GPX)] düzeylerine bağlı olarak OL serbest radikallerle indüklenen strese çok duyarlı olduğu için ve yüksek demir içerikleri nedeniyle relatif olarak düşük intasellüler NO konsantrasyonları hücre hasarını indüklemeye yeterli olabilir (146, 293).

EAE'de iNOS inhibitörlerinin tedavi edici etki göstermesi, MSS inflamatuvar demiyelinizasyonunda NO'nin zararlı rolünü desteklemektedir (40, 341). Ancak iNOS inhibisyonundan sonra hastalığın şiddetinin arttığını bildiren bir çalışma da vardır (343). EAE'de NO için önerilen bir başka rol de inflamatuvar hücrelerin apoptotik eliminasyonudur (226). Bu nedenle iNOS'in inhibisyonu, EAE'in fazına bağlı olarak yararlı ya da zararlı etki gösteriyor olabilir.

MS ve EAE'de (86, 130, 233) beyaz cevher lezyonlarında OL ölümü sık gözlenmektedir. EAE oluşturulan hayvanlarda MSS'deki lezyonlarda apoptoz bildirilmiştir (45, 86, 233). MS hastalarının ısıyla muamele edilmiş beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri *in vitro* olarak astroglial ve oligodendroglial apoptoza yol açmaktadır (199). Ancak bu patolojik süreçlerde OL apoptozunun mekanizmaları kesin olarak belirlenememiştir. Kaspaz kaskadı bu süreçte rol oynuyor olabilir. Kaspaz inhibitör protein p35 eksprese eden transgenik farelerin OL hücrelerinin sitokinle indüklenen hücre ölümüne *in vitro* dirençli olduğu gösterilmiştir (130). Bu fareler MOG ile immünizasyon yapılarak indüklenen EAE'ye dirençli bulunmuştur. Bu hayvanların lomber omurilik beyaz cevherinde kaspaz-3 eksprese eden ve apoptotik OL sayısında azalma saptanmıştır (130). EAE lezyonlarında hem OL, hem de T hücreleri gibi infiltran hücrelerde kaspaz-11 ekspresyonu yüksek saptanmıştır (128). Kaspaz-3 ve 11'in OL'de kolokalize olması her iki kaspazın OL ölüm sürecine katıldığını düşündürmektedir. Kaspaz-11 defektif farelerin beyninden izole edilen OL'in *in vitro* TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  ve Fas antikoru ile indüklenen hücre ölümüne dirençli olduğu gösterilmiştir (128). Bu farelerin MOG immünizasyonu ile indüklenen EAE'e de dirençli olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu farelerde oluşturulan EAE tablosunda MSS'de interlekin-1beta (IL-1 $\beta$ ) ve IFN $\gamma$  konsantrasyonlarının defektif olmayan farelerdekinden daha düşük düzeylerde bulunması kaspaz-11'in inflamatuvar süreçlere de katıldığını ve kaspaz inhibisyonunun inflamatuvar

süreci de baskıladığını düşündürmektedir (128). Aktif bir demiyelinizasyon atağından sonra lezyonlarda bcl-2 ekspresyonu sağ kalan OL ile doğru orantılı bulunmuştur (160). Bu bulgu da apoptotik OL ölümünün demiyelinizan sürece katıldığını düşündürmektedir.

#### **4.4. Oligodendrosit Hasarını ve Ölümünü Önleyici Farmakolojik Tedavi Yaklaşımları**

Yukarıda sözü edilen nörolojik hastalık tablolarında primer ya da sekonder OL hasarını ve ölümünü önlemeyi hedef alan farmakolojik tedavi yaklaşımları nörolojik tablonun düzelmesine katkıda bulunabilir. Bu amaçla *in vitro* ve *in vivo* olarak denenilen ve etkili bulunan farmakolojik ajanlar ana etki mekanizmalarına göre şu alt gruplara ayrılabilir (Bir ajan birden fazla mekanizmayla da etki gösterebilmektedir):

##### **4.4.1. Anti-oksidan Ajanlar**

Daha önce sözü edildiği gibi MSS'nin çeşitli akut ve kronik dejeneratif hastalıklarında oksidatif stresin patogeneze katıldığına ve OL ölümüne de yol açtığına ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle anti-oksidan maddelerin kullanımı nöronal ve glial hasarı azaltıcı etki gösterebilir. Gerçekten de anti-oksidan bir madde olan Ebselen'in sıçan fokal serebral iskemi modelinde gri cevher yanısıra beyaz cevheri de koruyucu etkisi gösterilmiştir (136). Bir başka anti-oksidan madde olan N-acetyl cystein (NAC) *in vitro* TNF $\alpha$  ile indüklenen OL hasarına karşı koruyucu etkinlik göstermektedir (191).

##### **4.4.2. AMPA Glutamat Reseptör Aktivasyonunu Önleyen Ajanlar**

OL non-NMDA glutamat reseptörleri taşımaktadır ve glutamat reseptörü aracılı eksitotoksositeye duyarlıdır. OL ve öncülerinin AMPA/kainat reseptör eksitotoksitesine çok duyarlı olması bu mekanizmanın perinatal ve erişkin MSS'de travma, hipoksi, otoimmün hasar ya da iskemiye bağlı beyaz cevher hasarının önemli mekanizmalarından biri olduğunu düşündürmektedir (193). Omurilik hasar modelinde (170) ve hipoksik-iskemik beyin hasarında AMPA antagonisti tedavisi OL ölümünü önleyici etki göstermektedir (98).

##### **4.4.3. Anti-inflamatuvar Ajanlar**

Th1 sitokinlerin ekspresyonunun inflamatuvar demiyelinizasyonun progresyonu ile yakından bağlantılı olduğu, oysa Th2 sitokinlerin ekspresyonunun hastalık remisyonuna eşlik

ettiği düşünülmektedir (30, 152). İnterlökin-4 (IL-4), interlökin-10 (IL-10) ve TGFbeta inflamatuvar hücrelerden pro-inflamatuvar sitokinlerin salınmasını baskıladığı için **anti-inflamatuvar sitokinler** olarak tanınmaktadır. Bu sitokinler MSS'de aktive olmuş mikroglia ve astroglianın fonksiyonunu baskılayabilmektedir (97, 225, 239, 256). IL-10 astrositer ve mikroglial proinflamatuvar sitokin ve süperoksid anyonların üretimini baskılamaktadır (108, 256). MS modellerinde bu sitokinlerin tedavi edici etkisi ya da spontan iyileşmeyle doğru orantılı ekspresyonu saptanmıştır (30, 152, 280, 322). Bu özelliklerinin yanısıra IL-10 reseptörü OL hücrelerinde de bulunmakta ve LPS/IFN $\gamma$  ile indüklenen OL ölümünü önlemektedir (211). OL'de IL-4 reseptörü de saptanmış olmakla birlikte bu sitokinin LPS/IFN $\gamma$  ile indüklenen hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi saptanamamıştır (211).

#### 4.4.4. Anti-apoptotik ve Glioprotektif Ajanlar

MSS'nin çok değişik etiyolojili hastalıklarında apoptotik OL ölümü ve beyaz cevher hasarı olmaktadır. Ayrıca *in vitro* birçok etmenin apoptotik OL ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Tablo 1). Bu nedenle anti-apoptotik etki gösteren maddelerin OL hasarına karşı koruyucu etki göstermesi beklenir. Örneğin ciliary neurotrophic factor (CNTF) ve insulin-like growth factor (IGF)'ün TNF $\alpha$  ile indüklenen apoptotik OL hasarına karşı koruyucu etkinlik gösterdiği saptanmıştır (91, 176, 219, 329). CNTF insan OL'i SD ile indüklenen apoptotik hücre ölümüne karşı da korumaktadır (91, 176). Buna karşın nöronal hücre sistemlerinde anti-apoptotik etkinlik gösteren NGF gibi nörotrofinler insan OL kültürlerinde etkili bulunamamıştır (91).

#### 4.4.5. Oligodendrosit Öncülerinin Çoğalmasını ya da Farklaşmasını Uyarıcı Ajanlar

OL öncüsü hücreler normal erişkin MSS'de ve MS lezyonlarında da bulunmaktadır (166). Fakat bu hücreler MS'da demiyelinizasyonunun onarımını sağlayamamaktadır (259, 319). MS dışında diğer MSS hastalıklarında da OL öncüsü hücrelerin endojen proliferasyonunda artış saptanmıştır. Bu durum kompanzatuvar bir savunma mekanizmasının varlığını düşündürmektedir. Bu endojen mekanizmanın, OL öncüsü hücre transplantasyonu ya da endojen OL öncüsü hücrelerin farmakolojik manüplasyonlarla proliferasyon, göç ve farklılaşma özelliklerinin uyarılmasıyla desteklenmesi deneysel tedavi yaklaşımlarından biridir. Bu amaçla *in vitro* OL öncüsü hücrelerin proliferasyonunu uyardığı saptanmış olan

platelet derived growth factor (PDGF) ve basic fibroblast growth factor (bFGF) gibi nörotrofik faktörler kullanılabilir (122).

## 4.5. Olası Oligodendrogliprotektif Ajanlar

### 4.5.1. Transforming Growth Faktör-beta

TGF $\beta$ , MS ve EAE'in remisyon dönemlerinde ekspresyonu arttığı saptanmış olan bir anti-inflamatuvar sitokindir. EAE'de TGF $\beta$  tedavisi iyileşme sağlamaktadır (139). Bu nedenle nöronal hücre sistemlerinde de nöroprotektif olduğu bilinen bu sitokinin oligodendrogliprotektif etkisi de bulunuyor olabilir (342). Bu amaçla bu tez çalışmasında TGF $\beta$  da olası OL koruyucu etkisi test edilen maddeler arasına katılmıştır.

### 4.5.2. İnterferon-beta

IFN $\beta$  son yıllarda MS tedavisinde klinik kullanıma girmiş ve atak sıklığını azaltıcı etkisi gösterilmiş immünomodülatör bir maddedir (15, 82). Bu maddenin immün sistem üzerine etkileri iyi bilinmekle birlikte MSS hücreleri üzerine etkileri ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. IFN $\beta$ 'nın glial NOS üretimini baskıladığı bildirilmiştir (134). Bu madde astroglial NGF üretimini *in vitro* kültür ortamında uyarmaktadır (39). IFN $\beta$ , *in vitro* kültür ortamında nöroprotektif etki de göstermektedir (235). IFN $\beta$ 'nın SD ve TNF $\alpha$  ile indüklenen hücre ölümüne karşı erişkin insan OL'ni *in vitro* koruyucu etki göstermediği saptanmıştır (91). Fakat kemirgen OL kültürlerinde IFN $\beta$ 'nın koruyucu etkinliği olup olmadığını araştıran bir çalışma henüz yayınlanmamıştır.

### 4.5.3. Hepatosit Growth Faktör

HGF embriyogenezisin geç döneminde beynin periventriküler bölgesinde ekspresyon edilmektedir ve bu ekspresyon oligodendroglial proliferasyon ve migrasyonun gelişimsel evresiyle uyumludur (79). Ayrıca HGF ve reseptörü olan c-met MSS'nin gelişimsel aşamalarında da fonksiyon görüyor olabilir (283). HGF, PC12 hücre hattının canlılığını arttırıcı etki göstermektedir (187). HGF, Schwann hücreleri için mitojenik etkili bulunmuştur (159). Sıçan OL hücrelerinde HGF reseptörünün varlığı gösterilmiştir (155). Fakat bu maddenin OL kültürlerinde etkisini araştıran bir çalışma bugüne kadar bildirilmemiştir.

#### 4.5.4. Nerve Growth Faktör

Nörotrofik faktörlerden NGF ve CNTF düzeylerinin MS hastalarının BOS'nda arttığı saptanmıştır (165, 183). Bu nörotrofik faktörlerin up-regülasyonu MS'da nöral ve glial hücrelerin inflamatuvar yanıtı karşı savunma mekanizmalarından biri olarak görünmektedir. CNTF'ün *in vitro* TNF $\alpha$  ile indüklenen OL ölümüne karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (91, 176). NGF de TNF $\alpha$  ile indüklenen OL ölümüne karşı koruyucu etki göstermektedir ve bu etkisine Akt aracılı sinyalleme mekanizmaları aracılık etmektedir (285).

Nörotrofin (NT)'lerin etkisi konusundaki çoğu çalışma bu maddelerin nöronların canlılığını arttırıcı ve farklılaşmasını indükleyici etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. NT ailesi NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 ve NT-6'dan oluşmaktadır. NT'ler hücre proliferasyonu, farklılaşma ve canlılık gibi çeşitli biyolojik yanıtları tetiklemektedir. NT'lerin sinyal iletim yollarına iki tür transmembran glikoprotein aracılık etmektedir: Tirozin kinaz (Trk) reseptör tirozin kinaz ailesi ve p75 düşük affiniteli nörotrofin reseptörü. p75'in ekspresyonu sempatoadrenal hücrelerde TrkA'nın tirozin fosforilasyonunu arttırmaktadır (304). p75 TrkA ile birlikte NGF için yüksek affiniteye bağlanma bölgelerinin oluşturulmasına katılmaktadır (126, 182). NGF'nin hücre yüzeyinde bulunan TrkA'ya bağlanması reseptör dimerizasyonuna neden olmakta ve TrkA'nın intrinsik tirozin kinaz aktivitesinin aktivasyonuna yol açmaktadır (140). NGF, Phosphatidyl Inositol (3) Kinase [PI(3)K]/Akt ve Ras/Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) sinyalleme yollarını aktive ederek hücre canlılığını arttırmaktadır (46, 102).

Kültüre sıçan OL'de p75, TrkA, Trk B ve TrkC bulunmaktadır. Sıçan OL'de, BDNF, NT-3 ve NGF'den en etkin olarak NGF, TNF $\alpha$  ile indüklenen OL ölümünü önlemektedir (285). Astrosit-Conditioned Medium (ACM) da TNF $\alpha$  ile oluşturulan OL ölümünü önlemektedir ve bu etki anti-NGF antikorunun da eklenmesiyle kısmen inhibe olmaktadır (285). Bu bulgu NGF'nin astrositler tarafından üretilen fizyolojik bir anti-apoptotik faktör olduğunu düşündürmektedir. NGF, TNF $\alpha$  tarafından oluşturulan mitokondrial membran potansiyeli kaybını da önlemektedir (285). PI(3)K'nın "downstream" hedeflerinden biri olan Akt'ın OL'de artmış ekspresyonu TNF $\alpha$  ile indüklenen mitokondrial membran potansiyeli kaybını ve hücre ölümünü önlemektedir (285). Ayrıca OL'de dominant-negatif Akt'ın artışı NGF'nin TNF $\alpha$  aracılı OL toksisitesine karşı koruyucu etkisini bloke etmektedir. Bu bulgular

NGF'nin OL'i TNF $\alpha$  ile indüklenen hasara karşı Akt-aracılı sinyalleme mekanizmaları yoluyla koruduğunu göstermektedir (285).

NT'ler tarafından hücre canlılığının sürdürülmesi Trk tirozin kinaz'ın aktivasyonunu gerektirmektedir. Bu aktivasyon Ras'a bağımlı bir yol aracılığıyla sinyal iletmekte ve MAPK'ların (121) ve PI(3)K'in aktivasyonuna yol açmaktadır (328). p75 reseptörü TrkA ile yüksek affinite de bağlanma bölgeleri oluşturmakta ve sinyal iletimi için daha düşük NGF konsantrasyonu yeterli olmaktadır (22). TrkA ekspresyonu olmaksızın p75 olgun kemirgen OL için apoptoz indükleyici etki gösterebilmektedir (58). Fakat bu etki olgun insan OL için saptanamamıştır (163). p75'in hücre ölümünü indükleyici aktivitesine seramid üretimi, Nükleer faktör  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ve c-Jun N-terminal kinaz aracılık ediyor olabilir (37, 58, 101). OL'de TrkA aktivasyonunun p75 aracılı hücre ölümünü önlemesi TrkA ve p75 ekspresyon düzeylerinin NGF'e OL yanıtını belirlediğini düşündürmektedir (334). TrkA ekspresyonu olgun OL'de saptanmıştır (8, 67) ve NGF farklılaşmış OL'in canlılığını arttırmaktadır (67).

PC12 hücreleriyle yapılan çalışmalar endojen reseptör kinaz (ERK)'ların NGF aracılı canlılık sinyallerine katıldığını düşündürmektedir (321). Ancak, primer sempatik nöronlarda ERKs'm bir upstream aktivatörü olan MAPK-1'in inhibitörleri NGF aracılı canlılığı bloke etmemektedir (71, 307). Giderek artan kanıtlar PI(3)K ve Akt'ı aktive eden trofik faktörlerin çeşitli tipte hücre ölümlerine karşı koruyucu etki gösterdiğini düşündürmektedir (103, 153, 188, 192, 299). PI(3)K sinyalleme OL'in ve öncülerinin canlılığı için gereklidir (303). PI(3)K/Akt pro-apoptotik bir protein olan Bad'm fosforilasyonuna neden olmakta ve onun pro-apoptotik fonksiyonunu baskılamaktadır (76, 80). Seramid, TNF uyarısıyla üretilen lipid ikincil sinyalcilerden biridir (156). Seramid PI(3)K'ı downregüle etmekte ve bu da Akt'm inhibisyonuna ve Bad'm fosforilasyonunun azalmasına neden olmaktadır (344). Ayrıca Akt'm inhibisyonu proteaz aktivitesini inhibe eden kaspaz-9'u fosforile edebilmektedir (54). Akt'm aktive formlarının (v-Akt ya da myristoylated Akt) ekspresyonu hücre canlılığının artmasına neden olurken, Akt'm dominant-negatif formunun ekspresyonu SD ya da farklılaşma sırasında hücre ölümünü hızlandırmaktadır (94). Akt'm NGF'ye bağımlı sempatik nöronların canlılığının sürdürülmesine aracılık ettiği de gösterilmiştir (72, 188, 299). Akt aktivasyonu mitokondriden sitokrom c salınmasını inhibe etmektedir (154). TNF $\alpha$ 'nın indüklediği apoptoz PC12 hücrelerinde NGF tarafından önlenmektedir (125). TNF, TNF'e dirençli hücrelerde ise



NFκB aktivasyonunu ve PI(3)K/Akt yolu aracılığıyla Bad fosforilasyonunu uyarmaktadır (229, 232). Bu bulgu TNF gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin hücre tipine bağlı olarak dual bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

#### 4.5.5. Eritropoetin

EPO, 34 kDa ağırlığında, glikoprotein yapıda ve 165 aminoasitten oluşan hematopoetik bir büyüme faktörü-hormon-sitokindir (273). Dolaşımdaki EPO erişkinde böbrekler tarafından üretilmektedir. Oysa fetal yaşamda başlıca EPO üretim yeri karaciğerdir. Dolaşımdaki EPO doku oksijenasyonunun regülasyonunda eritropoezis yoluyla önemli bir rol oynamaktadır. EPO'nin görevi kemik iliğinde eritroid öncü hücrelerin canlılığını, çoğalmasımı ve farklılaşmasını artırarak eritrosit üretimini kontrol etmektir (273). EPO üretimi hipoksiyle regüle edilen tek hematopoetik büyüme faktörüdür. "Knockout" fare çalışmalarıyla gösterildiği gibi EPO ve EPOR fetal yaşam için gereklidir (320). EPOR bulunmayan knockout fare embriyolarında şiddetli anemi ve kardiyak gelişim defektleri olmakta ve bu hayvanlar embriyonik 13.5. günde (E13.5) ölmektedir (320). E12.5'de fetal karaciğer, endokard, miyokard ve beyinde yaygın apoptotik hücre ölümü olmaktadır. EPOR yokluğu beyin gelişimini E10.5 kadar erken dönemde etkilemektedir. EPO ve EPOR'nin beyin gelişimi için de gerekli olduğu bildirilmiştir (338). EPOR knockout fare embriyolarında E10.5'de nöral progenitor hücrelerin sayısı azalmış ve beyinde apoptotik hücre ölümü artmış bulunmuştur (338).

EPO ilk kez Miyake ve ark. tarafından aplastik anemili hastaların idrarından saflaştırılmıştır (210). İnsan EPO geni 1985 yılında izole edilmiş ve klonlanmıştır (137, 172). 1987 yılında da rekombinan EPO kronik böbrek yetmezliğinde aneminin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (93). Başlangıçta EPO'nin özgül olarak ve yalnızca hematopoetik hücreler üzerine etki gösterdiği düşünülürken daha sonraları EPOR fetal ve erişkin yaşamda çok çeşitli hücrelerde saptanmıştır (Tablo 2). EPO ve EPOR'nün kemirgen ve insan beyin dokusunda ve kültürde nöronlarda ve astrositlerde de saptanması ve EPO'nin *in vivo* ve *in vitro* değişik hasar modellerinde koruyucu etkisinin gösterilmesi bu sitokinin hematopoezis dışında sinir sisteminde de biyolojik rollerinin olduğunu düşündürmektedir (273).

**Tablo 2 : Eritropoetin Reseptörü Ekspresse Eden Hücreler :**

<b>Hücre Tipi</b>	<b>Eritropoetin Etkisi</b>	<b>Kaynaklar</b>
Karaciğer stroma hücresi	Mitojenik	223
Endotel hücresi	Mitojenik Kalsiyum mobilizasyonu Endotelin-1 yapımı ve salınımı Anjiyogenik yanıt VEGF ile sinerjistik etkiler	9, 11, 12, 32, 55-57 171, 216, 248, 308 171, 216, 308, 326
Düz kas hücresi	Kalsiyum mobilizasyonu Kasılma	10, 212
Kardiyomyosit	Mitojenik Gelişimsel etkiler	310, 320
Enterosit	Migrasyon Artmış timidin alımı Apoptotik hücre ölümünün azalması	144, 224
Plasental sinsisyotrofoblast		257
MSS hücreleri	Kalsiyum mobilizasyonu	158, 185, 186 213
Nöronlar		
Aminerjik	Monoamin konsantrasyonu artışı	
Kolinergik	Kolinasetil transferaz aktivitesi artışı trofik etkiler	284
Astrositler	Apoptotik hücre ölümünün azalması	
Testiküler Leydig hücresi	Testosteron salgılanmasının artışı	99, 100, 206
Schwann hücresi	?	52

#### **4.5.5.1. Sinir Sisteminde Eritropoetin ve Eritropoetin Reseptörünün Oksijene Bağımlı Ekspresyonu**

Beyin de dahil olmak üzere çoğu dokuda EPO gen ekspresyonu “hypoxia-inducible factor-1” (HIF-1) tarafından regüle edilmektedir (273). Hipoksi gibi çeşitli stressörler HIF-1’i

aktive etmektedir. EPO gen ekspresyonu doku tipine özgül bir biçimde ve en güçlü olarak böbrek ve beyinde indüklenebilmektedir. Oysa uterusda EPO mRNA yalnızca östrojenin varlığında indüklenebilmektedir (65). İlginç olarak beyinde kendisi de nöroprotektif etki gösteren 17 $\beta$ -östradiol hipoksinin EPO mRNA ekspresyonu üzerine etkisini arttırmaktadır (65). EPO ve EPOR mRNA hipokampal nöron kültürlerinde hipoksi ile indüklenebilmektedir (167). Hipoksi *in vivo* da EPO mRNA ekspresyonunu uyarmaktadır. Hipoksiye (% 8 oksijen) 2 saat maruz bırakılan sıçanlarda hipokampal EPO ve EPOR ekspresyonu belirginleşmektedir. Beyinde anemik stres sonrasında da EPOR gen ekspresyonu indüklenmektedir (66). Orta beyin arterinin tıkanmasından sonra iskemik penumbra alanında EPOR gen ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (253). EPOR mRNA ekspresyonu artışı nöronal EPOR proteini yapımına da yansımaktadır ve hipoksiye maruz bırakılmış hipokampal nöron kültürlerinde nöronal uzantılarda belirgin olarak ekspresye olmaktadır. İnsan beyin infarktı örneklerinde de nöronal uzantılarda benzer EPOR ekspresyonu artışı saptanmıştır (272). Hipoksiye maruz bırakılan sıçan hipokampal nöronlarında EPOR ekspresyonu artışının ekzojen EPO kullanımıyla azalmaması EPOR hedefli klinik tedavi yaklaşımlarının endojen EPO nöroprotektif sisteminde yanıtızlığa yol açacağı düşüncesini zayıflatmıştır (167).

#### **4.5.5.2. Beyinde Eritropoetin ve Eritropoetin Reseptör Ekspresyonu: Gelişim Sırasında ve Hasardan Sonra Değişen Ekspresyon**

İnsan embriyolarında farklılaşmamış nöroepitelyal hücreler hem EPO hem de EPOR ekspresye etmektedir (143). Ekspresyon örneği gelişimin daha geç evrelerinde farklılık göstermektedir. Geç fetal yaşam döneminde EPO astrositlerde, EPOR nöronlarda ekspresye edilmektedir (143). Erişkin insan beyinde ise nöronlarda ve astrositlerde yalnızca zayıf EPO ve EPOR ekspresyonunun olduğu bildirilmiştir (143, 272).

İnsan beyinde iskemi ve/ya da hipoksi sonrası EPO ve EPOR ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada inmeden sonraki ilk beş günlük akut dönemde EPO'nun vasküler dokuda ve inflamatuvar hücrelerde, EPOR'nun infarkt alanında ve peri-infarkt alanında kan damarlarında ve nöronal ve astrositer uzantılarda görüldüğü bildirilmiştir (272). Daha eski infarkt dokularında (18. günden sonra) EPO ve EPOR ekspresyonu en güçlü olarak reaktif glia hücrelerinde saptanmıştır. Akut hipoksik beyin hasarında kan damarlarında EPO ve nöronal uzantılarda EPOR güçlü ekspresyon göstermektedir. Nöronal uzantılarda EPOR

ekspresyonunun artışı nöronların metabolik stres altında EPO'ye yanıtının artışı yansıtır olabilir. İnmeden sonra uzun süreli hipoksi astrositer EPO üretiminde süregelen bir artışı indüklemektedir (272). Bu durum tekrarlayan hipoksik/iskemik olaylarda hızla mobilize edilebilen astrositer bir EPO kaynağının varlığını düşündürmektedir ve iskemi sonrası edinilmiş bir relatif iskemik toleransı yansıtır olabilir.

#### 4.5.5.3. Eritropoetinin Nöroprotektif Özellikleri

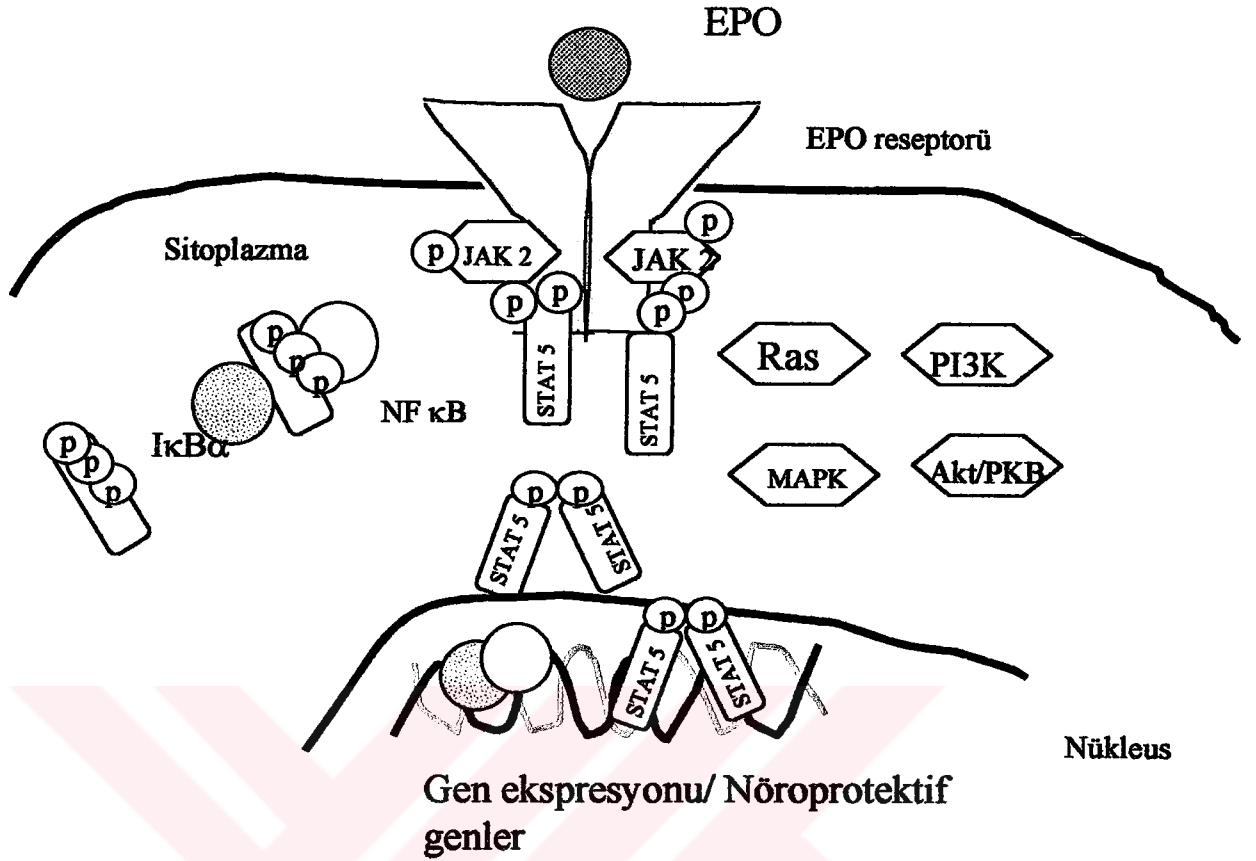
Değişik bağımsız araştırma grupları EPO'in kültürde nöronları glutamat ve AMPA toksisitesine karşı koruduğunu (29, 213, 270) ve kemirgen stroke modellerinde iskemik nöronal hasarı ve nörolojik disfonksiyonu azalttığını (29, 41, 253, 254) göstermiştir.

Sistemik EPO uygulaması serebral iskeminin yanısıra spinal iskemi (75), subaraknoid kanama (6, 120), omurilik travması (118), mekanik kafa travması, eksitotoksik hasar ve nöro-inflamasyon modellerinde de koruyucu etki göstermektedir (41). EPO'in farelerde 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) ile indüklenen Parkinsonizm modelinde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (113). İskemik hasardan sonra beyin dokusunda EPO ve EPOR gen ekspresyonunda belirgin değişiklikler olduğu bildirilmiştir (29, 253). Endojen EPO'in soluble EPOR ile nötralizasyonu ekzojen EPO'in glutamat toksisitesine karşı koruyucu etkisini önlemekte (213) ve *in vivo* iskemik beyin hasarını arttırmaktadır (254). Bu bulgular EPO'in nöroprotektif etkisinin özgüllüğünü göstermektedir.

#### 4.5.5.4. Eritropoetinin Protektif Etkisinin Mekanizmaları

EPOR sitokin reseptör süperailisine aittir ve bu aileye ait moleküllerin kullandığı hücre içi sinyalleme mekanizmaları ayrıntılı olarak bilinmektedir (273). EPO reseptörüne bağlandığında EPOR homodimerize olmakta ve reseptöre bağlı janus tirozin kinaz-2 (JAK-2) otofosforilasyona uğramaktadır. JAK-2 aktivasyonu birkaç down-stream sinyalleme yolunun fosforilasyonuna yol açmaktadır (77, 273) (Şekil 3):

1. Ras-MAPK
2. PI (3) K
3. "Signal transducers and activators of transcription" (Stat)-5 transkripsiyon faktörü



**Şekil 3. Eritropoetin ve hücre içi sinyalleme mekanizmaları (273)**

Hedef hücrede EPOR uyarımının net etkisi proliferasyon, apoptotik hücre ölümünün inhibisyonu ve eritroblastlara özgül olarak hücre farklılaşmasıdır. Hematopoetik hücre hatlarında tanımlanan EPO sinyalleme yollarının nöronal hücrelerde de fonksiyonel olduğu gösterilmiştir (271). Bu sinyalleme yolları EPO'in nöroprotektif etkisini göstermesi için gereklidir. Çünkü MAPK ve PI(3)K yollarının spesifik inhibitörleri EPO'in hipoksi ile indüklenen hücre ölümüne karşı koruyucu etkinliğini büyük ölçüde önlemektedir (271). Son zamanlarda NFκB yolunun da EPO'in nöroprotektif etkisine aracılık ettiğini düşündüren *in vitro* bulgular bildirilmiştir (77, 83).

Deneysel fokal ya da global serebral iskemi modellerinde EPO tedavisinin apoptotik nöron ölümünü azaltması EPO'in nöroprotektif etkisine anti-apoptotik etkinin de aracılık ettiğini düşündürmektedir (254, 271). Endojen üretilen EPO'ü nötralize etmek için salgılanmış durumdaki EPOR'nün intrahipokampal verilmesi global serebral iskemi modelinde CA1

bölgesindeki nöronların yaygın apoptotik ölümüne yol açmaktadır (254). Bu bulgu endojen EPO'nun intrinsik anti-apoptotik etkisini göstermektedir. Sıçan spinal motor nöron kültüründe EPO, SD ya da kainik asid ile indüklenen apoptotik hücre ölümünü inhibe etmektedir (271). Bu modelde koruyucu etki gösterebilmesi için EPO'nun hasardan 24 saat önce verilmesi gerekmektedir ve bu bulgu EPO'nun anti-apoptotik etkisini gösterebilmesi için gen ekspresyonunun gerekli olduğunu göstermektedir. Bu koşullarda kültür ortamında hasar oluştuktan sonra EPO bulunmasa da hasardan 24 saat önce uygulanan EPO'nun koruyucu etkinliği 3 gün sürmektedir. Yeni çalışmalar ile EPO'nun anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xl ekspresyonlarını *in vitro* ve *in vivo* arttırdığı gösterilmiştir (83, 313).

EPO'nun nöronları koruyucu etkisi doğrudan hücre canlılığını etkilemesiyle sınırlı değildir. EPO kültür koşullarında nörotrofik etki de göstermektedir (157, 271, 284). Bu nörotrofik etki EPO'nun *in vivo* uzun süreli nöroprotektif etki de gösterebileceğini düşündürmektedir. Eski iskemik lezyonlarda reaktif astrositlerin EPO immünreaktivitesi göstermesi EPO'nun rejeneratif ve uzun süreli koruyucu etkisi açısından önemli olabilir (272).

EPO'nun nöroprotektif etkisine anti-apoptotik ve nörotrofik etkilerinin yanısıra başka etki mekanizmaları da katkıda bulunuyor olabilir. Bunlar EPO'nun antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri ve hücre içi kalsiyum metabolizması ve NO oluşumu üzerine modüle edici etkiler ve glutamat salınımının inhibisyonu (151) olabilir. EPO nöronal hücre hatlarında voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu aracılığıyla hücre canlılığını modüle etmekte (158) ve nöronların glutamat toksisitesine direncini arttırmaktadır (213). Bu modelde glutamat toksisitesi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışına bağımlı değildir ve NO-aracılı serbest radikaller aracılığıyla oluyor gibi görünmektedir (213, 214). Bu nedenle NO aracılı serbest radikal oluşumunun baskılanmasının ya da NO toksisitesinin antagonize edilmesinin EPO'nun nöroprotektif etkisinin temelinde bulunduğu ileri sürülmüştür (254). Global serebral iskemide EPO'nun NO oluşumunu *in vivo* inhibe ettiği bildirilmiştir (48).

EPO, eritrositlerde lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ve sitozolik katalaz ve GPX enzim aktivitelerinin restorasyonu aracılığıyla oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermektedir (64). EPO kültür ortamında fare astrositlerinde GPX üretimini anlamlı ve doza

bağımlı olarak uyarmaktadır (114). MPTP ile indüklenen deneysel Parkinsonizm modelinde substantia nigra bölgesine uygulanan EPO, MPTP ile indüklenen GPX azalmasını düzeltmektedir (114). Bu bulgular EPO'nin nörodejeneratif süreçlerde koruyucu etkisinin mekanizmalarından birinin anti-oksidan savunma sistemini güçlendirmesi olduğunu düşündürmektedir.

Deneysel kafa travmasının sıçan modelinde sistemik EPO tedavisinin inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (41). Bu bulgu EPO'nin anti-inflamatuvar bir etkisinin de olabileceğini düşündürmektedir. EAE modelinde sistemik EPO tedavisi klinik tabloda belirgin iyileşmeye yol açmıştır (41). Fakat bu çalışmada EPO'nin inflamasyon ve OL ölümü üzerine etkisi değerlendirilmemiştir. Ayrıca bugüne kadar EPO'nin *in vitro* OL hasarını önleyip önlemediği araştırılmamış ve OL'de EPOR'nün varlığı bildirilmemiştir. İnsan OL kültürlerinde EPO ve EPOR saptanamamıştır (215). Fakat kemirgen OL kültürleriyle yapılan bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Yeni bir çalışma, sıçan spinal travma modelinde spinal beyaz cevherde geç dönemde görülen apoptotik OL ölümünü sistemik ve kronik EPO tedavisinin tamamen önlediğini göstermiştir (118). EPO'nin bu etkisinden sorumlu olduğu düşünülen mekanizmalar NO üretimini baskılaması, anti-inflamatuvar etkisi ve doğrudan anti-apoptotik etkisidir.

Neovaskülarizasyonun uyarılması EPO tarafından aktive edilen bir başka koruyucu mekanizma olabilir. Bu yolla EPO, metabolik olarak hasara uğrayan dokuda perfüzyonu korumaya yardımcı olabilir. Beyin endotel hücreleri EPOR ekspresse etmektedir (326) ve EPO uygulamasına proliferasyon ile yanıt vermektedir (326). EPO tedavisinden sonra uyarılmış anjiogenezisin varlığı *in vivo* ve *in vitro* deneylerde saptanmıştır (248). Sıçan subaraknoid kanama modelinde EPO'nin beyin kan akımı otheregülasyonunu normalize ettiği saptanmıştır (277).

EPO'nin *in vitro* ve *in vivo* olarak ortaya konan bir başka etkisi de nöronal öncü hücrelerin çoğalmasını uyarmasıdır (nörogenezis) (267, 338). EPO'nin bu etkisi de özellikle kronik hastalık modellerinde ve kronik EPO uygulamasında nöroprotektif etkisine katkıda bulunuyor olabilir. Fakat EPO'nin OL öncüsü hücrelerin çoğalması, canlılığı ve farklılaşması üzerine etkileri henüz araştırılmamıştır.

#### **4.5.5.5. Eritropoetin'in İnsanda Nöroprotektif Bir Ajan Olarak Kullanımı**

Yukarıda özetlenen literatür bilgisi EPO'in çoğul nöroprotektif mekanizmalara sahip bir ajan olduğunu göstermektedir. Ayrıca EPO ve EPOR'nün insan MSS'de ekspresse olması (142, 143, 272) ve EPO'in milyonlarca hastada çok iyi tolere edilerek kullanılan bir ilaç olması nedeniyle bu ajanın nöroprotektif amaçlarla klinik uygulamaya girmesi olasılığı yüksek görünmektedir. EPO'in nöroprotektif amaçla klinik uygulamada kullanımı akut (inme) ve kronik (Parkinson hastalığı, AH, amyotrofik lateral skleroz) nörodejeneratif hastalıklardan MS gibi demiyelinizan hastalıklara ve şizofreni gibi psikiyatrik hastalıklara kadar geniş bir kullanım alanını kapsayabilir (273).





## 5. Gereç ve Yöntemler

### 5.1. Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan laboratuvar gereçleri şunlardır : Karbondioksit enkübatörü, enkübatör, faz-kontrast mikroskop, floresan mikroskop, ışık mikroskobu, image analyzer, thermal cycler, laminer flow kabinet, Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) plak okuyucusu, Eagle eye, elektroforez aygıtı, güç kaynağı, santrifüj, derin dondurucu (- 20 ve - 70°C), likid nitrojen tankı, buzdolabı, Pasteur fırını, otoklav, cytospin aygıtı, spektrofotometre, shaker, aspiratör, hibridizasyon fırını, mikrodalga fırın, heater, hot plate, pHmetre, hassas terazi,

### 5.2. Deneysel Hayvanları

Bu tez çalışmasında BALB/c suşu yenidoğan fareler kullanıldı. Deneysel hayvanları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarlarında standart koşullarda beslenmekte ve barındırılmaktadır. Fareler APEC fare kafeslerinde ve standart yem ve suya serbestçe erişebilecekleri koşullarda tutuldu. Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesinden etik kurul onayı alındı (23.2.1999 tarihli ve 99/02-03 sayılı karar).

N20.1 fare transforme immatür oligodendroglial hücre hattı primer olarak Kaliforniya Üniversitesinden Dr. Anthony Campagnoni tarafından geliştirilmiştir (305). Bu tez çalışması için N20.1 hücre hattı Paris Üniversitesinden Dr. Monique Dubois-Dalc'tan sağlandı.

### 5.3. Hücre kültürü (primer kültür, N20.1)

#### 5.3.1. Lamellerin Hazırlanması

IF boyama için 18 x 18 mm boyutta cam lameller kullanıldı. Lamellerin temizliği şu basamaklar izlenerek yapıldı :

1. Bir beher içine alınan lamellerin üzerine 6 N hidroklorik asid eklendi ve bir saat çekerocakta bekletildi.
2. Lameller daha sonra çeşme suyu ile yıkandı.
3. 10 dakika kadar sonifikasyon yapıldı.
4. % 70'lik alkol ile birkaç kez yıkama yapıldı.
5. Lameller % 100 alkol içerisinde konularak bütün gece bekletildi.

6. Lameller ertesi gün alkolden çıkarılarak distile su ile yıkandı

7. Pasteur fırınında kuru sterilizasyon yapıldı.

### 5.3.2. Kültür Kapları

Mikst glial kültürler için 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskları (Greiner), N20.1 kültürleri için 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskları, apostain boyaması için 6 kuyucuklu kültür plakları (Greiner), MTT ve LDH testleri için 24 ya da 96 kuyucuklu kültür plakları (Greiner), IF boyama için ise 35 mm'lik kültür petri kapları (Greiner) içine konulan lameller kullanıldı.

### 5.3.3. Kültür Kaplarının ve Lamellerin Polilizin İle Kaplanması

Kültür kaplarının ve lamellerin kaplanmasında poli-L-lizin (PLL) ya da poli-D-lizin (PDL) (Sigma) kullanıldı. 10 µg/ml konsantrasyonda PDL ya da PLL eklenen kültür kapları ve lameller laminar flow kabinet altında bir saat süreyle bekletildikten sonra kaplama malzemesi çekilerek kültür kapları ve lameller birkaç kez steril, distile su (Biochrom KG) ile yıkandı. Ardından laminar flow kabinet altında kültür kaplarının kapakları açık bırakılarak kurutuldu ve ağızları parafilm ile sarılarak hücrelerin ekimine kadar saklandı.

### 5.3.4. Deney Hayvanlarından Beyin Dokularının Çıkarılması

Primer OL kültürlerinde her bağımsız deney için bir anneden yeni doğan bütün yavrular kullanıldı. Deney gününden bir gün önce deneyde kullanılacak cerrahi aletler, şişeler ve naylon filtreler otoklav ile sterilize edildi. Beyin dokularının çıkarılması Deney Hayvanları Laboratuvarında bulunan laminar flow kabinet altında gerçekleştirildi. Bu işlemden önce kabinet UV lambası en az 15 dk kadar açık tutuldu. Yenidoğan fare yavruları, % 70'lik alkol ile yıkandıktan sonra steril bir makas ile baş ayrılarak sakrifiye edildi. Bir başka steril makas ile baş derisi kesilerek yanlara ayrıldı ve kafatasına erişildi. Üçüncü bir steril makas ile kafatası açıldı. Beyin steril bir spatül ile alınarak steril gazlı bez üstünde yuvarlandı. Bu işlem kültürlerde fibroblast kontaminasyonu kaynağı olabilecek meninkslerin ve büyük kan damarlarının uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Beyin dokuları daha sonra soğuk (buz üzerinde) transport (taşıma) ortamının içine konuldu. Bu transport ortamı % 10 oranında ve ısıyla inaktive edilmiş (56°C sıcaklıkta su banyosu içinde 30 dk tutularak) fetal dana serumu (Biochrom KG) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren Dulbecco's Minimal Essential medium (DMEM)/F12 kültür ortamından (Biochrom KG) oluşmaktadır.

### 5.3.5. Beyin Dokusunun Dissosiasyonu

Beyin dokularının dissosiasyonu Tıbbi Biyoloji ve Genetik Abd'da bulunan laminer flow kabinet altında gerçekleştirildi. Bu işlemde önce kabinet UV lambası en az 15 dk açık tutuldu. Beyin dokuları steril penset ile taşıma ortamından alınarak buz üzerine konulan steril 35 ya da 60 mm'lik petri kaplarına aktarıldı. Dokuların üzerine kurumamaları için az miktarda soğuk ve taze kültür ortamı eklendi. Dokularda kalmış olabilen kan damarları steril penset ile temizlendikten ve kültür ortamıyla yıkandıktan sonra bir başka steril petri kabına aktarıldı. Daha sonra beyin dokuları iki steril bistüri ile 1 mm<sup>3</sup>'den büyük olmayacak biçimde parçalara ayrıldı ("mincing" işlemi). Daha sonra beyin dokusu parçaları 140 µm aralıklı steril ve 50 ml'lik beher üzerine gerilmiş naylon filtreden (Millipore) süzüldü. Süzme işleminden önce naylon filtre az miktarda kültür ortamıyla ıslatıldı. Süzme işlemi sırasında steril 2 ml'lik bir plastik enjektörün piston bölümünün arkası ile doku parçalarına hafifçe mekanik baskı uygulandı. Naylon filtre üzerine ara ara kültür ortamı eklenerek doku parçalarının filtreden geçişi kolaylaştırıldı.

Yukarıda tanımlanan mekanik dissosiasyon işleminin yanısıra ön deneylerde ek olarak enzimatik dissosiasyon tekniği de uygulanmıştır. Bu amaçla doku süspansiyonu mincing aşamasından sonra içerisinde manyetik stir bulunan steril şişelere aktarıldı ve eşit hacimde % 0.05'lik Tripsin-EDTA solüsyonuyla (Biochrom KG) karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dk kadar süreyle enkübe edildi. Enkübe işleminin sonunda doku süspansiyonuna serum içeren kültür ortamı eklenerek tripsinin etkisi sonlandırıldı ve şişeden alınan doku süspansiyonu yukarıda tanımlandığı gibi filtreyle süzüldü. Orijinal deney protokolünü tanımlayan yazarlara göre enzimatik dissosiasyon basamağı elde edilen hücre sayısı ve canlılığı açısından ek bir olumlu katkı sağlamadığı gibi mekanik dissosiasyon yöntemiyle hücre eldesi daha fazla olmaktadır (78). Enzimatik dissosiasyon işleminin diğer dezavantajları ise dokuda kalabilen damar yapılarından enzimatik sindirimle ayrılan fibroblastların glia kültürünü kontamine edebilmesi ve enzim işleminin hücre yüzey antijenlerinin ve moleküllerinin ekspresyonunu baskılayabilmesidir (23, 147). Bu gerekçelerle esas deney aşamalarında enzimatik dissosiasyon basamağı uygulanmadı.

### 5.3.6. Mikst Glial Hücre Kültürlerinin Kurulması

Süzme işleminin ardından beherde toplanmış olan doku süspansiyonu 12 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve +4°C sıcaklıkta, 200 g devirde, 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant atılarak tüplerin dibinde bulunan pellet 37°C sıcaklığa getirilmiş kültür ortamıyla resüspende edildi. Önceden polilizin ile kaplanmış 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına 3 beyin/flask/10 ml kültür ortamı yoğunlukta ekim yapıldı. Bu ekim yoğunluğu yüksek bir değerdir ve oligodendroglial hücre soyundan olan hücrelerin mikst glia kültüründe gelişimi için önemli görünmektedir (78). Kültür kapları 37°C sıcaklığa ayarlanmış, nemli ve %5 oranında karbondioksit içeren karbondioksit enkübatörüne konuldu. Hücrelerin kültür kabına yapışması için kültür flaskları ekimden sonraki ilk iki gün yerinden oynatılmadı. Kültürlerin ortamı 3. gün taze kültür ortamıyla değiştirildi. Bu işlem daha sonra her iki günde bir tekrarlandı. Kültür ortamının bileşimi daha önce belirtilen taşıma ortamının bileşimiyle aynıdır. Kültürler her gün makroskobik olarak (ortam rengi, kontaminasyon açısından) gözle ve her besleme gününde mikroskobik olarak faz-kontrast inverted mikroskop altında hücrelerin gelişimi, kültürlerin sıklık (confluency) durumu ve kontaminasyon açısından değerlendirildi.

### 5.3.7. Sallama-aderans Yöntemiyle Saf Oligodendrosit Kültürlerinin Kurulması

Mikst glial hücre kültürlerinin ekimden sonraki 6. günde sıklığa yakın (near-confluent) bir durum aldığı ve zemindeki gri astrosit tabakasının üzerinde faz-karanlık, yuvarlak ve bipolar küçük uzantıları olan OL öncüsü hücrelerin (pre-OL) ortaya çıktığı gözlenmektedir. 8.-9. günlerde kültürler tamamen sıkışık duruma gelmekte ve pre-oligodendroglial hücrelerin sayısı belirgin olarak artmaktadır.

Mikst glia kültürlerinden oligodendroglial hücrelerin ayrıştırılmasında kullanılan sallama-aderans yönteminin ilkesi farklı tipte glial hücrelerin kültür kabına aderans özelliğinin farklı olmasına dayanmaktadır. Sallama işlemiyle astrosit tabakasının üzerinde bulunan ve gevşek tutunmuş pre-oligodendroglial hücreler, mikrogial hücreler ve mitoz evresinde bulunan astroglial hücreler ayrılarak yüzer duruma geçmektedir. Sallama işleminin hızı ve süresi arttırılırsa elde edilen hücre sayısı OL popülasyonunun saflığının azalması pahasına artmaktadır. 9. günden sonraki dönemde yapılan sallama işlemlerinde zemindeki astrosit tabakasından da ayrılma olabilmektedir. Ayrıca mikst glia kültüründe astrositlerden

salman trofik faktörlerin desteğiyle zaman içerisinde farklılaşma süreci ilerleyen oligodendroglial hücrelerin alttaki astroglia tabakasına yapışma gücü artmaktadır ve sallama işlemiyle ayrılmaları zor olmaktadır ya da astrosit tabakasıyla birlikte ayrılmaktadır.

Sallama işleminden sonra yüzer duruma geçen hücreleri içeren hücre süspansiyonu kaplanmamış petri kabına aktarıldığında mikrogial hücreler aderans özelliklerinin güçlü olması nedeniyle hızla kültür kabına yapışmaktadır. Astroglial hücrelerin aderans özelliği mikrogial hücrelerinkinden daha zayıftır, fakat oligodendroglial hücrelerinkinden daha güçlüdür. Bu nedenle aderans işlemi ne kadar uzun tutulursa elde edilen (yüzer durumda kalan) oligodendroglial hücre popülasyonunun saflığı hücre eldesinin az olması pahasına yüksek olmaktadır.

Orijinal olarak ilk kez yenidoğan sıçan OL kültürü için tanımlanan sallama-aderans yöntemi (78) daha sonra başka birçok araştırmacı tarafından modifiye edilerek hem yenidoğan sıçan, hem de yenidoğan fare OL kültürlerinin kurulmasında kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında uygulanan sallama-yapışma yönteminin ayrıntıları basamak basamak aşağıda sunulmuştur :

1. Ekimi izleyen 8. ya da 9. günde mikst glia kültürlerinin ortamı taze kültür ortamıyla yenilendi.

2. Kültür flasklarının kapakları sıkıca kapatılarak parafilmle sarıldı.

3. Kültür flaskları ortam sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış shaker aygıtına yerleştirildi.

4. 150 rpm devirde 30 dakika süreyle sallama işlemi uygulandı.

5. Sallama işleminin ardından yüzer duruma geçen hücreler toplandı ve kültürlerle taze kültür ortamı eklendi. Faz-kontrast inverted mikroskop altında incelenen kültürlerde pre-oligodendroglial hücrelerin bir bölümünün astrosit tabakasından ayrılmış olduğu gözlemlendi. Kültürler enkübatöre geri konuldu. Bu mikst glial kültürlerde pre-oligodendroglial hücreler astrosit desteğiyle bir-iki gün içinde tekrar çoğalmakta ve sallama-yapışma yöntemiyle tekrar toplanabilmektedir.

6. Hücre süspansiyonu 30 µm aralıkları olan steril naylon filtreden (Millipore) süzüldü. Bu işlem sallama sonrası yüzer duruma geçebilen astrosit kümelerinin filtrede kalarak hücre süspansiyonundan ayrıştırılmasını sağlamaktadır.

7. Süzme işleminin ardından santrifüj tüplerine aktarılan hücre süspansiyonu +4°C sıcaklıkta, 200 g devirde, 5 dk süreyle santrifüj edildi.

8. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılarak tüplerin dibinde bulunan pellet 37°C sıcaklığa getirilmiş kültür ortamıyla resüspende edildi. Süpernatant, olabilecek hücre debrislerinin uzaklaştırılması amacıyla 0.45 µm'lik filtreye süzüldü ve daha sonra mikst glia-conditioned media (MGCM) olarak kullanıldı. Bu süzme işleminin amacı debrisleri uzaklaştırmaktır. Kültür ortamı ve MGCM 1:1 oranında karıştırılarak ekim ortamı olarak kullanıldı. Hücre süspansiyonu 4-5 ml hacimde 60 mm'lik steril petri kabına aktarılarak 37°C sıcaklığa ayarlanmış, nemli ve %5 oranında karbondioksit içeren karbondioksit enkübatörüne konuldu.

9. 15 dakika enkübasyon süresinin ardından petri kabı faz-kontrast inverted mikroskop altında incelendi ve hücrelerin bir bölümünün kültür kabına yapışmış olduğu (mikroglia ve astrosit), bir bölümünün ise yüzer durumda olduğu (egemen olarak pre-oligodendroglial hücreler) gözlemlendi.

10. Yüzer durumda bulunan hücreler tübe aktarılarak yapışma işlemi sonlandırıldı ve hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı ve hücre canlılığının değerlendirilmesi için 0.2 ml hücre süspansiyonu örneği 0.4 ml fosfatlı tampon solüsyonu (phosphated buffer solution; PBS) ve 0.4 ml % 5'lik tripan blue solüsyonuyla karıştırıldı. Bu karışımdan pipetle Thoma lamına alınan 1-2 damla örnekten hücre sayımı yapıldı.

11. Pre-oligodendroglial hücre süspansiyonundan önceden polilizin ile kaplanmış kültür kaplarına ya da lamellere ekim yapıldı. LDH ve MTT testleri için 24 ya da 96 kuyucuklu kültür plaklarına, apostain boyaması için 6 kuyucuklu kültür plaklarına, IF boyama için 35 mm'lik petri kapları içinde bulunan lamellere, RT-PCR incelemesi için ise 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına ekilen hücreler kullanıldı. Ekim yoğunluğu 24 kuyucuklu plaklar için 10<sup>5</sup> hücre/cm<sup>2</sup> /kuyucuk/ml, 96 kuyucuklu plaklar için 5 x 10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk/200 µl, 6 kuyucuklu plaklar için 5 x 10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk/2 ml, 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskları için 2 x 10<sup>6</sup> hücre/flask/ 5 ml olarak ayarlandı. Lamellere ise 10<sup>4</sup> hücre/lamel/ 0.5 ml yoğunlukta ekim yapıldı.

### 5.3.8. Mikst Glia Kültürlerinden Astrosit Kültürlerinin Hazırlanması

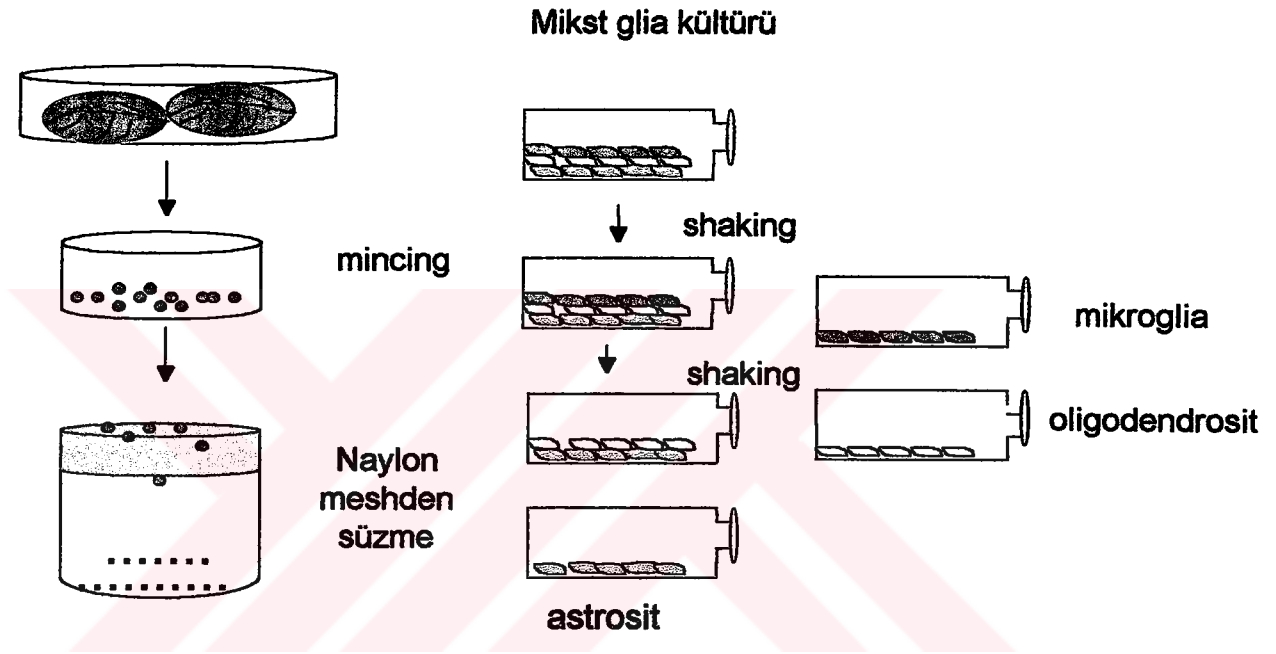
EPOR mRNA ekspresyonunun RT-PCR yöntemiyle değerlendirilmesinde ve IF anti-EPOR boyama deneylerinde pozitif kontrol hücre olarak bazal EPOR protein ve mRNA ekspresyonu gösteren astroglial hücreler kullanıldı. Bu amaçla fare mikst glia kültürlerinden

astrosit izolasyonu yapıldı. Kısa süreli sallama yöntemiyle mikst glia kültürlerinden OL izolasyonu yapıldıktan sonra kültürler taze kültür ortamı konuldu ve sallama işlemi 24 saat daha sürdürüldü. Bu işlemin amacı kısa süreli sallama işleminin ardından kültürlerde kalan OL hücrelerinin uzaklaştırılmasıdır. Uzun süreli sallama işlemi bittikten sonra yüzen hücreler uzaklaştırıldı ve kültürler kalsiyum ve magnezyum içermeyen Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Biochrom KG) ile bir kez yıkandı. HBSS uzaklaştırıldıktan sonra kültür flasklarına tripsin-EDTA solüsyonu konularak 37°C sıcaklıkta birkaç dk enkübe edildi. Faz-kontrast mikroskop altında hücrelerin kültür kabından ayrıldığı izlendi. Bu arada kültür kaplarının altına vurularak ayrılma işlemi çabuklaştırıldı. Hücrelerin çoğu kültür kabından ayrıldıktan sonra kültür kaplarına tripsini inaktive etmek amacıyla serum içeren kültür ortamı eklendi. Hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılarak santrifüje edildi. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant atıldı ve pellet kültür ortamıyla resüspende edildi. Hücre sayımı yapılarak kaplanmamış 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına 3 x 10<sup>6</sup> hücre/flask/ 10 ml yoğunlukta ekim yapıldı. Astrosit kültürleri 3 günde bir ortamları değiştirilerek ve sıkışık duruma geldiğinde 1:4 oranında yeni kültür flasklarına pasaj yapılarak sürdürüldü. Astrosit kültürlerinin saflığı anti-GFAP IF boyaması yapılarak değerlendirildi. EPOR ekspresyonunun mRNA düzeyinde değerlendirilmesi için hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına, IF boyama için ise PDL ile kaplanmış lamellere ekildi.

### 5.3.9. N20.1 Hücre Hattı Kültürü

Yenidoğan fare beyninden elde edilen primer OL kültürlerinin yanısıra deneylerde fare transforme immatür oligodendroglial hücre hattı olan N20.1 hücreleri kullanıldı. Özellikle moleküler biyolojik yöntemler için çok sayıda hücrenin gerekmesi nedeniyle primer OL kültürleri yanısıra bu hücre hattı da kullanılmıştır. Hücre hattının bir başka avantajı da hücre topluluğunun saf olmasıdır. Her ne kadar primer OL kültürlerinde de saflık oranının yüksek olduğu anti-GalC IF boyamasıyla gösterilmişse de hücre hattının saflığı daha yüksektir. Ancak hücre hattının bir dezavantajı bu hücrelerin transforme olmaları nedeniyle uzun süreli pasajlar sonrası köken aldıkları primer hücrelerden farklı fenotipik özellikler gösterebilmesi ve primer hücrelerin sahip olduğu fenotipik özellikleri kaybedebilmeleridir. Ancak bu çalışmada N20.1 hücrelerinin GalC ekspresyonu gösterdiği IF boyama yöntemiyle gösterildi.

N20.1 hücre hattı kültürleri için DMEM/F12, % 10 fetal dana serumu ve % 1 gentamisin içeren kültür ortamı kullanıldı. Bu kültürler 34°C sıcaklığa ayarlanmış karbondioksit enkübatöründe tutuldu. N20.1 kültürleri iki günde bir taze kültür ortamıyla beslendi ve sıkışığa yakın duruma geldiğinde tripsin-EDTA muamelesiyle kültür kaplarından kaldırılarak 1:4 oranında pasaj yapıldı.



Şekil 4. Primer oligodendrosit ve astroisit kültürü

#### 5.4. *In vitro* Deneyler

*In vitro* deneylere ekimin ertesi günü başlandı. 1:1 oranında kültür ortamı ve mixt glia-conditioned medium (MGCM)'dan oluşan ekim ortamı taze ve serumsuz idame ortamıyla değiştirildi. İdame ortamı DMEM/F12, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 insülin-transferrin-selenit (ITS) (100 x; Roche) içermektedir. Serumsuz idame ortamına geçilmesinin nedeni serumun immatür OL kültürünü kontamine etmiş olabilecek az sayıda astrostitin sayısını birkaç gün içinde belirgin olarak arttırması ve kültürün saflığını azaltmasıdır. Ayrıca MGCM'un sürdürülmesi de hem bu ortamın serum içermesi nedeniyle benzer bir sonuca yol açacaktı, hem de MGCM immatür OL'in farklılaşmasını uyuracaktı. Deneylerde serumsuz



kültür ortamı kullanılmasının bir başka gerekçesi de koruyucu etkinliği test edilen maddelerin etkisiyle serumun olası koruyucu etkisinin ayırtedilebilmesidir. Bir istisna olarak SD deneylerinde kontrol olarak seçilen kültürlerde ITS yerine serum sürdürüldü. SD uygulanan kültürlerle ise serum ve ITS konulmadı. Bütün deneylerde her ayrı kültür koşulu için en az üç eş örnek (triplicate) kullanıldı.

*In vitro* deneylerde kullanılan maddelerin stok konsantrasyonları ve üretici firmaları şöyledir : Rekombinan insan EPO (Eprex; Cilag; 2000 U/ml), rekombinan fare EPO (Roche;  $10^5$  U/ml), rekombinan fare IFN $\gamma$  (Roche;  $10^5$  U/ml), rekombinan fare IFN $\beta$  (RDI;  $10^5$  U/ml), rekombinan fare TNF $\alpha$  (100  $\mu$ g/ml), LPS (E. Coli'den; Sigma, 1 mg/ml), rekombinan fare NGF (Sigma; 100  $\mu$ g/ml), rekombinan insan HGF (Prof. Dr. Neşe Atabey'den sağlanmıştır; 100  $\mu$ g/ml), rekombinan insan TGF $\beta$  (R & D; 100  $\mu$ g/ml)

### 5.5. İmmüno Floresan Boyama

Mikst glial hücre kültürlerinde hücre tiplerinin belirlenmesi ve OL kültürlerini kontamine etmiş olabilen diğer hücre tiplerinin saptanması (bir başka deyişle OL kültürlerinin saflık oranının belirlenmesi) amacıyla nöron, astrosit, oligodendrosit, mikrogliya ve fibroblastların hücre yüzey antijenlerine ya da sitoplazmik antijenlerine spesifik antikoları içeren Neural Cell Typing Set (Roche) antikor kiti ve anti-CD11b monoklonal antikor (Caltag) kullanıldı. Hücre tipine spesifik antijenler Tablo 3'de gösterilmiştir. Bu antijenlerden GalC ve CD11b yüzey antijenidir. Diğer antijenler ise sitoplazmik yerleşim göstermektedir.

**Tablo 3: Nöronal ve glial spesifik hücre marker'ları**

Hücre Tipi	NF-160	GFAP	GalC	Vimentin	Fibronektin	CD11b
Nöron	+	-	-	-	-	-
Astrosit	-	+	-	+	-	-
Oligodendrosit	-	-	+	-	-	-
Fibroblast	-	-	-	+	+	-
Mikrogliya	-	-	-	-	-	+

IF boyama için şu malzemeler kullanıldı :

- Fiksatifler : Sitoplazmik antijenlere yönelik antikörlerle (anti-NF-160, anti-vimentin ve anti-GFAP) immüno floresan boyama işlemi için fiksatif olarak - 20°C sıcaklıkta soğutulan metanol kullanıldı. Hücre yüzeyinde bulunan antijenlere yönelik antikörlerle (anti-CD11b ve anti-GalC) boyama işleminde ise fiksatif olarak etanolde % 5 oranında (volüm/volüm) hazırlanan ve - 20°C sıcaklıkta soğutulan asetik asid kullanıldı. Bazı boyamalarda ise fiksatif olarak metanol yerine TritonX-100 ile permeabilizasyon aşamasından sonra % 4'lük soğuk paraformaldehid ve asetik asid/etanol yerine % 4'lük paraformaldehid kullanıldı.

- Fosfatlı tampon solüsyonu (PBS)

- % 1 fetal dana serumu içeren PBS

- Neural cell typing set

- Anti-CD11b monoklonal antikoru

- Fluorescein isothiocyante (FITC) ya da Texas Red (TR) florokromu ile konjuge anti-fare Ig ve anti-tavşan Ig sekonder antikörleri

- Entellan

- Anti-fade

- 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) anti-fade

IF boyama işlemi şu basamaklar izlenerek gerçekleştirildi :

1. Petri kaplarındaki kültür ortamı çekildikten sonra lameller serumsuz PBS ile birkaç kez yıkandı.

2. Fiksasyon için kullanılan antikör tipine göre yukarıda açıklandığı gibi petri kaplarına metanol, asetik asid/etanol ya da % 4'lük paraformaldehid solüsyonu (ya doğrudan ya da TritonX-100 ile 2 dk permeabilizasyon aşamasından önce) eklendi. Hücreler metanol ya da asetik asid/etanol ile fiksasyon işleminde - 20°C sıcaklıkta 10 dakika, paraformaldehid ile fiksasyon işleminde oda sıcaklığında 30 dk, TritonX-100 ile permeabilizasyon işleminde +4°C sıcaklıkta 2 dk tutuldu.

3. Enkübasyon işleminin sonunda fiksatif solüsyonu ya da permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra lameller serum içeren PBS ile iki kez yıkandı.

4. Lamellerin üzerine 10 µl hacimde primer antikör solüsyonu eklenerek parafilm tabakası kapatıldı. Hücreler primer antikör solüsyonuyla oda sıcaklığında ve nemli ortamda

30 dk enkübe edildi. Bazı antikorlar için (örneğin anti-EPOR antikor) enkübasyon bütün gece sürdürüldü.

5. Primer antikorla enkübasyon işleminin ardından antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve lameller serum içeren PBS ile iki kez yıkandı.

6. Lamellere FITC ya da TR florokromu ile konjuge sekonder antikor solüsyonu eklendi, parafilm kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dk süreyle enkübe edildi.

7. Enkübasyon süresinin sonunda sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra lameller tekrar serum içeren PBS ile iki kez yıkandı.

8. Lameller, üzerine 1-2 damla Entellan konulan lamlara yapıştırıldı.

9. Lamellerin üzerine 10 µl hacimde anti-fade konularak bir lamel ile örtüldü. Bazı boyama işlemlerinde anti-fade yerine DAPI nükleus boyasını içeren DAPI-anti-fade konularak hücre çekirdekleri de görünür duruma getirildi.

10. Lamlar immünfloresan mikroskop incelemesi yapılana kadar karanlık ve soğuk bir ortamda tutuldu.

## 5.6. Laktik Dehidrogenaz Testi

Hücre ölümü klasik olarak plazma membran hasarının kantifikasyonu ile değerlendirilmektedir. Hücre ölümünün doğru belirlenmesi için duyarlı, kantitatif, güvenilir ve otomatize edilmiş yöntemlere duyulan ihtiyaç hücre canlılığının ya da ölümünün kantifikasyonu için birkaç standart testin geliştirilmesine yol açmıştır. Yaygın olarak kullanılan standart yöntemler tripan blue, nigrozin, propidium iodid ya da etidium bromid gibi vital boyaların hücreler tarafından alınması ya da alınmaması ilkesine dayanmaktadır. Ölü ve canlı hücreler ışık mikroskobu ya da floresan mikroskobu altında bu boyalarla farklı boyanma özelliklerine göre ayırtedilmekte ve sayılabilmektedir. Ancak bu yöntemler zaman alıcı olduğu için çok miktarda örneğin değerlendirilmesine olanak sağlamamakta ve lizise uğramış hücreler bu yöntemlerle değerlendirilememektedir. Bu da uzun süreli kültürlerde hücre ölümü oranının gerçekten daha düşük bulunmasına neden olmaktadır.

İkinci bir grup standart test, önceden işaretlenmiş hedef hücrelerden  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^3\text{H}$ -timidin,  $^3\text{H}$ -prolin,  $^{75}\text{Se}$ -metionin,  $^{125}\text{I}$ -5-iodo-2-deoksiüridin gibi radyoaktif izotopların ya da bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF) ya da calcein-AM'in salınması ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemlerin dezavantajları çoğunda radyoaktif izotopların kullanımının,

ve hedef hücrelerin işaretlenmesinin gerekmesi ve önceden işaretlenmiş hedef hücrelerden spontan salınımın yüksek olmasıdır.

Üçüncü bir test grubu hasara uğramış hücrelerden salınan sitoplazmik enzimlerin aktivitesinin ölçümü ilkesine dayanmaktadır. Kültür süpernatantlarında saptanan enzim aktivitesi lizise uğrayan hücrelerin oranıyla doğru orantılıdır. Enzim salınma yöntemleri alkalin fosfataz, asid fosfataz, glutamat-oksalasetat transaminaz, glutamat pirüvat transaminaz ya da arginosüksinat liyaz için tanımlanmıştır. Ancak bu enzimlerin miktarı çoğu hücrede düşük düzeydedir ve çoğu enzimin aktivitesinin kantitatif değerlendirilmesi için yoğun kinetik çalışmalar gerekmektedir.

Bu sitoplazmik enzimlerin aksine LDH bütün hücrelerde bulunan stabil bir sitoplazmik enzimdir. Bu enzim plazma membranı hasara uğradığında hızla kültür süpernatantına salınmaktadır. Cytotoxicity Detection Kit (Roche) kullanımıyla kültür süpernatantlarında LDH aktivitesi bir zaman noktasında tek bir ölçümle belirlenebilmektedir. Spektrofotometrik microtiter ELISA plak okuyucusunun kullanılabilmesi çok sayıda örneğin aynı anda değerlendirilebilmesini sağlamaktadır.

Kit içeriği :

1. Katalist, diaforaz/NAD<sup>+</sup> karışımı
2. Boya solüsyonu. İodotetrazolium klorid (INT) ve sodyum laktat içermektedir.

Kit - 20°C sıcaklıkta saklanmaktadır. Katalist ve boya solüsyonları çözüldüğünde 2-8°C sıcaklıkta birkaç hafta stabilitesini korumaktadır. Katalist 1 ml distile su ile çözülmektedir. 100 test için 250 µl katalist solüsyonu ve 11.25 ml boya solüsyonu karıştırılarak reaksiyon karışımı testten hemen önce hazırlanmaktadır.

Testin ilkesi :

Hücre içermeyen kültür süpernatantı örnekleri (kültür koşulu başına 50 ya da 100 µl) eşit hacimde (50 ya da 100 µl) reaksiyon karışımı ile birlikte ELISA plağının kuyucuklarına konulmaktadır. İlk basamakta NAD<sup>+</sup> LDH laktatın pirüvata dönüşmesini katalizlerken NADH/H<sup>+</sup>'a indirgenmektedir. İkinci basamakta katalist (diaforaz) NADH/H<sup>+</sup>'dan H/H<sup>+</sup>'ı sarı tetrazolium tuzu INT'a transfer etmekte ve INT da formazana indirgenmektedir.

Ölü ya da plazma membranı hasara uğramış hücrelerin sayısının artışı kültür süpernatantında LDH aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Süpernatantta LDH enzim aktivitesinin artışı belli bir zaman diliminde oluşan formazan miktarıyla doğru orantılıdır. Bu nedenle testte oluşan rengin miktarı (koyuluğu) lizise uğrayan hücre sayısı ile orantılıdır. Formazan boyası suda çözünürdür ve yaklaşık 500 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir. Oysa tetrazolium tuzu INT bu dalga boylarında önemli bir absorpsiyon göstermemektedir.

LDH testinde kontrol olarak toksik ve/ya da koruyucu ajanların eklenmediği kültür koşulları (kuyucuklar) kullanıldı. Maksimal LDH salınımının belirlenmesi için ise toksik ajanlarla aynı zamanda ve yalnızca % 1'lik TritonX-100 deterjan maddesi eklenen kuyucuklar kullanıldı. Toksik ajanlar, koruyucu ajanlar ve TritonX-100 ile değişik enkübasyon sürelerinin ardından her kuyucuktan 50 µl süpernatant örneği alınarak ELISA plağına aktarıldı. Her bir kuyucuğa 50 µl hacimde ve taze hazırlanan LDH reaksiyon karışımı eklendi. Reaksiyon karışımı eklendikten sonraki 30 dk içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan ELISA plak okuyucusuna yerleştirilen plaktan 492 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Referans dalga boyu olarak 620 nm seçildi. Her bir kuyucuğa ait absorbans değerleri yazdırıldı. Her bir kuyucuğa ait absorbans değerinden ortalama background absorbans değeri çıkartılarak net absorbans değerleri elde edildi. Background absorbans değeri yalnız kültür ortamının 100 µl hacimde eklendiği ve LDH reaksiyon karışımı eklenmeyen kuyucuklardan okutulan absorbans değerlerinin ortalamasıdır. Her bir kültür koşulu için hücre ölümü yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{(\text{Bulunan absorbans değeri} - \text{Kontrol absorbans değeri}) \times 100}{\text{Maksimal absorbans değeri} - \text{Kontrol absorbans değeri}}$$

Kontrol absorbans değeri herhangi bir toksik ajan, koruyucu ajan ya da TritonX-100 eklenmeyen kültür koşullarından elde edilen absorbans değerlerinin aritmetik ortalamasıdır ve bu hücrelerden enkübasyon süresi içerisinde spontan LDH salınımının ölçüsüdür.

Maksimal absorbans değeri yalnızca TritonX-100 eklenen kültür koşullarından elde edilen absorbans değerlerinin aritmetik ortalamasıdır ve bu hücrelerden enkübasyon süresi içerisinde maksimal LDH salınımının ölçüsüdür.

### 5.7. MTT Testi

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (195, 330). Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla enkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün solubilize edilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Ayrıntılı deney basamakları şu şekildedir:

1. 100 mg MTT (Sigma) maddesi 10 ml hacimde PBS içinde çözülerek % 0.5'lik (10 mg/ml konsantrasyonda) stok MTT solüsyonu steril ve karanlık koşullarda hazırlandı. Solüsyon 0.22 µm'lik filtre ile süzülerek debrisler uzaklaştırıldı. Bu solüsyon karanlık ortamda ve 4°C sıcaklıkta bir ay kadar bir süre saklanabilmektedir.
2. Deneylerde herhangi bir toksik ya da koruyucu ajan eklenmeyen kültür koşulları kontrol olarak kullanıldı. 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilen ve değişik toksik ve/ya da koruyucu ajanların değişik dozlarıyla karşılaştırılan kültürlerle hedeflenen enkübasyon süresinin sonunda 10 µl/kuyucuk hacimde MTT solüsyonu eklendi.
3. Kültür plakları alüminyum folyo ile sarılarak % 5 karbondioksitli nemli hava içeren karbondioksit enkübatöründe 37°C sıcaklıkta 4 saat süreyle tutuldu.
4. Enkübasyon süresinin sonunda faz-kontrast "inverted" mikroskop altında canlı hücrelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu, ölü hücrelerin ise boyanmadığı saptandı.
5. Kültür plağı, plak rotoru kullanılarak 1250 rpm hızda 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

6. Formazan kristallerini solubilize duruma getirmek için önceden hazırlanmış solubilizasyon solüsyonu 100 µl/kuyucuk hacimde eklendi. Bu solüsyon isopropranolol içinde hazırlanmış 0.04 N HCl solüsyonundan oluşmakta ve oda sıcaklığında saklanmaktadır.

7. Kültür plağı DEÜTF Hematoloji laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusuna konularak absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 650 nm dalga boyu kullanıldı. Herhangi bir ajan eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması % 100 olarak kabul edildi. Değişik ajanlar eklenen kültür koşullarından elde edilen absorbans değerlerinin herbiri ortalama kontrol absorbans değerine oranlandı ve bu değer yüzdesi olarak gösterildi.

### 5.8. Apostain İmmüno Floresan Boyama Yöntemi

Apoptotik hücre ölümünü saptamak için kullanılan bu yöntemin ilkesi apoptotik hücrelerdeki DNA'nın ısıyla denatürasyona duyarlılığının artmış olmasına dayanmaktadır. Bu yöntemde DNA, formamidin varlığında ısıyla denatüre edilmekte ve single strand DNA (ssDNA)'ya spesifik F7-26 antikoruyla boyanmaktadır. Bu işlem spesifik olarak apoptotik hücrelerin kromatinini boyamaktadır. Kondanse kromatin apoptotik hücre ölümünün kesin bir göstergesi olduğu için (340) kondanse kromatinin anti-ssDNA antikoruyla immünohistokimyasal olarak gösterilmesi apoptotik hücrelerin spesifik olarak tanınmasını sağlamaktadır. Yöntemin spesifikliği apoptotik hücrelerin kondanse kromatininde DNA'nın ısıyla denatürasyona duyarlılığının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (104). Formamidin varlığında 56 ya da 75°C sıcaklığa kadar ısıtma ile yalnızca apoptotik çekirdeklerdeki DNA anti-ssDNA'ya spesifik F7-26 antikoruyla saptanabilmektedir (105).

Formamid apoptotik hücrelerde DNA denatürasyonunu indüklemekte ve apoptoz bulunmadığında tek ya da çift sarmal DNA kırıkları olan DNA'nın stabilitesini etkilememektedir. Sonuç olarak bu yöntemin kullanılması spesifik olarak yalnızca apoptotik hücrelerin boyanmasını sağlamakta ve apoptozu nekrozdan kesin olarak ayırmaktadır. Yöntemin DNA kırıklarından bağımsız olması önemlidir, çünkü çift sarmal DNA kırıklarını saptayan TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) gibi yöntemler apoptoz için spesifik değildir (7, 63, 68, 84, 119, 278). Gerçekten de üç ayrı nekrotik hücre ölümü modelinde nekrotik hücrelerin TUNEL ile parlak boyandığı, fakat anti-ssDNA F7-26 antikoruyla boyanma olmadığı bildirilmiştir (105). Şu bulgular apoptotik çekirdeklerde

formamidin eklenmesiyle oluşan selektif denatürasyonun DNA kırıklarıyla ilgili olmadığını göstermektedir:

1. Çift sarmal DNA kırıklarının fazla olduğu nekrotik hücreler TUNEL ile pozitif boyanmakta, fakat anti-ssDNA F7-26 antikoruyla boyanmamaktadır.
2. DNA fragmantasyonunun çok düşük ve yüksek düzeyde bulunduğu apoptotik hücreler anti-ssDNA antikoruyla benzer yoğunlukta boyanmaktadır.
3. Oksijen radikalleriyle indüklenen tek sarmal DNA kırıklarının bulunduğu çekirdekler formamid varlığında ısıtma işlemi sonrasında anti-ssDNA antikoruyla boyanmamaktadır. Ancak alkali maddelerle denatürasyon sonrası bu çekirdekler bu antikorla boyanmaktadır (105).

Bu veriler apoptotik hücrelerde formamidin varlığında olan DNA denatürasyonunun DNA kırıklarından bağımsız olarak kondansasyon ile birlikte olan kromatin değişiklikleriyle indüklendiğini göstermektedir. Histonların DNA'yı ısıyla denatürasyona karşı stabilize ettiği bilindiği için, apoptotik çekirdeklerin kondanse kromatinindeki DNA-histon etkileşimi değişiklikleri DNA'nın ısıyla denatürasyona duyarlılığının artmasından sorumlu olabilir. Gerçekten de apoptoz sırasında histonlar dijesyona uğramakta (150, 162) ve DNA kırıklarının ortaya çıkmasından önce histonların immünreaktivitesi ve ekstraktibilitesi artmaktadır (345).

Bu yöntemde kullanılan anti-ssDNA F7-26 monoklonal antikorunu dana timus ssDNA'sına karşı oluşturulmuştur ve fare apoptotik hücrelerine reaktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu antikor spesifik olarak deoksisistidin ile etkileşmektedir ve ssDNA'ya bağlanması için ssDNA'nın en az 25-30 bazlık uzunlukta olması gerekmektedir (106). F7-26 monoklonal antikorunu türe spesifik değildir ve değişik canlı türlerinde apoptotik hücrelerin saptanması amacıyla kullanılabilir. Bu antikor, üretici firma tarafından fare, sıçan ve insan hücrelerinde test edilmiştir.



Aderan kültüre hücrelerin s spende duruma getirilerek F7-26 antikoruyla boyanması yöntemi Őu basamaklar izlenerek uygulanmaktadır :

1. 6 kuyucuklu ve daha önceden 10 µg/ml konsantrasyonda PLL ya da PDL ile kaplanmış kültür plaklarına OL hücreleri  $5 \times 10^5$  / 2 ml/kuyucuk konsantrasyonda ekildi. Ertesi gün farklı kültür koŐullarına değişik toksik ve koruyucu ajanlar eklendi.

2. Değişik enkübasyon sürelerinin ardından hücreler tripsin-EDTA ile kültür plaklarından kaldırıldı.

3. Santrifüj tüplerine aktarılan hücreler PBS ile yıkandı.

4. Hücre süspansiyonları oda sıcaklığında 5 dakika süreyle ve 1200 rpm devirde santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet 1 ml soğuk PBS ile resüspende edildi.

6. Hücre süspansiyonları vortekste karıŐtırılırken yavaŐca 6 ml soğuk (-20 C sıcaklıkta) metanol eklendi. Hücreler metanol içinde 16 saat süreyle -20 C sıcaklıkta tutularak fikse edildi.

7. Ertesi gün hücre süspansiyonları santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılarak pellet, 0.25 ml hacimde ve distile su ile sulandırılan % 50'lik formamid (Sigma) ile resüspende edildi.

8. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk tutuldu.

9. Tüpler daha sonra 75  sıcaklığa getirilmiş su banyosunda 10 dk tutuldu.

10. Bu ısıtma işleminden sonra tüpler hemen oda sıcaklığındaki su banyosuna konuldu.

11. Hücre süspansiyonlarına 2 ml % 3'l k ve yağ içermeyen, distile su ile  z lm Ő ve PBS ile sulandırılmıŐ süt tozu (Nestle) eklendi.

12. Vorteksle karıŐtırılan örnekler 15 dk süreyle oda sıcaklığında tutuldu. Süt tozu non-spesifik boyanmayı önlemek için eklenmektedir.

13. Örnekler enkübasyon süresinin sonunda tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 100 µl/ örnek hacimde F7-26 antikoruyla (Alexis Biochemicals) resüspende edildi (final antikor konsantrasyonu 10 µg/ml olmaktadır). Antikor solüsyonu hazırlamak için 1 ml hacimde 100 µg F7-26 antikoruna PBS ile sulandırılmıŐ %1'lik süt tozu süspansiyonundan 9 ml eklendi. Dilüe edilen antikor solüsyonu -20 C sıcaklıkta saklanabilmektedir.

14. Örnekler antikor solüsyonuyla oda sıcaklığında 15 dk enkübe edildi.

15. Enkübasyon süresinin sonunda örnekler 1 ml PBS eklendi. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

16. Pellet 100 µl/ örnek hacimde FITC-konjuge keçi-anti-fare sekonder antikoruyla (Caltag) resüspende edildi. Sekonder antikor da PBS ile sulandırılan % 1'lik süt tozu süspansiyonu ile dilüe edilmektedir.

17. Sekonder antikor ile oda sıcaklığında 15 enkübasyon işleminin ardından örnekler 1 ml PBS eklendi.

18. Santrifüj aşamasından sonra pellet tekrar PBS ile resüspende edildi.

19. Floresan mikroskopi incelemesi için boyanmış hücre süspansiyonları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD'da bulunan cytospin aygıtıyla (Cytospin 3, Shandon) lam üzerine yayıldı. Bu işlem için 900 rpm devir ve 5 dk süre uygulandı.

20. Lamaların üzerine DAPI-antifade (Oncor) eklendi ve lamel kapatıldı.

21. Örnekler floresan mikroskopi incelemesi yapılana kadar karanlıkta ve 4°C sıcaklıkta tutuldu.

22. Floresan mikroskopi incelemesinde FITC florokromu için yeşil FITC filtresi, DAPI için ise UV filtresi kullanıldı.

## 5.9. RT-PCR

N20.1 hücrelerinde bazal ve indüklenebilir EPOR mRNA ekspresyonunun araştırılması amacıyla RT-PCR yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 6 saat süreyle 1 µg/ml konsantrasyonda LPS, 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$ , 20 µM konsantrasyonda A $\beta$  ya da 10 U/ml konsantrasyonda EPO eklenen kültürler indüklenebilir EPOR mRNA ekspresyonunu araştırmak için kullanıldı. Bazal EPOR mRNA ekspresyonu ise herhangi bir madde eklenmeyen kültürlerde değerlendirildi. EPOR mRNA'sının gösterilmesi için enkübasyon süresi sonunda toplanan N20.1 hücrelerinden Nucleospin RNA izolasyon kiti ile RNA elde edildi. Bu işlemde önce lizis solüsyonuyla hücre ve nukleus membranı parçalanarak DNA ve RNA açığa çıkarıldı. Ardından DNA ve RNA'nın silikaya yapışma özelliğinden yararlanmak için örnekler silika membran içeren kolumdan geçirildi. Daha sonra silikaya yapışan DNA'nın uzaklaştırılması için Deoxyribonuclease (DNase) enzimi ile enkübasyon yapıldı. Sonrasında etanol solüsyonları ile yıkama yapıldı. RNA, santrifüj ardından distile su içinde toplandı. RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik ölçüm ile değerlendirildi. Complementary DNA (cDNA) sentezi için 5 µg RNA kullanıldı.

Bir sonraki aşamada MMLV-Reverse transkriptaz enzimi ve “random” heksamerler kullanılarak cDNA elde edildi. Bu işlem için 50 pmol random heksamer (Promega), 100 µM dNTP mix, 5X reaksiyon tamponu ve 10 ünite MMLV-Reverse transkriptaz enzimi (Promega) kullanıldı. Örnekler “thermal cycler” aletinde (Perkin Elmer Cetus) 37°C’de 2 saat enkübe edilerek cDNA elde edildi.

Ardından Gliseraldehid 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) ve EPOR’e özgül primer’lerle PCR yapıldı. G3PDH primerleri ile yapılan PCR amplifikasyonunun amacı RNA izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi ve EPOR mRNA amplifikasyonunda her koşul için eşit cDNA kullanılıp kullanılmadığının kontrolüdür. Deneylede pozitif kontrol olarak fare primer astrosit kültürü hücreleri kullanıldı. PCR reaksiyonu toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. PCR reaksiyon karışımı şu maddeleri içermektedir :

cDNA	1 µl
Primer	25 pmol
dNTP mix	100 µmol
Reaksiyon tamponu (1X)	
Taq DNA polimeraz enzimi	1.25 ünite

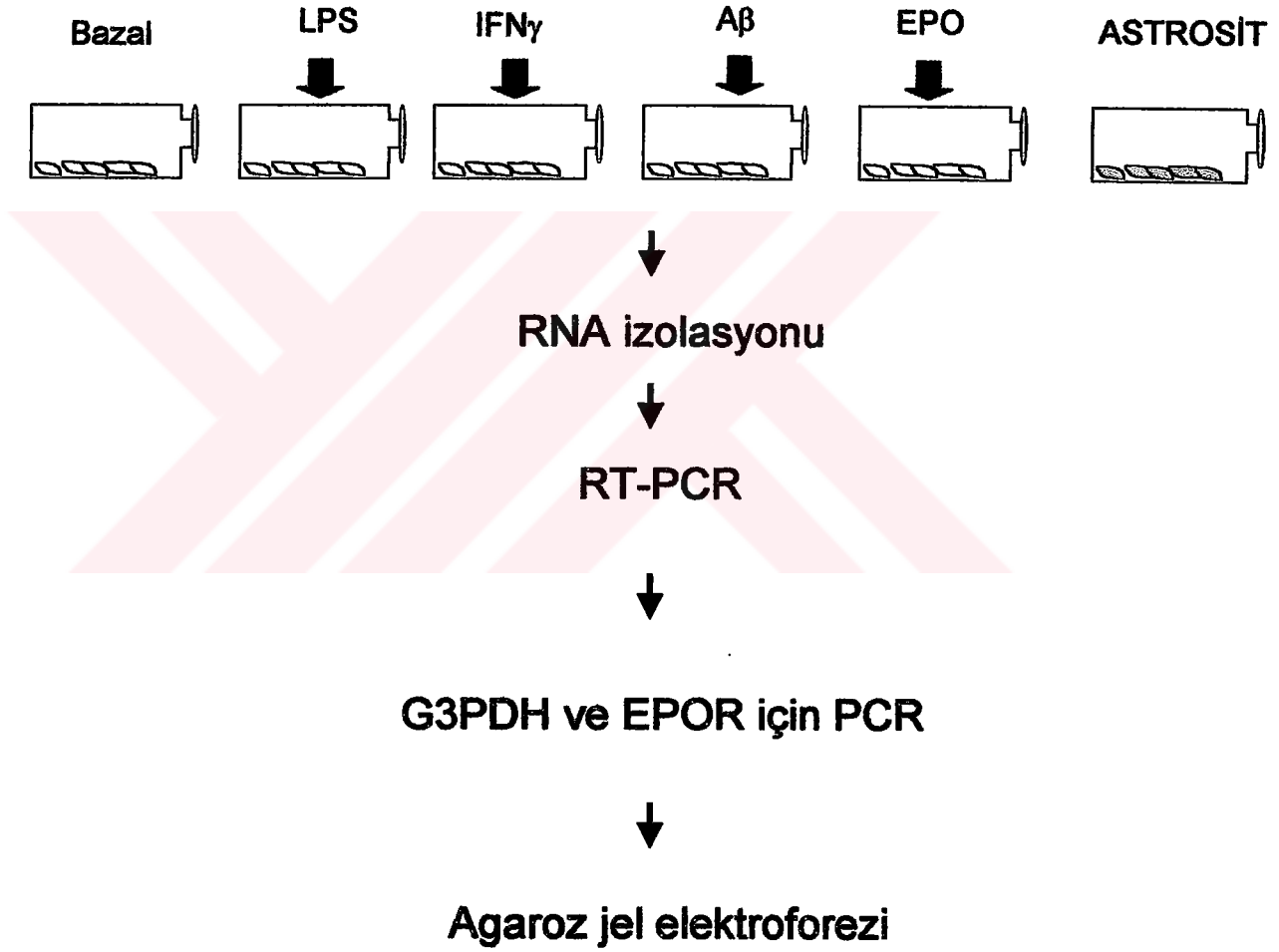
Deneylede şu primer dizileri kullanıldı:

Fare EPOR için;	Sense	5’ GGA CAC CTA CTT GGT ATT GG 3’
	Antisense	5’ GAC GTT GTA GGC TGG AGT CC 3’
G3PDH için;	Sense	5’ ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3’
	Antisense	5’ TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3’

PCR profili olarak başlangıç denatürasyonu 95°C’de 3 dk; denatürasyon 95°C’de 30 sn; annealing 55°C’de 30 sn; ekstansiyon 72°C’de 1 dk olacak biçimde 35 siklus ve son ekstansiyon olarak 72°C’de 5 dk seçildi (29, 52).

PCR ürünleri ethidium bromid içeren % 2 agaroz jelde yürütülerek ayrımlandı. Bunun için 80 g Agaroz tartıldı. Beherin içine 40 ml 0.5 M Tris borate-EDTA tamponu eklendi. İki

45 dk mikrodalga fırında çözüldükten sonra jelin içine 1.5 ml ethidium bromide (10 mg/ml stok konsantrasyonda) eklendi. Jel standart jel elektroforez aygıtına döküldü. Jel katılaştıktan sonra spacer çıkartılarak agaroz jel tankına alındı. Her bir örnekten 5  $\mu$ l ve moleküler ağırlık marker'ı 1  $\mu$ l DNA jel yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Elektroforez işlemi 45 dk ve 80 mAmp uygulandı. Görüntüleme Eagle Eye Still Video System (software 3.0) ile gerçekleştirildi.



**Şekil 5. Oligodendrosit kültüründe eritropoetin reseptörü mRNA ekspresyonunun analizi**

### 5.10. Western blotting-immünpresipitasyon

Ekspresyonu düşük proteinler için WB yerine IP yapılması gerekmektedir.

Değişik sitokinlerle enkübasyon sonrasında N20.1 hücreleri proteaz inhibitörü içeren lizis tamponu ile lizise uğratıldı ve protein ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bütün basamaklar buz üstünde uygulanmaktadır.

- Kùltürler faz-kontrast mikroskop altında kontrol edildi. Yüzen hücre fazla olmadığında kùltürler ortamları çekildikten sonra oda sıcaklığında PBS ile iki kez yıkandı.

- Ardından Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (sodyum orthovanadate) içeren soğuk PBS eklendi ve faz-kontrast mikroskop altında kontrol edilerek “scrapers” ya da “cell lifter” ile hücreler kazındı. Sodyum orthovanadate fosforilasyonu durdurmak için kullanılmaktadır.

- Kùltür kaplarında hücre kalmadığından emin olunduktan sonra hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine aktarıldı ve önceden soğutulmuş olan santrifüjde 850 rpm devirde, 5 dk süreyle santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra pellet tekrar süspansiyon haline getirildi ve Eppendorf tüplerine aktarıldı.

- Hücre sayısına ya da pellet büyüklüğüne göre değişen volümlerde ampirik olarak örneklere soğuk lizis tamponu eklendi.

#### Lizis Tamponu (10 ml için) :

1 M Tris (pH: 7.5)	200 µl
EDTA (0.5 M)	100 µl
NP-40 (%1)	100 µl
Aprotinin (1 µg/ml)	250 µl
Leupeptin (100 µg/ml)	250 µl
Pepstatin (1 µg/ml)	250 µl
PMSF	100 µl
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (sodyum orthovanadate)	100 µl
Distile su	8.5 ml

PMSF, aprotinin, leupeptin ve pepstatin proteinaz inhibitörleridir. Bu maddelerden PMSF diğerlerinden farklı olarak alkolde çözölmektedir. Non-idet P-40 (NP-40) deterjan özelliğinde bir maddedir.

- Örnekler iki dakikada bir vortekste karıştırılarak lizis tamponu ile buz üstünde toplam 15 dk enkübe edildi.

-Ardından örnekler 13000 rpm devirde, +4°C sıcaklıkta, 15 dk süreyle santrifüj edildi.

- Santrifüj ardından süpernatantlar alınarak BCA protein assay kiti ile protein ölçümü gerçekleştirildi. Protein ölçümü için standart olarak 2 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan bovine serum albumin (BSA) kullanıldı. Visible ölçüm küvetlerine BSA standartları şu şekilde konuldu:

	BSA ( $\mu$ l)	Distile su ( $\mu$ l)
1.	0	100
2.	10	90
3.	20	80
4.	40	60
5.	60	40
6.	80	20
7.	100	0

Örneklerin bulunacağı küvetlere ise 10  $\mu$ l örnek ve 90  $\mu$ l distile su konuldu.

- Protein ölçümü için BCA protein assay kitinin A ve B solüsyonları 1:50 oranında karıştırıldı (örneğin 12 250  $\mu$ l A solüsyonu ve 250  $\mu$ l B solüsyonu). Bu reaksiyon karışımından her küvete 1 ml eklendi ve vortekste karıştırıldı.

- Reaksiyon oluşumu için örnekler ya 42°C sıcaklıkta 2-5 dk, ya 37°C sıcaklıkta 30 dk ya da oda sıcaklığında 2 saat tutulmaktadır. Fosforilasyon deneyleri için hızlı reaksiyon yeğlenmektedir.

- Renk değişimiyle reaksiyonunun tamamlandığı anlaşıldıktan sonra spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Standart eğri çizdirildikten sonra her örneğin içerdiği protein miktarı belirlendi ve volüm protein konsantrasyonu 1 mg/ml olacak biçimde lizis tamponu ile 1 ml'ye tamamlandı. WB için örnek başına ortalama 50  $\mu$ g, IP için ise örnek başına 500  $\mu$ g protein kullanılmaktadır.

- Bu aşamadan sonra WB yapılacak örneklere 5X Laemmli tamponu eklenerek vortekste karıştırıldı.

<u>Laemmie tamponu (5 x)</u>	(10 ml için)
SDS (% 10)	1 g
Tris (pH:6.8) 312.5 mM	1.040 ml
Gliserol % 50	5.747 ml
$\beta$ -merkaptoetanol % 25	2.550 ml
Bromphenolblue % 0.025	100 $\mu$ l

- Örnekler 95°C sıcaklıkta 5 dk kaynatıldı. Örnekler oda sıcaklığında jele yüklenene kadar bekletilebilmektedir.

- IP yapılacak örnekler ise örnek başına 10  $\mu$ l hacimde tavşan anti-EpoR poliklonal antikor (Santa Cruz) eklenerek +4°C sıcaklıkta bütün gece enkübe edildi (Bu işlem oda sıcaklığında 2 saat olarak da uygulanabilmektedir).

- Ertesi gün presipitasyon tamamlanınca antijen-antikor komplekslerini toplamak için gammabind sefaroze kullanıldı. Bu işlem öncesinde gammabind sefaroze çözüldükleri alkolün uzaklaştırılması amacıyla 1 ml hacimde ve proteaz inhibitörü içeren yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı. Her yıkama sonrası 2000 g devirde 30 sn santrifüj yapıldı.

- Örnek başına 30  $\mu$ l gamma bind sefaroze eklendi. Soğukta yavaş olarak rotasyonla immün komplekslerin gammabind sefaroze bağlanması sağlandı. Bu işlem 2 saat sürdürüldü.

- Gamma bind sefaroze ile bağlama işlemi için enkübasyon yapıldığı sırada % 12'lik Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Gel Elektroferez (SDS-PAGE) jeli hazırlandı. Bu jelin içeriğinde şu maddeler bulunmaktadır. (Değerler toplam 10 ml jel hacmi için verilmiştir):

Distile su	3.3 ml
% 30 acryl-bisacrylamide karışımı	4.0 ml
Tris (1.5 M; pH: 8.8)	2.5 ml
SDS (% 10)	0.1 ml
Amonyum persülfat (% 10)	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

TEMED, acryl-bisacrylamide'in polimerizasyonu için kullanılmaktadır. Karışıma en son amonyum persülfat ve TEMED eklendikten sonra jel hemen dökülmektedir. Bu % 12'lik jel separating jel olarak adlandırılmaktadır ve döküldükten sonra üzerine hava kabarcıklarını önlemek ve jelin havayla temasını kesmek için isopropanol eklenmektedir.

- “Separating jel” yaklaşık 1 saatte katılaştıktan sonra üzerindeki isopropanol döküldü ve “stacking jel” hazırlanarak separating jelin üzerine döküldü. Stacking jel % 5 oranında hazırlanmakta ve şu maddeleri içermektedir (Değerler 10 ml jel hacmi için verilmiştir):

Distile su	6.8 ml
% 30 acryl-bisacrylamide karışımı	1.7 ml
Tris (1.5 M; pH: 8.8)	1.25 ml
SDS (% 10)	0.1 ml
Amonyum persülfat (% 10)	0.1 ml
TEMED	0.001 ml

- Stacking jel döküldükten sonra kuyucukları hazırlamak için spacer konuldu. Spacer jel katılaştıktan sonra çekilmektedir. Bu jelin katılaşması için de yaklaşık bir saat beklenmektedir.

- Bu arada gamma bind sefroz bağlanma işlemi tamamlanmış IP örnekleri yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı ve son santrifüj 13 000 g’de 1 dk uygulandı.

- IP örnekleri de WB örnekleri gibi 95°C sıcaklıkta 5 dk kaynatıldı. Örnekler oda sıcaklığında jele yüklenene kadar bekletilebilmektedir.

- IP için kullanılacak örneklere örnek başına 60 µl hacimde 2X yükleme tamponu eklendi.

- Bu arada stacking jel katılaşınca spacer çekildi ve jel elektroforez aygıtına alınarak güç kaynağına bağlantı yapıldı. Elektroforez aygıtı running tampon ile dolduruldu. Bu tampon glisin, SDS içermektedir. Elektroforez süresince aygıtın manyetik karıştırıcı üzerine konulması ve tamponun içine mıknatıs konulmasıyla tamponun işlem süresince karışması sağlanmaktadır.

- Her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklendi. Yalnız antikor eklenen kuyucuk negatif kontrol olarak kullanılmaktadır. Ayrıca iki kuyucuğa moleküler ağırlık marker’ı da yüklendi.

- Örnekler 20 mA’de yaklaşık 4-5 saat yürütülerek preoteinler ayrıldı.

- Ardından proteinlerin PVDF membranına aktarılması için jele transfer tamponu içinde elektroblotter uygulandı. Bunun için oda sıcaklığında 300 mA 1.5 saat ya da +4°C sıcaklıkta 15 mA bütün gece akım uygulanmaktadır.



Transfer tamponu (10 X) şu maddeleri içermektedir:

Tris-base	(% 0.3)	30 g
Glycine	(% 1.44)	144 g
% 10 SDS	(% 0.02)	20 ml
Methanol	(% 20)	

- Transfer işleminin ardından membran plastik bir kabın içine alındı ve burada "blocking" solüsyonunda 45 dk tutuldu. Blocking solüsyonu PBS içinde % 5 BSA'den oluşmaktadır ve kullanım öncesi taze olarak hazırlanmaktadır. Blocking solüsyonu non-spesifik bağlanmaları önlemek için kullanılmaktadır.

- Bu işlemin ardından membran poliklonal tavşan anti-EpoR antikoru (Santa Cruz) ile enkübe edildi (+4°C sıcaklıkta bütün gece ya da oda sıcaklığında 2-4 saat).

- Yıkama işleminin ardından membran HRP konjuge anti-tavşan IgG antikoru ile (1/3500 dilüsyonda) 45 dk enkübe edildi.

- 4 x 15 dk yıkama aşamalarından sonra membran bir film kasetine aktarıldı. Görüntüleme için kemilüminesans yöntemine dayanan hazır ECL kiti (Amersham) kullanıldı. Membran şeffaf bir dosyanın içine yerleştirilerek ECL kitinden 2 ml eklendi. Daha sonra Kodak'ın kemilüminesans filmleriyle (Kodak X-mat) görüntü elde edildi. Film değişen sürelerde membranda tutuldu ve sonra film klasik radyoloji banyosunda banyo edildi.

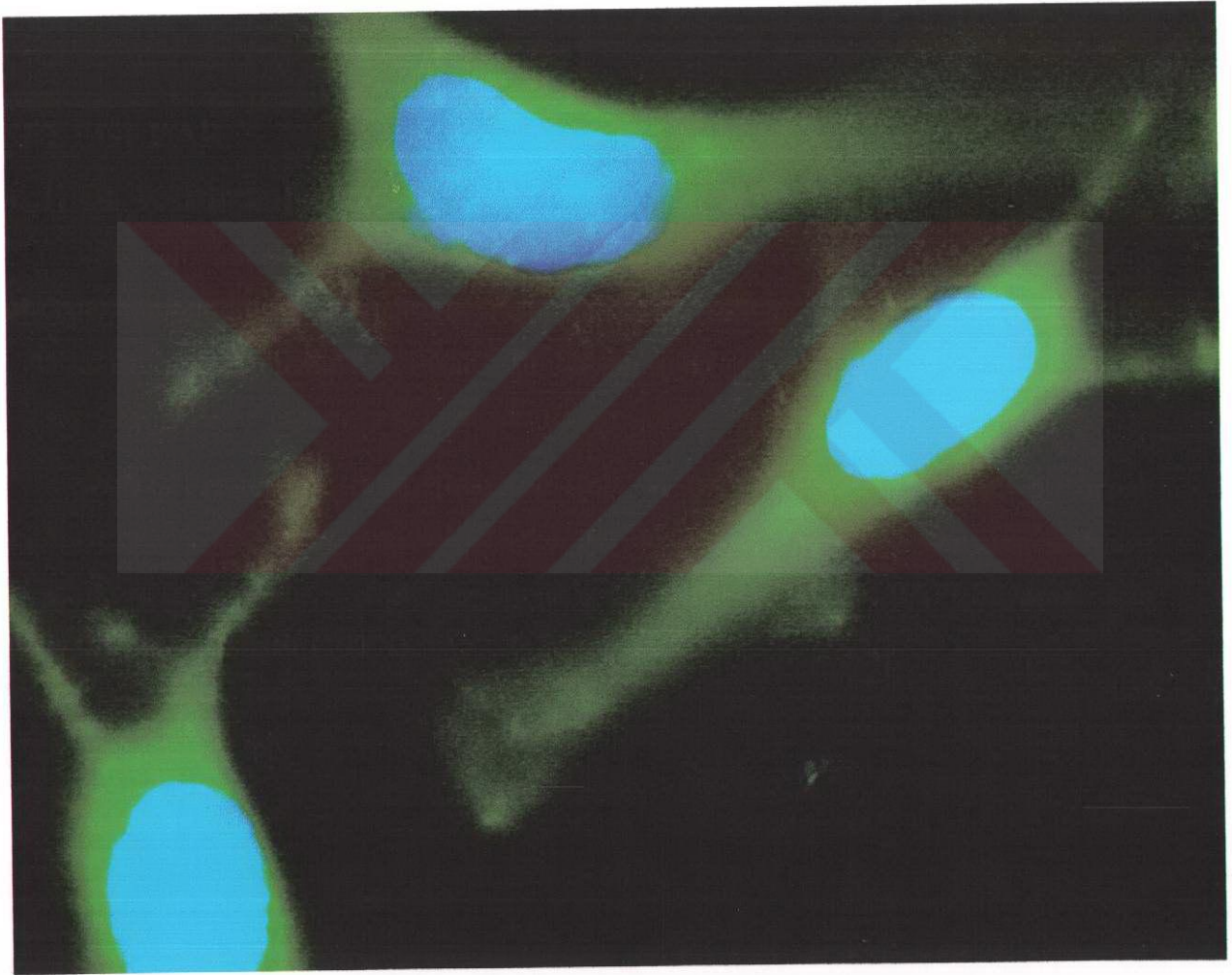
### 5.11. İstatistik Değerlendirme

Bu çalışmada verilerin istatistik analizi için SPSS programı (version 8.0) kullanıldı (5). İstatistik analizde değişik kültür koşullarında saptanan hücre canlılığı oranı, sitotoksosite oranı ve apostain pozitif boyanan hücre oranı parametre olarak seçildi. Grupların ortalama değerleri Students' t testiyle karşılaştırıldı. 0.05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar metin içinde ve grafik gösterimlerde aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata biçiminde gösterildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. OL Kültürünün Saflığı

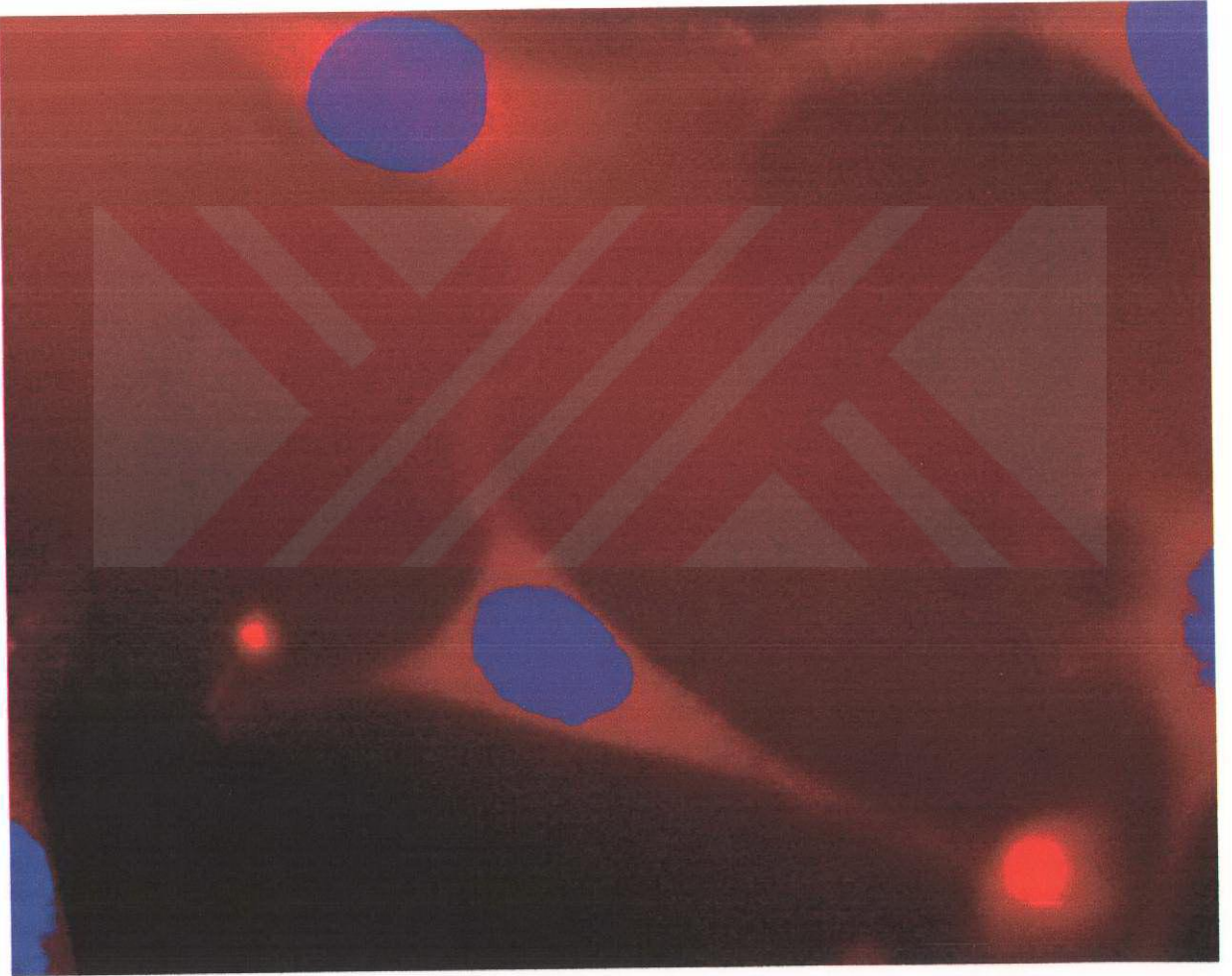
Mikst glia kültüründen sallama-aderans yöntemiyle elde edilen OL kültürünün saflığı anti-GalC immünfloresan boyamasıyla araştırıldı. Deneyleerde kullanılan bu kültürlerin saflığı % 95'in üzerinde bulundu. Anti-GalC IF boyamasıyla pozitif boyanan oligodendroglial hücrelere ait bir örnek Şekil 6'da gösterilmiştir. Bu boyamada anti-GalC antikoruyla birlikte DAPI nukleus boyası da kullanılmıştır. Yalnız DAPI boyanan hücreler GalC negatif hücreleri işaret etmektedir. Verilen bu örnekte yalnız DAPI boyanan hücre bulunmadığı görülmektedir.



Şekil 6. Primer OL kültüründe anti-GalC ve DAPI IF boyamasına ait bir örnek görülmektedir. GalC IF boyaması için sekonder antikor olarak FITC konjuge anti-fare IgG antikorunu kullanılmıştır. GalC boyaması için yeşil FITC filtresi, DAPI boyaması için ise UV filtresi seçilmiştir (100 X)

## 6.2. N20.1 Hücre Hattının Fenotipik Özelliği

Fare pre-oligodendroglial hücre hattı GalC yüzey antijeninin bulunması gibi özellikler açısından köken aldığı primer OL kültürlerine benzemektedir. Bu çalışmada bu fenotipik özellik anti-GalC immünfloresan boyamasıyla teyid edildi. Şekil 7'de anti-GalC immünfloresan boyamasıyla pozitif boyanan N20.1 hücre hattı hücreleri gösterilmiştir. Bu boyamada anti-GalC antikoruyla birlikte DAPI nükleus boyası da kullanılmıştır. Yalnız DAPI boyanan hücreler GalC negatif hücreleri işaret etmektedir. Verilen bu örnekte tek başına DAPI boyanan hücre bulunmadığı görülmektedir.



Şekil 7. N20.1 hücre hattı kültüründe anti-GalC ve DAPI IF boyamasına ait bir örnek görülmektedir. GalC IF boyaması için sekonder antikor olarak TR konjuge anti-fare IgG antikor kullanılmıştır. GalC boyaması için kırmızı TR filtresi, DAPI boyaması için ise UV filtresi seçilmiştir (100 X)

### 6.3. İnterferon-gamma'nın, Tümör Nekrozis Faktör alfa'nın, Lipopolisakkaridin ve Serum Deprivasyonunun Oligodendrosit Ölümünü İndükleyici Etkisi

Bu çalışmada MTT hücre canlılığı testiyle gösterildiği gibi 100 ng/ml konsantrasyonda TNF $\alpha$  + 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  ve 1  $\mu$ g/ml LPS + 100 U/ml IFN $\gamma$  OL kültürlerinde hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu dozlar OL kültürlerinde sitotoksosite ve protektif ajanların test edilmesi çalışmalarında kullanılan mutad dozlardır. OL kültürlerinin yukarıda belirtilen ajanların bu mutad dozlarıyla, 72 ya da 96 saatlik enkübasyonu % 45-60 arasında değişen değerlerde hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu çalışmada primer amaç çeşitli maddelerin hücre koruyucu özelliklerinin araştırılması olduğu için toksik ajanların tek tek kullanımı, doz titrasyonu ve ilk 48 saatlik sürede oluşturdukları sitotoksosite incelenmemiştir.

Bu çalışmada MTT testi sonuçlarına göre 100 ng/ml konsantrasyonda TNF $\alpha$  + 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$ 'nın OL kültürlerine eklenmesi ve 72 saat enkübasyonu sonucunda hücre canlılığı oranı kontrol kültürleri % 100 kabul edildiğinde ortalama % 44.7  $\pm$  1.7'e düşmektedir (Şekil 8). Yine MTT sonuçlarına göre 1  $\mu$ g/ml konsantrasyonda LPS + 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$ , OL kültürlerine eklendiğinde hücre canlılığı oranını 72 saatlik enkübasyon süresi sonunda ortalama % 43.1  $\pm$  3.8'e düşürmektedir (Şekil 10).

Primer OL kültürlerinde LDH testi sonuçlarına göre 100 ng/ml konsantrasyonda LPS + 200 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  kültürlerine eklendiğinde sitotoksosite oranı 72 saatlik enkübasyon süresi sonunda ortalama % 24.1  $\pm$  3.4, 96 saatlik enkübasyon süresi sonunda ortalama % 91.6  $\pm$  7.1'dir. Farklı doz şemalarıyla uygulanan bu hasar modelinde LDH testi ile elde edilen sitotoksosite değeri 72. saatte MTT testiyle elde edilen hücre canlılığı azalması oranlarından daha düşük bulunmuştur. Bu durum farklı doz şemalarının kullanımı yanısıra MTT testinin LDH testinden daha duyarlı olmasına da bağlı olabilir.

MTT testi sonuçlarına göre OL kültürlerinde hücre canlılığı oranı 72 saatlik SD ardından ortalama % 73.7  $\pm$  2.2 (Şekil 11) , 96 saatlik SD'nun ardından ortalama % 54.9  $\pm$  1.2'ye düşmektedir (Şekil 12). Bu sonuçlar SD'nun OL kültürlerinde zamana bağımlı olarak hücre canlılığı azalmasına yol açtığını göstermektedir.

#### **6.4. İnterferon-gamma'nın, Tümör Nekrozis Faktör-alfa'nın, Lipopolisakkaridin ve Serum Deprivasyonunun Apoptotik Oligodendrosit Ölümünü İndükleyici Etkisi**

Apostain IF boyama sonuçları mutad dozlarda TNF $\alpha$  + IFN $\gamma$  ve LPS + IFN $\gamma$  kombine kullanımlarının ve SD'nun OL kültürlerinde 72 saatlik enkübasyon süresi sonunda anlamlı düzeyde apoptotik hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. Primer OL kültürlerinde apoptotik (apostain pozitif) hücre oranı kontrol kültürlerinde % 5'i aşmazken (Şekil 13 ve 14), bu oran TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  kombine kullanımıyla ortalama % 62.5  $\pm$  5.4 (Şekil 14), ve LPS + IFN $\gamma$  kullanımıyla ortalama % 48.6  $\pm$  3.4 ve SD ile ortalama % 59.6  $\pm$  6.2'ye yükselmektedir (Şekil 13).

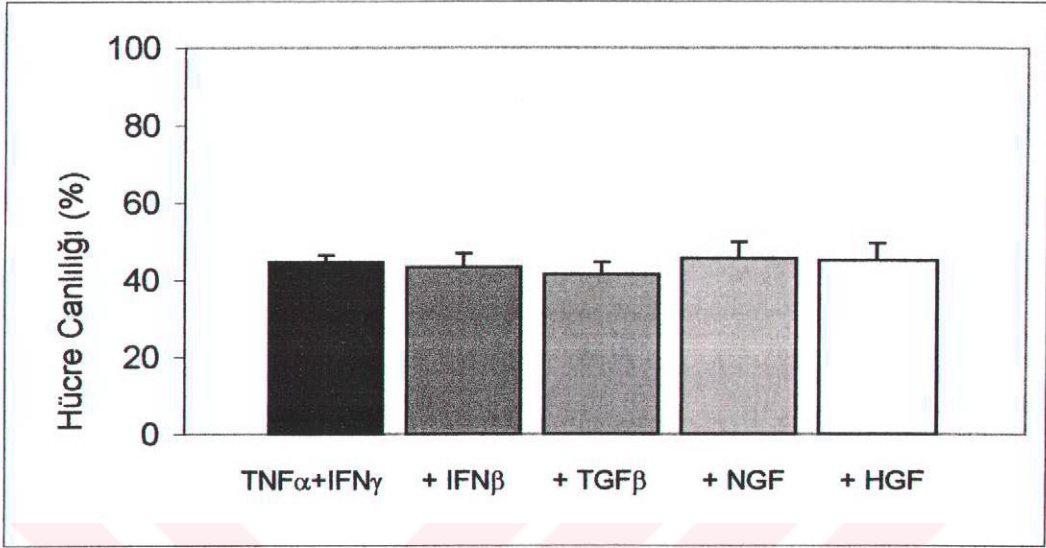
#### **6.5. İnterferon-beta, Transforming Growth Faktör-beta, Hepatosit Growth Faktör ve Nerve Growth Faktör Oligodendrosit Ölümüne Karşı Koruyucu Değildir**

MTT hücre canlılığı testi sonuçları 1000 U/ml IFN $\beta$ , 100 ng/ml TGF $\beta$ , 300 ng/ml HGF ve 100 ng/ml NGF'nin 72 saatlik enkübasyon süresinin sonunda 100 ng/ml konsantrasyonda TNF $\alpha$  + 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  ile indüklenen OL ölümünü önlemediğini göstermektedir (Şekil 8). Bu deneyde olası koruyucu ajanların eklenmediği kültürlerle ait ortalama hücre canlılığı değerleri ( % 44.7  $\pm$  1.8), IFN $\beta$  (% 43.3  $\pm$  3.6), TGF $\beta$  (% 41.4  $\pm$  3.2), NGF (% 45.7  $\pm$  4.2) ve HGF (% 45.2  $\pm$  4.4) eklenmesiyle anlamlı düzeyde değişiklik göstermemektedir.

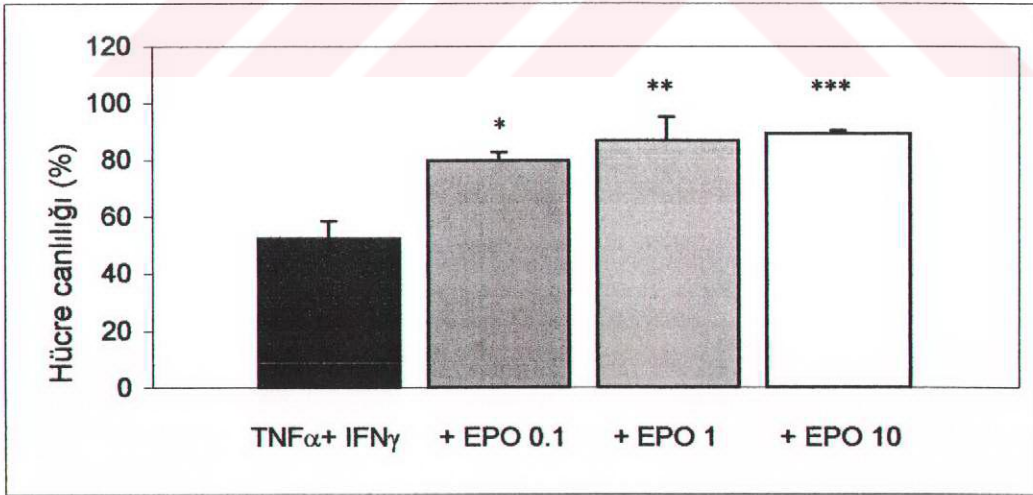
#### **6.6. Eritropoetinin oligodendrosit ölümüne karşı koruyucu etkisi**

EPO, OL kültürlerinin 100 ng/ml konsantrasyonda TNF $\alpha$  + 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  ile 72 saat süreyle enkübasyonu sonucu indüklenen hücre ölümünü anlamlı düzeyde azaltmaktadır (Şekil 9). Bu koşullarda yalnız toksik maddelerle karşılaşan kültürlerde hücre canlılığı oranı ortalama 52.4  $\pm$  6.1 bulunmuşken, bu oran toksik maddelerle aynı zamanda 0.1 U/ml EPO eklenen kültürlerde 79.7  $\pm$  2.9, 1.0 U/ml EPO eklenen kültürlerde ortalama 86.6  $\pm$  8.6 ve 10.0 U/ml EPO eklenen kültürlerde ortalama 89.0  $\pm$  1.2 olarak saptandı. Yalnız toksik madde eklenen ve EPO bulunmayan kültürlerin ortalama

değeriyle karşılaştırıldığında bu değerler hücre canlılığında anlamlı düzeyde artışı göstermektedir (0.1 U/ml EPO için  $p = 0.02$ ; EPO 1.0 U/ml için 0.04 ve EPO 10 U/ml için 0.03). EPO'in bu hasar modelinde koruyucu etkisi doza bağımlı görünmemektedir.

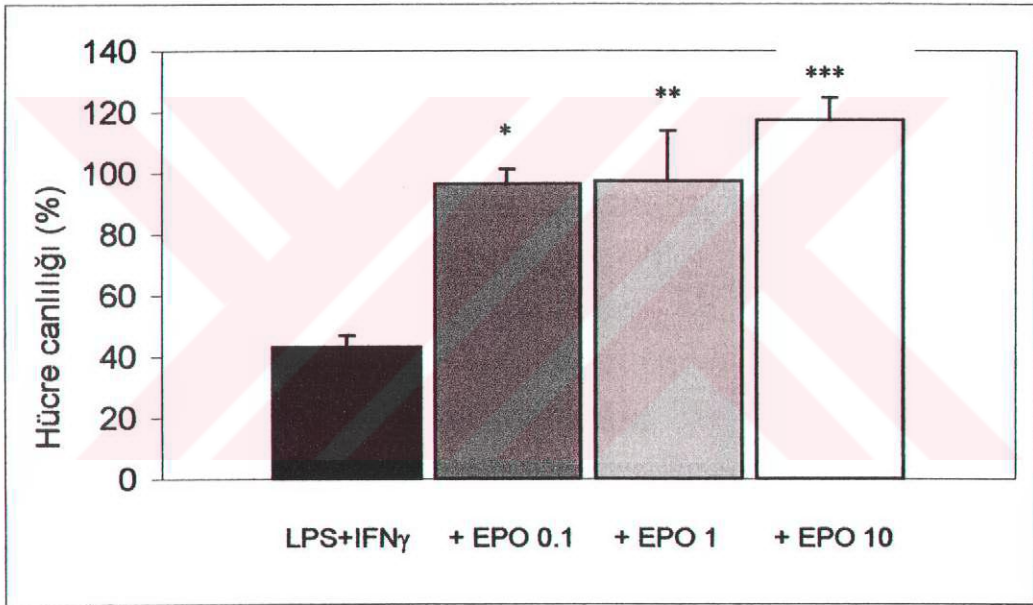


**Şekil 8.** MTT sonuçlarına göre IFN $\beta$ , TGF $\beta$ , HGF ve NGF, 72 saat süreyle 100 ng/ml dozda TNF $\alpha$  ve 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  ile indüklenen OL ölümünü önleyici etki göstermemektedir.



**Şekil 9.** MTT sonuçlarına göre değişik dozlarda EPO, 72 saat süreyle 100 ng/ml dozda TNF $\alpha$  ve 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  ile indüklenen OL ölümünü önleyici etki göstermektedir ve bu etki doza bağımlı görünmemektedir (kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında \*  $p = 0.02$ ; \*\*  $p = 0.04$ ; \*\*\*  $p = 0.03$ ).

EPO, OL kültürlerinin 1 µg/ml LPS + 100 U/ml IFN $\gamma$  ile 72 saat süreyle enkübasyonu sonucu indüklenen hücre ölümünü anlamlı düzeyde azaltmaktadır (Şekil 10). Bu koşullarda yalnız toksik maddelerle karşılaşan kültürlerde hücre canlılığı oranı ortalama  $43.1 \pm 3.8$  bulunmuşken, bu oran toksik maddelerle aynı zamanda 0.1 U/ml EPO eklenen kültürlerde  $96.5 \pm 4.6$ , 1.0 U/ml EPO eklenen kültürlerde ortalama  $97.4 \pm 16.4$  ve 10.0 U/ml EPO eklenen kültürlerde ortalama  $117.4 \pm 7.3$  olarak saptandı. Yalnız toksik madde eklenen ve EPO bulunmayan kültürlerin ortalama değeriyle karşılaştırıldığında bu değerler hücre canlılığında kullanılan bütün EPO dozları için anlamlı düzeyde artışı göstermektedir (0.1 U/ml EPO için  $p = 0.001$ ; EPO 1.0 U/ml için  $p = 0.02$  ve EPO 10 U/ml için  $p = 0.001$ ). EPO'nun bu hasar modelinde koruyucu etkisi doza bağımlı görünmemektedir.



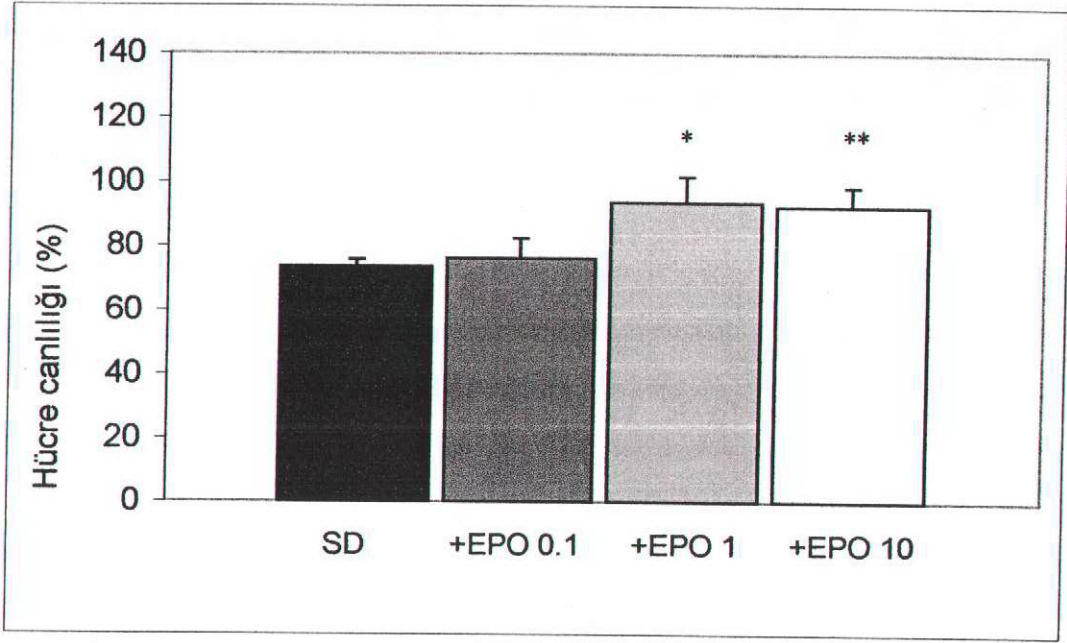
**Şekil 10. MTT sonuçlarına göre değişik dozlarda EPO, 72 saat süreyle 1 µg/ml dozda LPS ve 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  ile indüklenen OL ölümünü önleyici etki göstermektedir ve bu etki doza bağımlı görünmemektedir (kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında \*  $p = 0.001$ ; \*\*  $p = 0.02$ ; \*\*\*  $p = 0.001$ ).**

LDH sonuçlarına göre hasar modelinden 24 saat önce 2, 10, 20 ve 200 U/ml konsantrasyonlarda uygulanan EPO, 100 ng/ml LPS + 200 U/ml IFN $\gamma$  ile 72 ve 96 saat süreyle enkübasyonu sonucu indüklenen hücre ölümünü 2 U/ml doz dışında anlamlı olarak

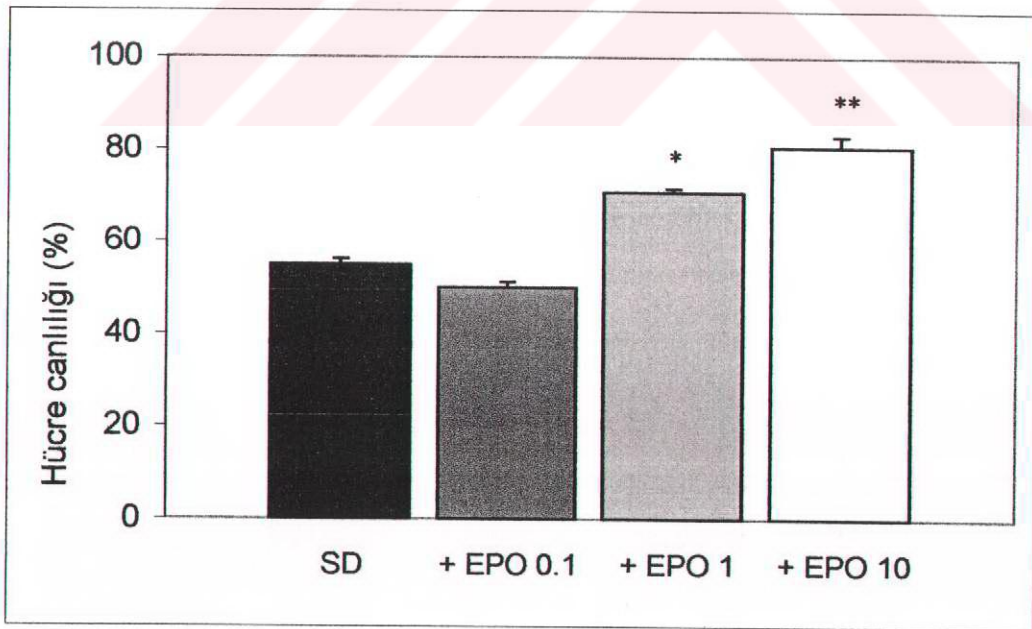
azaltmaktadır. Sözü edilen dozlarda LPS + IFN $\gamma$  72. saatte ortalama %  $24.1 \pm 3.4$ , 96 saatlik enkübasyon süresi sonunda ise ortalama %  $91.6 \pm 7.1$  oranında sitotoksositeye yol açmıştır. Hasar başlangıcından 24 saat önce uygulanmaya başlanan 2.0 U/ml dozda EPO 72. saatte sitotoksositeyi anlamlı düzeyde azaltmamıştır ( $21.8 \pm 4.1$ ). Buna karşılık 20 U/ml dozda EPO ve 200 U/ml dozda EPO uygulamasıyla elde edilen sitotoksosite değerleri (sırasıyla  $16.5 \pm 3.9$  ve  $4.2 \pm 1.7$ ) EPO bulunmayan koşuldaki sitotoksosite değerinden anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla  $p = 0.02$  ve  $0.001$ ). MTT testiyle elde edilen sonuçların aksine uygulanan bu farklı doz şemalarında EPO, LPS + IFN $\gamma$  ile oluşturulan hücre hasarını doza bağımlı olarak azaltmaktadır. Ancak özellikle 200 U/ml EPO dozu *in vitro* kültür çalışmaları için mutad bir doz değildir. Fakat yine de bu bulgular EPO'nun bu hücre sisteminde çok geniş bir etki aralığının bulunduğunu göstermektedir. EPO'nun hasarın başlangıcından 24 saat önce kültür ortamına 10 U/ml konsantrasyonda eklenmesi 96. saatte 100 ng/ml LPS + 200 U/ml IFN $\gamma$  ile indüklenen sitotoksositeyi (%  $91.6 \pm 7.1$ ) anlamlı düzeyde düşürmektedir ( $40.8 \pm 4.6$ ;  $p = 0.001$ ).

EPO, OL kültürlerinde 72 ve 96 süreli SD ile indüklenen hücre ölümünü anlamlı düzeyde azaltmaktadır (Şekil 11 ve 12). Bu koşullarda EPO eklenmeyen ve SD uygulanan kültürlerde hücre canlılığı oranı 72. saatte ortalama  $73.7 \pm 2.2$  bulunmuşken, SD'na bağlı hücre ölümü 96. saatte daha da artarak hücre canlılığı oranı ortalama  $54.9 \pm 1.2$ 'ye düşmüştür. EPO, OL kültürlerinde SD'nun indüklediği hücre ölümüne karşı doza bağımlı görünen koruyucu bir etki göstermektedir. EPO'nun 0.1 U/ml dozu 72. ve 96. saatte anlamlı koruyucu etki göstermemektedir. SD uygulanan ve 0.1 U/ml EPO eklenen kültürlerde ortalama hücre canlılığı oranı 72. saatte  $76.3 \pm 6.2$  ( $p = 0.73$ ), 96. saatte ise  $50.0 \pm 1.1$  ( $p = 0.1$ ) bulundu. 1.0 U/ml dozda EPO ise hücre canlılığı oranını 72. saatte  $93.7 \pm 8.2$ 'ye, 96. saatte ise  $70.7 \pm 0.8$ 'e yükseltmektedir. Bu koruyucu etki istatistik değerlendirme sonucu anlamlı bulundu (72. saat için  $p = 0.03$ , 96. saat için  $p = 0.048$ ). EPO'nun bu dozda koruyucu etkisinin 96. saatte azaldığı görülmektedir. 10 U/ml dozda EPO da 72 ve 96. saatlerde ortalama hücre canlılığı oranını anlamlı düzeyde yükseltmektedir. Ortalama hücre canlılığı değerleri bu kültür koşulunda 72. saat için  $92.6 \pm 5.9$  ( $p = 0.03$ ), 96. saat için  $80.5 \pm 2.5$  ( $p = 0.03$ ) bulundu. Bu sonuçlara göre 10 U/ml dozda EPO'nun SD'na karşı koruyucu etkisi 96. saatte de azalmadan sürmektedir.





**Şekil 11.** MTT sonuçlarına göre 1.0 ve 10.0 U/ml konsantrasyonda EPO, 72 saat süreyle SD ile indüklenen OL ölümünü önleyici etki göstermektedir (kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında \*  $p = 0.03$ ; \*\*  $p = 0.03$ ).



**Şekil 12.** MTT sonuçlarına göre 1.0 ve 10.0 U/ml konsantrasyonda EPO, 96 saat süreyle SD ile indüklenen OL ölümünü önleyici etki göstermektedir (kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında \* $p = 0.048$ ; \*\*  $p = 0.03$ ).

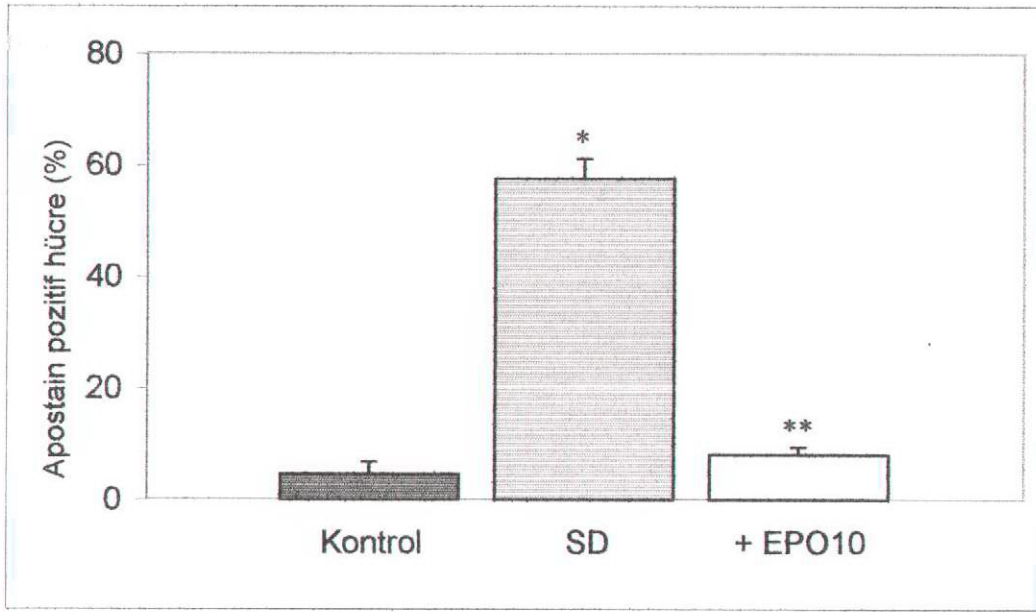
## 6.7. Eritropoetin'in Apoptotik Oligodendrosit Ölümüne Karşı Koruyucu Etkisi

Apostain IF boyama sonuçlarına göre EPO, OL kültürlerinde çeşitli hasar modelleriyle indüklenen apoptotik hücre ölümünü önlemektedir (Şekil 13-16). Bu deneylerde tek doz EPO (10 U/ml) kullanılmıştır. Sitotoksikite deneylerinde EPO'nun bu dozunun SD modeline karşı en etkin dozu olduğu saptandığı için apostain deneylerinde bu EPO dozu seçilmiştir.

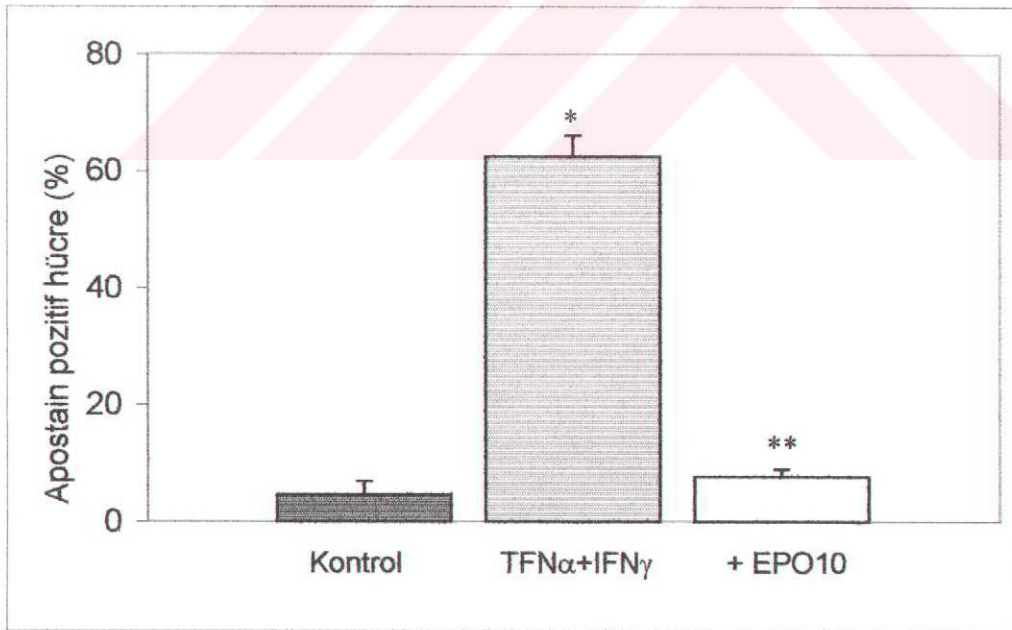
EPO, 72 saat süreli SD ile indüklenen apoptotik hücre ölümünü anlamlı düzeyde azaltmaktadır (Şekil 13). Kontrol değerleri ( $5.2 \pm 2.0$ ) ile karşılaştırıldığında bu koşullarda indüklenmiş apoptotik hücre oranı ( $59.6 \pm 6.2$ ) istatistiksel düzeyde anlamlı olarak yüksektir ( $p = 0.001$ ). Apoptotik hücre oranı 10 U/ml konsantrasyonda uygulanan EPO ile anlamlı düzeyde ( $9.7 \pm 2.8$ ) düşmektedir ( $p = 0.001$ ).

EPO, 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS + 100 U/ml IFN $\gamma$  ile 72 saat süreyle enkübasyon sonucu indüklenen apoptotik hücre ölümünü anlamlı düzeyde azaltmaktadır. Kontrol değerleri ile ( $4.2 \pm 1.8$ ) karşılaştırıldığında bu maddelerle enkübasyon sonucu indüklenmiş apoptotik hücre oranı ( $48.6 \pm 3.4$ ) istatistiksel düzeyde anlamlı olarak yüksektir ( $p = 0.001$ ). Apoptotik hücre oranı 10 U/ml konsantrasyonda EPO ile anlamlı düzeyde ( $12.2 \pm 2.8$ ) düşmektedir ( $p = 0.002$ ).

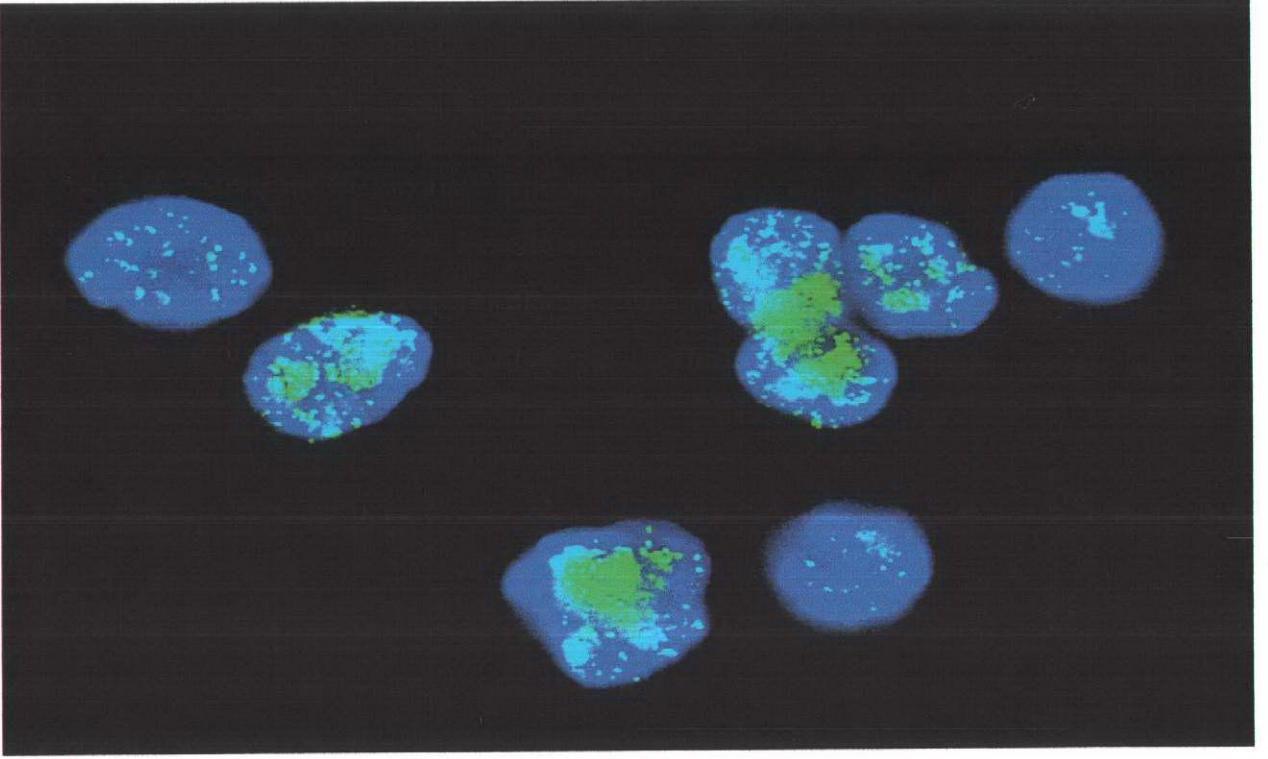
EPO, 100 ng/ml konsantrasyonda TNF $\alpha$  + 100 U/ml konsantrasyonda IFN $\gamma$  ile 72 saat süreyle enkübasyon sonucu indüklenen apoptotik hücre ölümünü anlamlı düzeyde azaltmaktadır (Şekil 14-16). Kontrol değerleri ( $3.7 \pm 1.6$ ) ile karşılaştırıldığında bu sitokinlerle enkübasyon sonucu indüklenen apoptotik hücre oranı ( $62.5 \pm 5.4$ ) istatistiksel düzeyde anlamlı olarak yüksektir ( $p = 0.001$ ). Apoptotik hücre oranı 10 U/ml konsantrasyonda EPO ile anlamlı düzeyde ( $8.2 \pm 2.1$ ) düşmektedir ( $p = 0.001$ ).



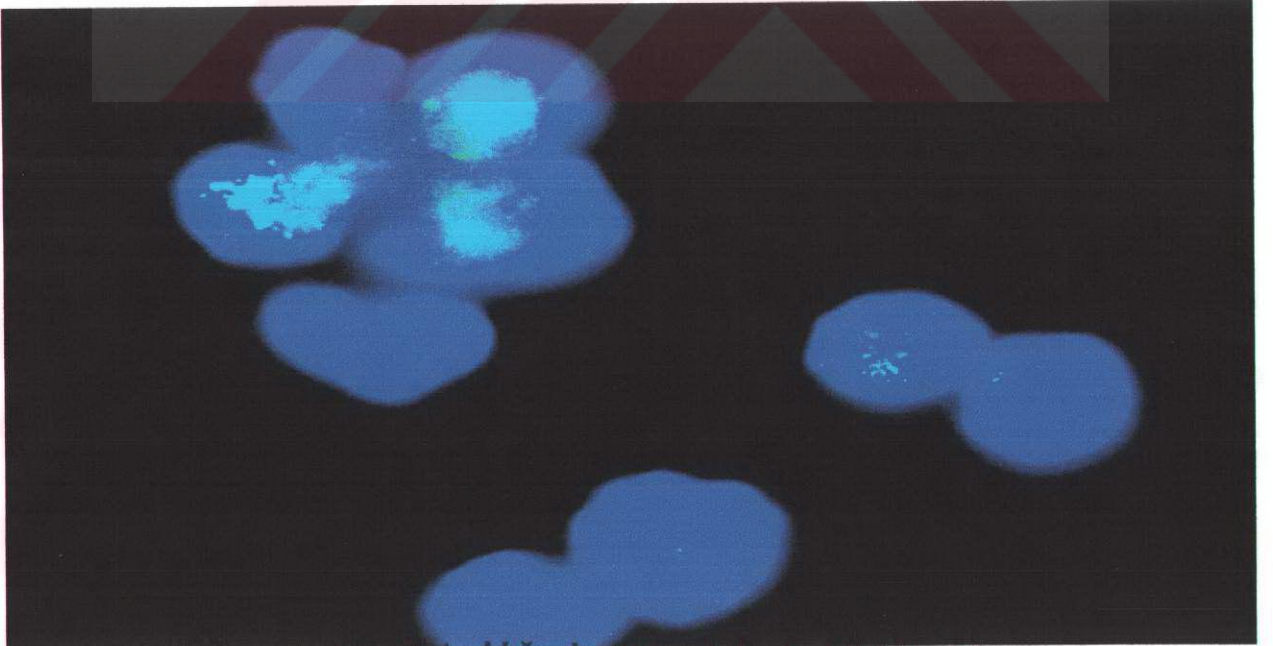
Şekil 13. Apostain IF boyama sonuçlarına göre 72 saat süreyle uygulanan SD, OL kültürlerinde anlamlı düzeyde apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (\* p = 0.001). 10 U/ml konsantrasyonda EPO, SD ile indüklenen OL ölümünü anlamlı düzeyde azaltıcı etki göstermektedir (\*\* p = 0.001).



Şekil 14. Apostain IF boyama sonuçlarına göre 72 saat süreyle uygulanan 100 ng/ml dozda TNFα ve 100 U/ml konsantrasyonda IFNγ, OL kültürlerinde anlamlı düzeyde apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (\*p= 0.001). 10 U/ml konsantrasyonda EPO, bu apoptotik ölümü anlamlı düzeyde azaltıcı etki göstermektedir (\*\* p = 0.001).



**Şekil 15.** Apostain IF boyama sonuçlarına göre 72 saat süreyle uygulanan 100 ng/ml dozda  $TNF\alpha$  ve 100 U/ml konsantrasyonda  $IFN\gamma$ , OL kültürlerinde anlamlı düzeyde apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır. Apostain pozitif boyanan hücreler yeşil görünmektedir. Apostain boyamasıyla birlikte DAPI nükleus boyası da kullanılmıştır. Bu boyayla bütün nükleuslar mavi boyanmaktadır (100 X).

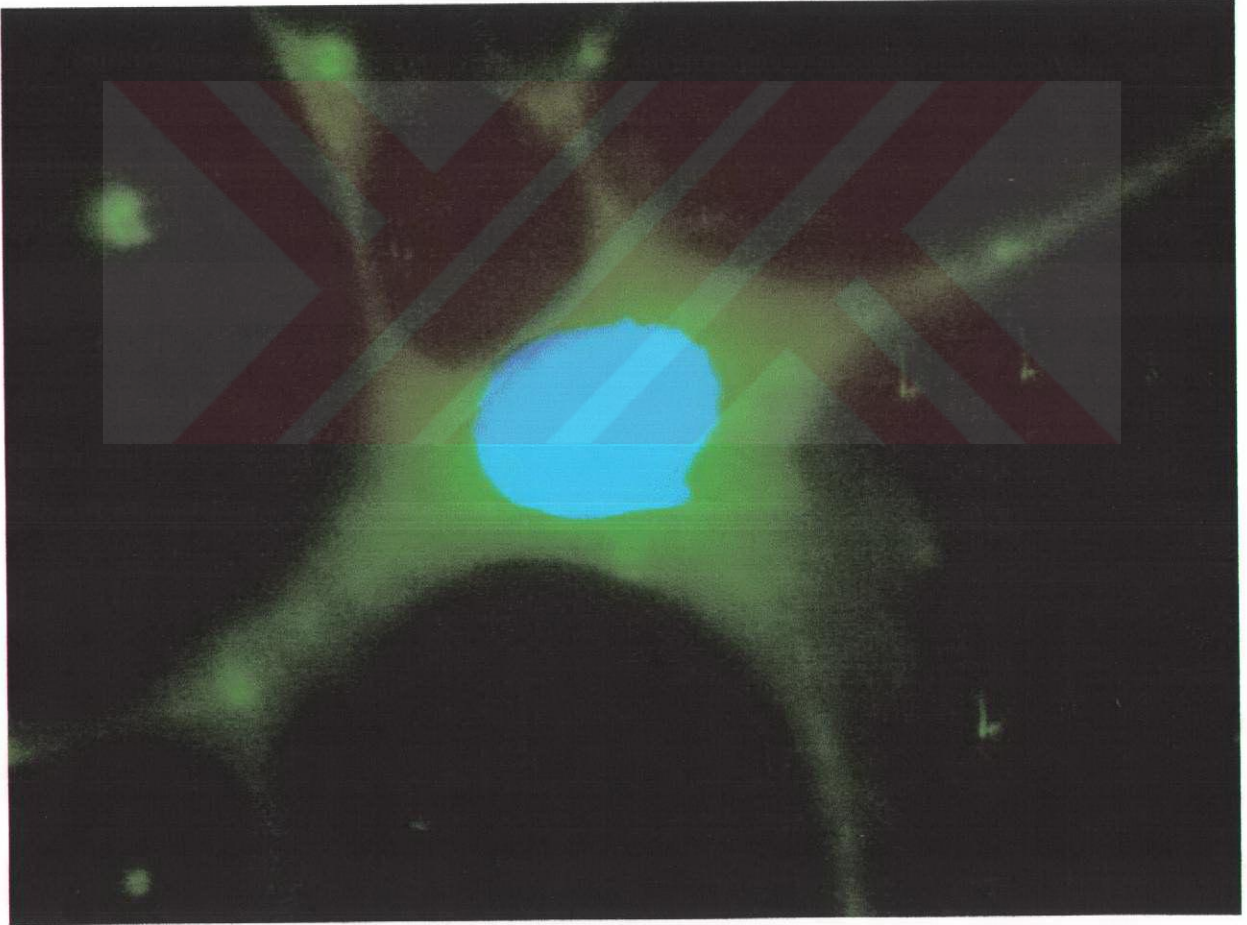


**Şekil 16.** Şekil 15 ile karşılaştırıldığında 10 U/ml dozda EPO'in, 72 saat süreyle uygulanan 100 ng/ml  $TNF\alpha$  ve 100 U/ml  $IFN\gamma$  ile indüklenen apoptotik hücre ölümünü anlamlı olarak azalttığı görülmektedir (100 X).

### 6.8. Oligodendroglial eritropoetin reseptör ekspresyonu

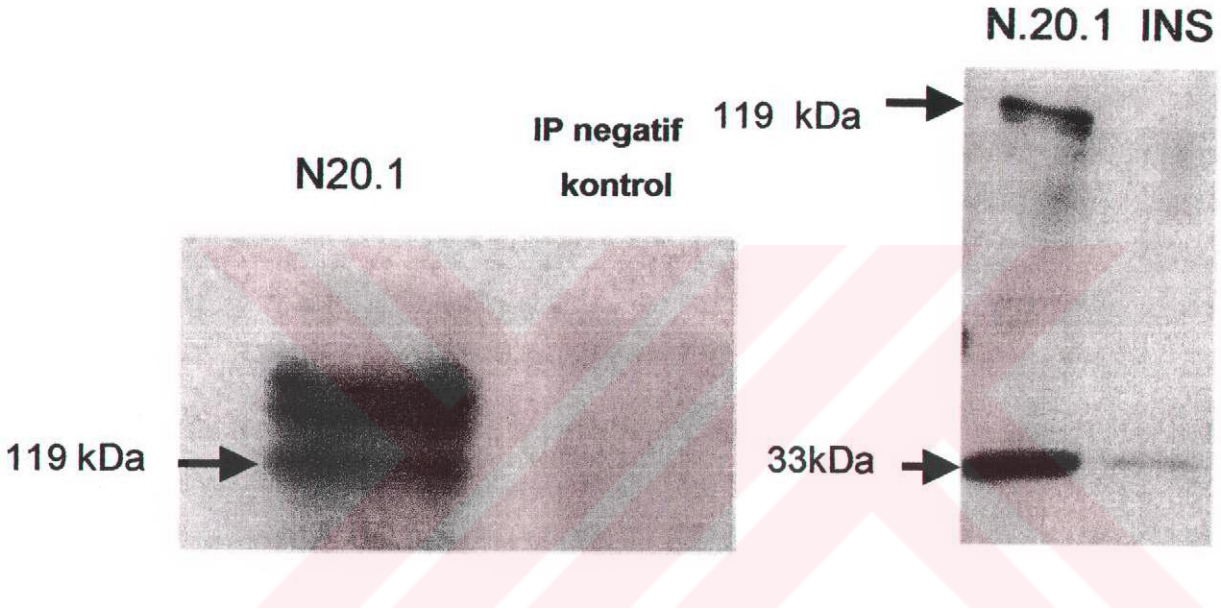
Sitotoksisite deneylerinin sonuçları değişik in vitro hasar modellerinde koruyucu etkisi test edilen ajanlardan yalnızca EPO'in OL ölümünü önlediğini göstermektedir. Bu durum oligodendroglial hücrelerde EPO reseptörünün varlığı sorusunu gündeme getirmiştir. Literatür bilgilerine göre kemirgen OL'de EPOR ekspresyonunu bildirilmemiştir. İnsan OL kültürlerinde yapılan bir çalışmada ise EPOR mRNA ekspresyonu saptanamamıştır (215).

Bu tez çalışmasında EPOR protein ekspresyonu fare primer OL kültürlerinde anti-EPOR IF boyama yöntemiyle, N20.1 hücre hattı kültürlerinde ise WB-IP teknikleriyle araştırıldı. Anti-EPOR antikoruyla IF boyama sonuçları fare primer OL kültüründe hücrelerde bazal EPOR protein ekspresyonu bulunduğunu göstermektedir (Şekil 17).



Şekil 17. Oligodendroglial eritropoetin reseptör ekspresyonu (immünfloresan inceleme). Fare primer OL kültüründe poliklonal tavşan anti-EPOR antikoruyla pozitif boyanan bir hücre görülmektedir. Sekonder antikor olarak FITC konjuge anti-tavşan antikor kullanılmıştır. Nukleus DAPI boyamasıyla görüntülenmiştir (100 X).

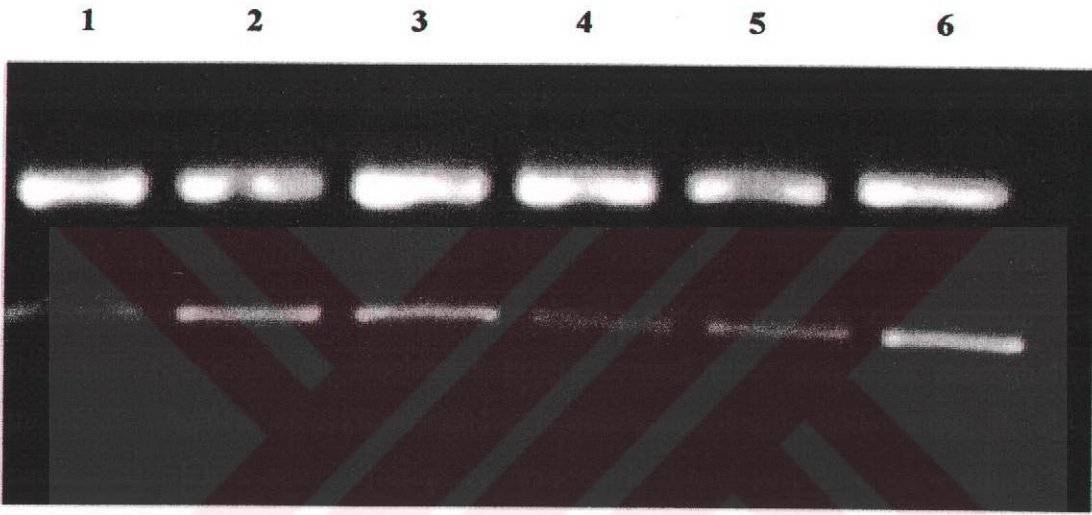
Anti-EPOR kullanılarak N20.1 hücre hattı kültürlerinde yapılan WB-IP incelemeleri de bu hücrelerde bazal EPOR protein ekspresyonu bulunduğunu göstermektedir (Şekil 18). WB incelemesinde sıçan insulinoma hücre hattı olan INS hücre hattında da zayıf EPOR ekspresyonu olduğu görülmektedir.



**Şekil 18. Oligodendroglial eritropoetin reseptör ekspresyonu (WB-IP incelemesi).** Sağda WB sonuçları, solda IP sonuçları gösterilmiştir. WB incelemesinde sıçan insulinoma hücre hattı olan INS'nin de EPOR ekspresyonu olduğu görülmektedir. IP sonuçları N20.1 hücrelerinde üç ayrı ağırlıkta EPOR proteininin varlığına işaret etmektedir. IP incelemesinde negatif kontrol olarak örnek protein eklenmeyen koşul kullanılmıştır. Bu koşulda beklendiği gibi herhangi bir band görünmemektedir.

### 6.9. Oligodendroglial eritropoetin reseptörü mRNA ekspresyonu

Bu tez çalışmasında oligodendroglial hücrelerde EPOR'nun transkripsiyonel düzeyde ekspresyonu da araştırıldı. Bu amaçla N20.1 hücre hattı kültürleri kullanıldı. RT-PCR incelemesinin sonucu N20.1 hücrelerinde bazal EPOR mRNA ekspresyonu olduğunu göstermektedir (Şekil 19). Bu incelemede pozitif kontrol hücre olarak fare astroglial hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerde EPOR mRNA ekspresyonu daha önce bildirilmiştir (29). Bu çalışmada N20.1 hücrelerinde bazal EPOR mRNA ekspresyonu astroglial EPOR mRNA ekspresyonundan kalitatif olarak görece daha zayıf bulundu.



Şekil 19. Oligodendroglial eritropoetin reseptör mRNA ekspresyonu. Üst sırada G3PDH'a, alt sırada EPOR'e ait bandlar görülmektedir. 1. örnek uyarılmamış N20.1 hücrelerine, 2. sıra LPS, 3. sıra IFN $\gamma$ , 4. sıra A $\beta$ , 5. sıra EPO ile enkübe edilmiş N20.1 hücrelerine aittir. Son sırada (6.) astrositlere ait bandlar yer almaktadır.

### 6.10. Oligodendroglial eritropoetin reseptörü mRNA ekspresyonunun inflamatuvar uyaranlarla indüksiyonu

Bu tez çalışmasında oligodendroglial EPOR mRNA ekspresyonunun LPS, IFN $\gamma$ , A $\beta$  peptidin 25-35 fragmanı ve EPO'in kendisi tarafından etkilenip etkilenmediği de araştırıldı. Bu amaçla N20.1 hücre hattı kültürleri bu maddelerle 6 saat süreyle enkübe edildi. RT-PCR incelemesinin kalitatif sonuçları LPS ve IFN $\gamma$ 'nın EPOR mRNA ekspresyonunu uyardığını göstermektedir (Şekil 19). A $\beta$  peptidin 25-35 fragmanı ve EPO'in kendisi ise uyarıcı etkili bulunmadı.

## 7. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında GalC IF boyamasıyla gösterildiği gibi primer OL kültürlerinin saflığı deneyler süresince % 95'den aşağı düşmemiştir. Primer OL kültürlerinin saflığı içerebilecekleri diğer glial hücrelerin sitotoksikite ve koruyuculuk deneylerinin sonuçlarını etkileyebilmesi açısından önemlidir (27, 237). Kullanılan toksik ve olası koruyucu ajanların astroglial ve mikrogial hücrelerin ürettikleri NO gibi toksik ya da trofik faktörler gibi koruyucu maddelerin üretimini uyarabilme ya da baskılayabilme olasılığı bulunmaktadır. Örneğin LPS, mikrogliya ile kontamine olmuş OL kültürlerinde mikrogial NO üretimini uyarak OL hasarını dolaylı olarak da arttırabilir (339). Ayrıca LPS ile aktive olan mikrogial hücreler OL ile doğrudan temas ile de OL hasarını arttırabilir. Çünkü mikrogliya'nın OL hasarına yol açması için doğrudan hücre-hücre etkileşimi de gerekli olabilir (339). Bu tür kontaminasyon kaynağı hücrelerin varlığı deneylerde test edilen olası koruyucu maddelerin koruyucu etkisini artırıcı ve toksik ajanların sitotoksik etkisini azaltıcı yönde de etki gösterebilir. Örneğin IFN $\beta$ , astrosit kültürlerinde NGF üretimini arttırmaktadır (39). NGF ve HGF de OL kültürlerini kontamine edebilen diğer glial hücrelerden OL koruyucu faktörlerin salınmasını uyandırıyor olabilir. Bu durum da *in vitro* bulgularda artefaktı gündeme getirecektir.

Bu çalışmada primer OL kültürlerinin saflık oranının yüksek olduğu GalC IF boyamasıyla gösterilmiştir (Şekil 6). Fakat OL hücre topluluğu farklı gelişim evrelerinde bulunan (pre-OL, immatür OL ve matür OL) oligodendrogial hücreleri içermesi açısından yine de heterojenlik gösterebilmektedir (78). Bu çalışmada matür OL marker'ı olan anti-MBP antikoru, pre-OL marker'ları olan anti-O4 ve öncü hücre marker'ı olan anti-A2B5 antikoları kullanılamamıştır. Kullanılan tek spesifik OL marker'ı olan GalC, pre-OL ile immatür OL geçiş aşamasında hücre yüzeyinde ekspresye edilmeye başlanmakta ve ekspresyonu matürasyon boyunca sürmektedir (78, 205). Bu nedenle bu marker OL gelişim evrelerinden tek birine özgü değildir. Ancak kültürlerin faz kontrast mikroskop altında izlenmesi sırasında OL hücrelerin morfolojik olarak uzantı sayılarına göre değerlendirildiğinde immatür OL aşamalarına uyduğu saptanmıştır. Değişik deneylerde kültürlerde GalC pozitif boyanan hücre sayısının % 95'den az olmaması da pre-OL oranının düşük olduğunu düşündürmektedir. Çok sayıda uzantısı ve miyelin membran yapısı gösteren matür OL morfolojisine uyan hücre sayısı ve bipolar uzantılı pre-OL sayısı her kültürde birkaç hücreden fazla olmamıştır. Hücreler 3-4' den fazla uzantıları olmaları özelliğiyle immatür OL aşamalarındaki hücrelere uymaktadır



(78). Primer OL kültürlerinde hücrelerin büyük bir bölümünün aynı gelişim evresinde bulunması farklı gelişim evrelerindeki OL'in hasara karşı yanıtları farklı olabileceği için aranan bir özelliktir. İmmatür ve matür OL'in hipoksi, iskemi ve sitokinlerle indüklenen hasar modellerine karşı yanıtlarının ve duyarlılıklarının farklı olduğu daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (20, 27, 49, 50, 260). Benzer biçimde olası koruyucu maddelerin etkilerini gösterebilmeleri için reseptör-ligand etkileşimleri gerektiğinde bu hücrelerde gelişimsel reseptör ekspresyon paterni de önemli olabilir. Örneğin immatür ve matür OL'de EPOR ekspresyon paterni farklı olabilir. Fakat bu henüz araştırılmamış bir konudur. Bu tez çalışmasında da oligodendroglial EPOR ekspresyonunun gelişimsel paterni incelenmemiştir. Sonuç olarak herhangi bir hasar modeli ve protection deneyleri ayrı ayrı homojen immatür ya da homojen matür OL kültürlerinde yapılmalı ya da mikst OL kültürlerinde gelişim evrelerine özgül marker'ların da kullanılacağı deneyler planlanmalıdır. Yukarıda da sözü edildiği gibi bu çalışmada kullanılan primer OL kültürleri çok yüksek oranda homojen immatür OL aşamasındaki hücrelerden oluşmuştur.

Bu tez çalışmasında yenidoğan fare primer OL kültürlerinin yanısıra fare oligodendroglial hücre hattı (N20.1) da kullanılmıştır. Hücre hatlarının avantajı saf ve homojen tek tip hücreden oluşması ve WB-IP gibi çok fazla sayıda hücre kullanılmasının gerektiği moleküler biyolojik yöntemler için yeterli sayıda hücre elde edilmesini sağlamasıdır. Fakat hücre hattının fenotipik ve fonksiyonel özellikleri, köken aldığı hücre tipinin primer kültürlerinkinden farklılık gösterebilir. Bu farklılıklar *in vitro* ortamda pasajlar sırasında da oluşabilir. Bu nedenle hücre hattının başlangıçta tanımlanmış ve yayınlanmış fenotipik ve fonksiyonel özelliklerinin kullanıcı laboratuvar tarafından tekrar kontrol edilmesi uygundur. N20.1 hücre hattı ısıya duyarlı SV40 large T antijeni taşıyan bir retroviral vektörle immortalize edilmiş fare oligodendroglial hücre hattıdır (305). Bu hücre hattı immatür OL'in bazı özelliklerini göstermekte ve GalC, sülfatid, 2',3'-siklik nükleotid fosfodiesteraz gibi OL marker'larını ve MBP ve PLP mRNA'larını ekspresse etmektedir (305). Bu çalışmada kullanılan N20.1 hücre hattı hücrelerinin tamamının GalC pozitif boyandığı saptandı (Şekil 7). Bu bulgu deneylerde kullanılan N20.1 hücrelerinin OL fenotipik özelliklerinden en azından birini sürdürdüğünü göstermektedir. Fakat bu çalışmada yukarıda sözü edilen diğer fenotipik özellikler araştırılmamıştır.

TNF ve OL arasındaki bağlantı uzun süreden beri ilgi çekmektedir. Ancak *in vitro* çalışmaların sonuçları arasında bazı tutarsızlıklar bulunmaktadır (27). Çok sayıda çalışma soluble TNF- $\alpha$ 'nın *in vitro* kemirgen OL'ni apoptoz ile (20, 129, 176, 285, 302, 329) ya da nekroz ile (261, 263) öldürdüğünü saptamışken bazı çalışmalarda da sitotoksik etki saptanamamıştır (51, 201, 276). Bazı çalışmalarda da öncü hücrelerin bu sitokine duyarlı olduğu, olgun OL'in etkilenmediği bildirilmiştir (260). Bazı *in vitro* çalışmalarda ise TNF $\alpha$ 'nın OL'de potansiyel olarak zararlı, fakat öldürücü olmayan metabolik ve fizyolojik değişiklikler oluşturduğu bildirilmiştir (1, 49, 197, 276, 337).

Farklı çalışmaların sonuçları arasındaki tutarsızlıkların çok sayıda olası açıklaması bulunabilir (27). Bazı çalışmalarda OL canlılığı MTT testiyle değerlendirilmiştir. LDH testinden daha duyarlı olmasına karşın MTT testi ile canlı, fakat metabolizmaları bozulmuş ve kısmi hasara uğramış hücreler de ölü hücre olarak değerlendirilmiş olabilir. İkinci olasılık sitokine maruz kalma süresinin canlılık oranı üzerine etkisinin olmasıdır. Gerçekten de bu süre çalışmalar arasında farklılık göstermektedir (277). Üçüncü bir olasılık farklı canlı türlerine ait oligodendroglial hücrelerin ve aynı türe ait fakat farklı gelişim evrelerinde olan OL hücrelerin sitokinlere yanıtlarının farklı olmasıdır. Son bir olasılık da OL kültürlerine karışmış olabilen diğer glial hücrelerin çalışma sonuçlarını etkileyebileceğidir (27).

Kemirgen OL ile yapılan bu çalışmaların sonuçlarının insan OL kültür çalışmalarına ve *in vivo* duruma nasıl ekstrapole edileceği de ayrı bir sorundur (27). İnsan OL TNFR1 ekspresse etmektedir (317), fakat soluble TNF $\alpha$  ya da lenfotoksin ile ölmemektedir (14, 89, 317, 339). Ancak bu hücrelerde TNF $\alpha$ 'ya maruz kalma sonucu yine de öldürücü olmayan bazı zararlı etkilerin olduğu bildirilmiştir (91, 197).

*In vitro* IFN $\gamma$  ve OL toksisitesi çalışmalarının sonuçları da TNF- $\alpha$  çalışmalarına benzer biçimde tutarlı değildir. Bu sitokinin *in vitro* OL'i (302) ya da OL öncülerini (13) öldürdüğünü bildiren çalışmaların yanısıra bir çalışmada da IFN $\gamma$ 'nın OL öncüsü hücrelerde apoptotik, olgun OL'de ise nekrotik hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır (20). TNF $\alpha$  bu etkiyi güçlendirmektedir (13). IFN $\gamma$  ise TNF reseptör ekspresyonunu arttırmaktadır (1). IFN $\gamma$  aynı zamanda hücre yüzeyinde hücre ölüm reseptörü olan Fas'ın ekspresyonunu uyarmakta ve belki de bu yolla hasar ile ilişkili yanıtları modüle etmektedir (238). Başka çalışmalarda ise

IFN $\gamma$ 'nın öldürücü etkisi saptanamamış (197) ya da yalnızca metabolik etkiler ve hücre farklılaşması üzerine etkiler yarattığı bildirilmiştir (1). Transgenik fare çalışmaları ise IFN $\gamma$ 'nın OL üzerine zararlı bir etkisini düşündürmektedir (69, 133).

Ancak TNF $\alpha$  ve lenfotoksin ya da yalnız TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  reseptörü knockout farelerde yapılan *in vivo* EAE çalışmaları bu sitokinlerin MSS demiyelinizasyonunda ikili bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (109, 175, 250, 316). Bu farelerde EAE klinik skoru, inflamasyon ve demiyelinizasyon kontrol farelerdekenden anlamlı olarak daha yüksektir. Her ne kadar akut ve kronik MS plaklarında apoptotik hücrelerin % 14-40 arasında bir oranının OL olduğu saptanmışsa da bu sitokinlerin *in vivo* doğrudan OL ölümünden sorumlu olup olmadığı henüz kesin değildir (86). Bu sitokinlerin hastalığın değişik evrelerinde ve değişik hücre tipleri (hedef hücre olarak OL ve efektör hücre olarak infiltran hücreler) üzerine farklı yönlerde etkiler gösteriyor olması da olasıdır (148, 149, 242). Kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyon modelinde TNF $\alpha$  yokluğu remiyelinizasyonu geciktirmektedir (16). MS hastalarında yapılan bir ön klinik çalışmada anti-TNF tedavisinin yarar sağlamadığı gösterilmiştir (291). Bu çalışmada anti-TNF tedavisinin klinik olarak alevlenmeleri ve radyolojik olarak lezyonları arttırdığı saptanmıştır. *In vivo* fare intravitreal boşluğuna TNF $\alpha$  enjeksiyonu internodal miyelin şişmesine ve optik sinir OL'de morfolojik değişikliklere yol açmışsa da hücre ölümüne neden olmamıştır (47). Transgenik fare çalışmalarında da çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. TNF $\alpha$  overekspresyonu daha şiddetli EAE oluşmasına (288) ya da proinflamatuvar sonuçlara, demiyelinizasyona ve OL apoptozuna neden olmuşken (2, 3, 241) TNF $\alpha$  knockout farelerde EAE şiddetinde artma olmuştur (175). Bu son bulgu TNF $\alpha$ 'nın olasılıkla inflamatuvar hücrelerin ölümünü indükleyerek anti-inflamatuvar bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

MS örnekleriyle yapılan *in situ* çalışmalar MS'da farklı hücre ölüm tiplerinin (apoptotik ya da nekrotik) olabileceğini düşündürmektedir. Bazı çalışmalarda akut ve kronik lezyonlarda apoptotik OL ölümü saptanmışken (86, 179, 228, 302) diğerlerinde nekrotik hücre ölümünün varlığını düşündürür bulgular elde edilmiştir (246, 247). Sonuçlar arasındaki farklılıklardan ölüm sonrası dokunun elde edilme süresi, doku fiksasyonu, apoptozu değerlendirme yöntemleri ve apoptotik hücrelerin OL olup olmadığının belirlenmesi gibi teknik faktörler de kısmen sorumlu olabilir. Ancak MS'da farklı hastalarda, aynı hastada

hastalığın farklı dönemlerinde ve hatta aynı hastada, aynı dönemde bile birden çok OL ölüm tipi (hem apoptotik, hem nekrotik) de söz konusu olabilir.

*In vivo* inflamasyon ile demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon arasındaki bağlantı da henüz açıklığa kavuşmamış bir konudur. Bazı çalışmalarda inflamasyonun remiyelinizasyonu uyarıcı bir etkisi olduğunu düşündüren bulgular elde edilmiştir (74, 95, 295). Ancak bu etki inflamatuvar hücrelerden salınan nörotrofik faktörlere bağlı dolaylı bir etki de olabilir.

Bu tez çalışmasında OL hasarı yaratmak için TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  ayrı ayrı kullanılmamış ve doz titrasyonu yapılmayarak her iki sitokinin fareye yakın bir tür olan sıçan OL'de toksik etki oluşturduğu bildirilen mutad dozları kullanılmıştır (100 ng/ml TNF $\alpha$  ve 100 U/ml IFN $\gamma$ ). Çünkü bu çalışmada amaç bu sitokinlerin OL üzerine sitotoksik etki profillerinin (doz, süre) çıkartılması değil bu sitokinlerin toksik etki yarattığı bilinen dozlarda kullanımına karşı değişik ajanların koruyucu etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu nedenle bu ajanların ilk 48 saatteki etkileri de araştırılmamıştır. TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  yukarıda belirtilen dozlarda ve 72 saatlik enkübasyon süresi sonunda fare primer OL kültürlerinde sitotoksik etkiye ve apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır (Şekil 8,9, 14-16). Bu sonuçlar bu hasar modelinin olası koruyucu ajanların koruyucu etkinliğinin araştırılması açısından uygun bir model olduğunu göstermektedir.

Bugüne kadar LPS'in OL üzerine sitotoksik etkisini araştıran bir çalışma yayınlanmıştır (211). Söz konusu çalışmada LPS'in hem tek başına hem de IFN $\gamma$  ile birlikte uygulandığında 48. saatte belirginleşen sitotoksik etkisi bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre LPS ve IFN $\gamma$ 'nın kombine kullanımı bu maddelerin tek tek kullanımından daha belirgin sitotoksikiteye yol açmaktadır (211). Bu tez çalışmasında OL hasarı yaratmak için LPS ve IFN $\gamma$  ayrı ayrı kullanılmamış ve doz titrasyonu yapılmayarak her iki maddenin fareye yakın bir tür olan sıçan OL'de toksik etki oluşturduğu bildirilen mutad dozları kullanılmıştır (1  $\mu$ g/ml LPS ve 100 U/ml IFN $\gamma$ ). Çünkü bu çalışmada amaç bu maddelerin OL üzerine sitotoksik etki profillerinin (doz, süre) çıkartılması değil bu sitokinlerin toksik etki yarattığı bilinen dozlarda kullanımına karşı değişik ajanların koruyucu etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu nedenle bu ajanların ilk 48 saatteki etkileri de araştırılmamıştır. LPS ve IFN $\gamma$  yukarıda belirtilen dozlarda ve 72 saatlik enkübasyon süresi sonunda fare primer OL

kültürlerinde sitotoksik etkiye ve apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır (Şekil 10). Bu sonuçlar sıçan primer OL kültüründe elde edilen sonuçlara benzerdir (211) ve bu hasar modelinin de olası OL koruyucu ajanların koruyucu etkinliğinin araştırılması açısından uygun bir model olduğunu göstermektedir. Ayrıca LPS doğal immün yanıt uyaramı olduğu için bu hasar modelinde elde edilen *in vitro* sonuçların AH gibi inflamatuvar patogenezi de olduğu düşünülen nörodejeneratif hastalıklara ekstrapolasyonu da uygun olacaktır (4). Ayrıca MS gibi otoimmün hastalıklarda T hücresi aracılı spesifik immün yanıtların yanısıra kompleman gibi doğal immün yanıt elemanlarının da rolü olduğuna ilişkin bulgular da giderek artmaktadır (27, 247).

Bu çalışmada OL kültürlerinde SD hasar modeli de kullanılmıştır. SD, primer sıçan ve insan OL kültürlerinde bildirilen sonuçlara benzer biçimde sitotoksositeye ve apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır (91) (Şekil 11-13). SD hasar modeli çeşitli hücre sistemlerinde özellikle apoptotik hücre ölümüne yol açtığı bilinen bir modeldir (60). Bu nedenle bu hasar modeli özellikle anti-apoptotik maddelerin etkinliğinin araştırılması açısından önemlidir. Bu çalışmada SD'nun fare primer OL kültürlerinde zamana bağımlı olarak artan oranda sitotoksositeye yol açtığı saptanmıştır (Şekil 11-12).

NGF'nin sıçan primer kültürlerinde OL'i TNF $\alpha$ 'ya karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (285). NGF ayrıca *in vivo* EAE modelinde de tedavi edici etki göstermektedir (306). Bu çalışmada ise NGF'nin fare primer OL kültürlerinde herhangi bir koruyucu etkinliği gösterilememiştir. Bu maddenin daha yüksek dozları koruyucu etki gösteriyor olabilir. Bu olasılık test edilmelidir. Ayrıca bu maddenin hasardan bir süre önce verilmesi de *in vitro* koruyucu etki gösterebilir. Ancak hastalık durumlarına ekstrapolasyon açısından hasardan önce koruyucu maddelerin kullanımı doğru bir yaklaşım olmayabilir. Çünkü hastalık klinik tanısı konulduğunda *in vivo* OL hasarı başlamış durumdadır.

Benzer biçimde PC12 hücre hattını koruyucu etkisi daha önce gösterilmiş olan HGF (187) de bu çalışmada OL ölümünü önlemede etkisiz bulunmuştur. Sıçan OL'nin HGF reseptörü ekspresse ettiği gösterilmiştir (155). Fakat yakın bir tür olan farede HGF reseptörünün varlığı henüz araştırılmamış ve bildirilmemiştir. Ayrıca bu çalışmada her ne kadar yüksek homoloji gösterebilir de temin edilemediği için fare HGF yerine zorunlu olarak

insan HGF kullanılmıştır. Bu nedenle elde edilen sonuçların tam yorumlanabilmesi açısından farede fonksiyonel HGF reseptörünün varlığı ve fare HGF'nün koruyucu etkinliği araştırılmalıdır. Yine NGF için sözü edildiği gibi HGF'nin daha yüksek dozları ve hasar öncesi kullanımı da denenmelidir.

Bu tez çalışmasında IFN $\beta$ 'nın ve TGF $\beta$ 'nın da koruyucu etkisi saptanamamıştır. MS tedavisinde yaklaşık 10 yıldır kullanılıyor olmasına ve periferik immün sistemdeki etkileri oldukça biliniyor olmasına karşın IFN $\beta$ 'nın MSS ve MSS hücreleri üzerine olası etkileri konusunda bilinenler azdır. IFN $\beta$ 'nın erişkin insan OL kültürlerinde SD ya da TNF $\alpha$  ile oluşturulan hasara karşı koruyucu etki göstermediği bildirilmiştir (91). Bu nedenle IFN $\beta$  kullanımının MS'da ve EAE modelinde klinik bulguları düzeltici etkisi doğrudan OL üzerine etkisinden çok inflamatuvar hücreleri baskılamasına bağlı görünmektedir (82). Bu tez çalışmasının sonuçları anti-inflamatuvar etkili IFN $\beta$  ve TGF $\beta$ 'nin denenen hasar modellerinde OL ölümüne karşı koruyucu bir etkinliği olmadığını göstermektedir. Fakat IFN $\beta$ 'nın ve TGF $\beta$ 'nin OL üzerine doğrudan bir etkiden çok mikrogial ya da CD4+ T hücre aracılı dolaylı sitotoksik etkiyi önleyici etkileri bulunuyor olabilir. Bu olasılığın sınanması açısından mikrogialia-OL ya da T hücresi-OL kokültür çalışmalarının yapılması uygun olacaktır.

Bu tez çalışmasında olası koruyucu etkinliği araştırılan ajanların kombine kullanımı denenmemiştir. Tek başına koruyucu etkinliği saptanamayan bu maddeler birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gösteriyor olabilir. Ya da koruyucu etkinliği gösterilmiş olan EPO'nin bu etkisi diğer maddelerle birlikte kullanıldığında güçleniyor olabilir.

Bu çalışmanın sonuçları EPO'nin fare primer immatür OL kültürlerinde sitokinler, LPS ve SD ile indüklenen sitotoksositeye karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. EPO'nin eritroid öncüsü hücrelerde, enterositlerde ve kardiyomiyositlerde mitotik ve proliferatif etkisi daha önce gösterilmiştir (273). Çeşitli nöronal hücre tiplerinde (kemirgenlerde primer kortikal, kolinerjik, hipokampal, spinal motor nöron kültürlerinde, PC12 ve P19 hücre hatlarında) EPO'nin çok değişik hasar modellerine (SD, OGD, growth faktör deprivasyonu, glutamat toksisitesi, kainat ve AMPA toksisitesi, hipoksi) karşı koruyucu ve nörotrofik etkisi bildirilmiştir (273). Bu tez çalışması ise EPO'nin *in vitro* oligodendrogliprotektif etkinliğini gösteren ilk çalışmadır.

EPO, MS'un deneysel hayvan modeli olan EAE'de klinik olarak tedavi edici etki göstermektedir (41). Fakat söz konusu çalışmada EPO'in *in vivo* OL hasarını ve inflamasyonu önleyici etkisinin olup olmadığı araştırılmamıştır. Ancak aynı çalışmada bir başka deneysel hayvan modelinde (kafa travması modeli) EPO tedavisinin inflamasyonu azaltıcı etkisi (anti-inflamatuvar etki) histopatolojik olarak teyid edilmiştir (41). EAE modelinde EPO'in doğrudan OL canlılığını arttırıcı etkisi de olabilir ve bu etki de tedavi edici etkinliğe katkıda bulunuyor olabilir. Bu olasılığı güçlendiren bir bulgu EAE çalışmasında IFN $\beta$  ve glatiramer asetat tedavileriyle gözlenenin aksine geç dönemde klinik tabloda relaps gözlenmemesidir (41). Bugüne kadar *in vivo* ve *in vitro* değişik türlerde (insan ve kemirgen) oligodendroglial EPOR'nün varlığı bildirilmemiştir. Erişkin insan OL kültürlerinde oligodendroglial EPOR saptanamamıştır (215). Fakat mikroglia, astroglia ve nöronlar EPOR ekspresyonunu modüle etmektedir ve sitokinler nöronal ve astroglial EPOR ekspresyonunu modüle etmektedir (215). İlk kez bu tez çalışmasında yenidoğan fare immatür OL kültürlerinde ve N20.1 immatür OL hücre hattında EPOR'nün hem protein hem de mRNA düzeyinde ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca sitokinler EPOR ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde uyarmaktadır. Bu son bulgunun anlamı hedef hücrede EPOR ekspresyonunun yalnızca hipoksi durumunda artmayıp başka hasar modellerinde de uyarıldığıdır (Aslında hipoksi ile nöronal EPOR ekspresyonunun arttığı bilinmekle birlikte OL için bu durum henüz açık değildir). Bu durum *in vivo* da gerçekleşiyorsa ve aynı hasar yaratıcı maddeler EPO kaynağı hücrelerden EPO salınımını da uyarıyorsa bu durum endojen ve yalnızca hipoksiye karşı olmayan daha genel bir savunma sisteminin varlığına işaret edebilir. Kültüre insan astrositlerinden EPO salınımının sitokinlerle uyarıldığı bildirilmiştir (215). Fakat *in vivo* durum hakkında henüz bilgi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında EPO'in çeşitli *in vitro* hasar modellerinde OL'i koruyucu etkinliği sitotoksosite ve hücre canlılığı testleriyle gösterilmiştir. Bu deneylerde, LDH deneyleri dışında EPO hasarın başlangıcıyla birlikte kültürlerle uygulanmaya başlanmıştır. Hasar modelinden önce EPO ile kültürlerin pre-conditioning'i denenmemiştir (77). Bu durum EPO'in yeni gen aktivasyonu gerektirmeyen mekanizmalar ile OL koruyucu etkinliğini gösterdiğini düşündürmektedir. Fakat bu çalışmada EPO'in OL sisteminde anti-apoptotik etkisi de saptanmıştır. Anti-apoptotik etkinlik yeni gen aktivasyonunu gerektiren bir durumdur. Bu durumda akla en yakın olasılık bu hücre kültürü ve hasar modeli sisteminde apoptotik hücre hasarının toksik ajanlarla karşılaştırılmasının ardından latent bir süre geçtikten sonra

başlaması ve kültürlerde bulunan EPO'in yeni gen aktivasyonu için süre bulabilmesidir. Hücrelerin toksik ajanlara maruz kalma süresi oluşan hücre hasarının tipini (apoptotik ya da nekrotik) ve şiddetini (fonksiyonel ya da yapısal; geri dönüşlü ya da geri dönüşsüz) belirleyici etmenlerdir. Bu durum değişik canlı türlerinden OL kültürlerinde daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (27). Ayrıca farklı hücre tiplerinin bir hasar modeline yanıtları da farklı olabilir. Örneğin PC12 nöronal hücre hattı kültürlerinde SD'na bağlı hasar 48. saatte maksimuma ulaşmaktadır (161). Bizim çalışmamızda ise SD'a bağlı OL hasarı 96. saatte 72. saattekinden daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılık nöronal hücre kültürlerinde hasar ile birlikte uygulanmaya başlanan EPO koruyucu etki göstermezken (271) aynı maddenin OL kültürlerinde hasarın başlangıcından önce uygulanmadığı halde neden koruyucu etki gösterdiğini açıklayabilir.

Kültürlerde EPO'in yarılanma ömrü bu tez çalışmasında ve başka herhangi bir çalışmada araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda her ne kadar kültürde EPO düzeyleri zamansal olarak incelenmemişse de SD modelinde 72. saatteki koruyucu etkinliğin 96. saatte de sürmesi ve bu etkinliğin doza bağımlı bir biçimde düşük EPO dozunda değil de yüksek EPO dozlarında ortaya çıkması iki olasılığı akla getirmektedir. Ya EPO *in vivo* sistemlerdekinden farklı olarak bu kültür sisteminde daha uzun bir yarılanma kinetiği göstermekte ya da anti-apoptotik mekanizma için başlangıçta oluşturduğu yeni gen aktivasyonu etkisiyle etkinliğini uzun süre sürdürmektedir. Bu son durum bir spinal motor nöron kültürü çalışmasında gösterilmiştir (271). Bu çalışmada hasar modeli olarak growth faktör (BDNF) deprivasyonu ve SD birlikte kullanılmıştır. Her ne kadar koruyucu etkinlik için EPO'in hasar modelinin başlangıcından 24 saat önceden başlayarak kullanılması gerekmişse de kültür ortamından EPO, serum ve BDNF birlikte çekildiğinde 24 saat önceden uygulanmış olan EPO, SD ve BDNF deprivasyonuna bağlı hücre hasarına (apoptotik hücre ölümü) karşı üç gün süreyle koruyucu etki göstermiştir (271). OL sisteminde bu soruların kesin aydınlatılması için kültürlerde EPO düzeyinin zamansal olarak ELISA yöntemiyle ölçümü, protein sentezi ve transkripsiyon inhibitörlerinin EPO'in koruyucu etkinliği üzerine etkisinin incelenmesi ve EPO ile oluştuğunu düşündüğümüz bcl-2, bcl-XL gibi yeni gen aktivasyonlarının zamansal olarak RT-PCR yöntemiyle analizi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında EPO'in hasar başlangıcıyla birlikte uygulandığında koruyucu etkinlik göstermesi ve koruyucu etki için önceden EPO ile kültürlerin karşılaştırılmasının



(pre-conditioning) gerekmemesi *in vivo* hastalık durumlarına ekstrapolasyon açısından önemlidir. Çünkü daha önce de değinildiği gibi hastalık tanısı konulduğunda OL hasarı *in vivo* başlamış durumdadır.

EPO'in bu çalışmada kullanılan hasar modellerinde OL ölümüne karşı koruyucu etkisinin mekanizmaları çeşitli olabilir. Bu çalışmada EPO'in yalnızca anti-apoptotik etkisi araştırılmış ve bu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Literatür bilgilerine göre bu çalışma EPO'in apoptotik OL ölümünü baskıladığını gösteren ilk ve tek çalışmadır. Yeni bir çalışmada deneysel spinal travma modelinde sistemik EPO tedavisinin *in vivo* da apoptotik OL ölümünü önlediği bildirilmiştir (118).

EPO anti-apoptotik etkisinin yanısıra farklı mekanizmalar üzerine etkisiyle de koruyucu etkinlik sağlıyor olabilir. Olası mekanizmalar bu maddenin başka hücre sistemlerinde (eritroid ve astroglial) gösterilmiş olan oksidatif stresi önleyici ve anti-oksidan savunma sistemini güçlendirici etkisi (64, 114) ve anti-inflamatuvar etkisi (41) olabilir. Bir başka olasılık da EPO'in nörotrofik etkisine benzer bir oligodendrotrofik etkisinin bulunabileceğidir (273). EPO, ayrıca LPS ve IFN $\gamma$  ile indüklenen OL hasarına katıldığı gösterilmiş olan NO oluşumunu modüle edici etki de gösteriyor olabilir. Örneğin IL-10, OL hasarını önleyici etkinliğini bu yolla göstermektedir (211). EPO'in *in vivo* global iskemi modelinde iskemiye bağlı NO üretimi artışı inhibe ettiği gösterilmiştir (48). Ancak bu etkinlik *in vitro* nöronal hücre kültürü sistemlerinde ve *in vivo* deneysel Parkinsonizm modelinde gösterilememiştir (83, 113, 158). İlk çalışma EPO'in NO üretimini baskılamadığını işaret ederken son iki çalışma EPO'in *in vitro* ve *in vivo* NO üretimini arttırdığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada nöronal hücre sistemlerinde EPO'ine benzer biçimde anti-apoptotik etkinliği gösterilmiş olan HGF ve NGF'ün nöronal hasarın aksine OL hasarına karşı koruyucu etkinliklerinin saptanamamış olması birkaç olasılığı düşündürmektedir. Birincisi EPO bu maddelerden farklı olarak anti-inflamatuvar etki, NO modülasyonu gibi ek koruyucu mekanizmalar kullanıyor olabilir. İkincisi EPO bu maddelerden farklı ek hücre içi sinyalleme yollarını aktive ediyor olabilir. Nöronal hücre kültürlerinde EPO'in koruyucu etkinliği için Jak2 ve NF $\kappa$ B sinyalleme yolları arasında etkileşimin gerektiği bildirilmiştir (83). Aynı

etkileşimlerin OL sisteminde de olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Ancak benzer hasar modeli sisteminde (tek başına TNF $\alpha$ ) ve fareye yakın, fakat farklı bir türün (sıçan) OL kültürlerinde koruyucu etkinliği ve anti-apoptotik etkisi gösterilmiş olan NGF'nin (285) bizim çalışmamızda TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  kombine kullanımıyla oluşan hasarı önleyici etkisinin ortaya çıkmaması ancak iki çalışma arasındaki metodolojik farklılıklar ile açıklanabilir. Bu farklılıklar toksik ajan ve NGF için doz farkı, tür farkı ve hasar modeli farkıdır.



## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışmasında yenidoğan fare immatür OL ve N20.1 immatür OL hücre hattı kültürlerinde EPO'nun IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , LPS ve SD ile oluşturulan hücre ölümünü ve apoptozu anlamlı olarak azalttığı ve bu hücrelerin bazal EPOR, bazal ve IFN $\gamma$  ve LPS ile indüklenebilir EPOR mRNA ekspresse ettiği saptanmıştır.

Bu çalışmanın kapsamına alınmayan bazı soruların aydınlatılması için şu çalışmalarımız sürmektedir :

- Bu tez çalışmasında yalnızca yenidoğan fare OL kültürü ve yalnızca immatür OL kullanılmıştır. Yenidoğan fare saf matür OL ve OL öncüsü hücre kültürlerinde, yenidoğan sıçan OL öncüsü hücre, immatür OL ve matür OL kültürlerinde aynı hasar modellerinde EPO'nun koruyucu etkinliği,

- Yukarıda sözü edilen kültür sistemlerinde bazal ve çeşitli uyaranlarla (sitokinler, OGD, hipoksi gibi) indüklenebilir EPOR protein ve mRNA ekspresyonunun varlığı,

- Bu kültür sistemlerinde ve aynı hasar modelleriyle EPO'nun koruyucu etkisinin olası mekanizmalarının araştırılması [endojen oligodendroglial NO üretimi, anti-oksidan enzim düzeyleri, anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL) ve pro-apoptotik (DP5; hrk) protein ve gen ekspresyonu, hücre siklusu proteinlerinin ekspresyonu] çalışmalarımız sürmektedir.

- Yukarıda sözü edilen deneylerin hepsi farklı hasar modellerinde (hipoksi, OGD, travma, iskemi, AMPA ve kainat toksisitesi, metamfetamin ve A $\beta$  peptid ile oluşturulan hasar modelleri) tekrarlanmaya başlanmıştır. Özellikle A $\beta$  modeli *in vitro* sonuçların AH'da görülen beyaz cevher hasarına genelleştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bir başka hücre sisteminde (PC12 nöronal hücre hattı) EPO uygulamasının değişik A $\beta$  peptid fragmanlarıyla *in vitro* oluşturulan hücre hasarına ve apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu etkinliği gösterilmiştir (115). A $\beta$  peptidin OL hasarına yol açtığını bildiren bir çalışma bulunmaktadır (323). Fakat bu *in vitro* hasar sisteminde herhangi bir maddenin olası koruyucu etkinliği henüz test edilmemiştir.

- Ayrıca erişkin fare ve sıçan OL kültürü çalışmalarının optimizasyon çalışmaları yeni başlatılabilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında erişkin OL kültürleri kullanılamamıştır. Çünkü bu kültür protokolleri yenidoğan fare ve sıçan OL kültürlerinden farklı yöntemler (immunopanning, manyetik separasyon gibi) ve farklı donanım, aygıt ve sarf malzemeleri (ultrasantrifüj, manyetik separatör, OL gelişim evrelerine spesifik marker'lara yönelik

antikorlar) gerektirmektedir. MS ve AH gibi erişkin yaşam döneminde görülen hastalık durumlarına ekstrapolasyon açısından erişkin kemirgen beyninden elde edilen OL kültürlerinin kullanılması daha akla yakın görünmektedir.

Hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasında *in vitro* çalışmaların vazgeçilmez, fakat sınırlı bir kapasitesi olduğu göz ardı edilmemelidir. Hücre kültürü çalışmaları daha komplike *ex vivo* çalışmaların tasarlanmasına ışık tutmaktadır. Bu nedenle hücre kültür çalışmalarının sonuçları dikkatle yorumlanmalı ve *in vivo* ya da *ex vivo* çalışmalarla desteklenmeye çalışılarak *in vitro* deney sonuçlarının *in vitro* bir artefakt olmadığına emin olunmalıdır. Bu nedenle ek bazı soruların aydınlatılması açısından *in vivo* duruma daha yakın kültür sistemleri (ko-kültür ve mikst kültür) ve *in vivo* deneysel hastalık modelleri kapsamında şu çalışmaların yapılması planlanmaktadır :

- Mikroglia-OL kokültür sisteminde LPS, A $\beta$  ya da IFN $\gamma$  ile mikroglial aktivasyonunun ardından EPO'in OL hasarını önleyici etkisi hem mikroglia-OL mikst kültürlerinde hem de doğrudan hücre-hücre (mikroglia-OL) etkileşiminin olmadığı transwell kültür sistemlerinde araştırılacaktır.

- EAE ve intraparakimal LPS enjeksiyonu ile oluşturulan serebral inflamasyon modellerinde EPO'in OL hasarını ve inflamasyonu *in vivo* önleyici etkisi ve bu modellerde EPOR ekspresyonu paterni incelenecektir.

- Başka araştırma grupları tarafından yürütülen yenidoğan hipoksik-iskemik beyin hasarı ve spinal travma modellerinde EPO tedavisi gibi *in vivo* çalışmalarda EPO'in OL hasarını ve inflamasyonu *in vivo* önleyici etkisi ve bu modellerde EPOR ekspresyonu paterni incelenecektir.

- Yukarıda sözü edilen ve sürmekte olan ya da başlanması planlanan çalışmaların hepsinde EPO'in geliştirilmekte olan yeni türevlerinin (epomimetik peptidler ya da non-eritropoetik EPO türevleri) denenmesi de gündeme gelecektir. Çünkü EPO'in özellikle kronik kullanımında oluşturacağı eritropoetik etki, mikrosirkülasyonu bozabilmesi nedeniyle özellikle iskemik olaylarda istenmeyen bir yan etkidir. Gerçekten de MSS'de EPO overekspresse eden farelerde oluşturulan deneysel serebral infarktın hacmi kontrol farelerinden daha büyük bulunmuştur (315). Bu nedenle özellikle non-eritropoetik EPO türevlerinin OL ve nöron koruyucu etkilerinin araştırılması önemlidir.

Sonuç olarak bu çalışmada koruyucu etkinliği sınanan maddelerden EPO'in çeşitli *in vitro* hasar modellerinde OL hasarını ve apoptotik hücre ölümünü önlediği ve OL'de bazal ve inflamatuvar uyaranlarla indüklenebilir EPOR protein ve mRNA ekspresyonunun bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışma daha önceki çalışmalarla çeşitli *in vivo* hastalık ve *in vitro* hasar modellerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiş olan EPO'in *in vitro* oligodendrogliprotektif etkisinin bulunduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bu sonuçlar kronik anemi tedavisi endikasyonu ile zaten on yılı aşkın süredir klinik uygulaması olan EPO'in primer ya da sekonder OL ve beyaz cevher hasarı görülen stroke, travma gibi akut ve MS, AH gibi kronik nörodejeneratif hastalıkların tedavisine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.



## 9. KAYNAKÇA

1. Agresti C, D'Urso D, Levi G. Reversible inhibitory effects of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on oligodendroglial lineage cell proliferation and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci* 1996;8:1106-1116
2. Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G. Astrocyte specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol* 1997;158:438-445
3. Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, Probert L. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglialopathy. *Am J Pathol* 1998;153:801-813
4. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:383-421
5. Aksakoğlu G. Sağlıkta Araştırma Teknikleri ve Analiz Yöntemleri. D.E.Ü. Rektörlük Matbaası, İzmir, 2001
6. Alafaci C, Salpietro E, Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, Tripodo E, Calapai G, Buemi M, Tomasello F. Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* 2000;406:219-225
7. Allera C, Lazzarini G, Patrone E, Alberti L, Barboro P, Sanna P, Melchiori A, Parodi S, Balbi C. The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change. *J Biol Chem* 1997;272:10817-10822
8. Althaus HH, Hempel R, Kloppner S, Engel J, Schmidt-Schultz T, Kruska L, Heumann R. Nerve growth factor signal transduction in mature pig oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1997;50:729-742

9. Alvarez Arrayo MV, Castilla MA, Gonzalez Pacheco FR, Tan D, Riesco A, Casado S, Caramelo C. Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1998-2004
10. Ammarguella F, Gogusev J, Drueke TB. Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:687-692
11. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5978-5982
12. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3974-3978
13. Andrews T, Zhang P, Bhat NR. TNF- $\alpha$  potentiates IFN- $\gamma$  induced cell death in oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci Res* 1998;54:574-583
14. Antel JP, Williams K, Blain M, McRea E, McLaurin J. Oligodendrocyte lysis by CD4<sup>+</sup> T cells independent of tumor necrosis factor. *Ann Neurol* 1994;35:341-348
15. Arnason BG, Dayal A, Qu ZX, Jensen MA, Genc K, Reder AT. Mechanisms of action of interferon-beta in multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol* 1996;18:125-148
16. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF $\alpha$  promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 2001;4:1116-1122
17. Azzarelli B, Caldemeyer KS, Phillips JP, DeMyer WE. Hypoxic-ischemic encephalopathy in areas of primary myelination: a neuroimaging and PET study. *Pediatr Neurol* 1996;14:108-116
18. Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998;18:6241-6253
19. Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, Arvin KL, Holtzman DM. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 2002;22:455-463
20. Baerwald KD, Popko B. Developing and mature oligodendrocytes respond differently to the immune cytokine interferon-gamma. *J Neurosci Res* 1998;52:230-239

21. Bagasra O, Michaels FH, Zhng YM, Bobroski L, Spitsin SV, Fu ZF, Tawadros R, Koprowski H. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12041-12045
22. Barker PA, Shooter EM. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 1994;13:203-215
23. Barnstable CJ. Identification of cell types in neural cultures. In "Practical Cell Culture Techniques" A. A. Boulton, G. B. Baker, W. Walz (eds.), p. 21-63, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1992
24. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001;81:871-927
25. Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol* 1998;161:4437-4446
26. Behl C, Davis J, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 1994;77:817-827
27. Benn T, Halfpenny C, Scolding N. Glial cells as targets for cytotoxic immune mediators. *Glia* 2001;36:200-211
28. Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001;39:381-391
29. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:643-651
30. Bettelli E, Prabhu Das M, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10 and IL-4 deficient and transgenic mice. *J Immunol* 1998;161:3299-3306
31. Bhat NR, Zhang P, Bhat AN. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 1999;72:472-478
32. Bikfalvi A, Han ZC. Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia* 1994;8:523-529



33. Bitsch A, Kuhlmann T, da Costa C, Bunkowski S, Polak T, Brück W. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia* 2000;29:366-375
34. Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, Wainwright H, Simpson DA, McLean AJ. Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet* 1994;344:1055-1056
35. Bo LD, Dawson TM, Wesselingh S, Mirk S, Choi S, Kong PA, Hanley D, Trapp BD. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brain. *Ann Neurol* 1994;36:778-786
36. Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1997;68:2227-2240
37. Bothwell M. p75<sup>NTR</sup>: a receptor after all. *Science* 1996;272:506-507
38. Boullerne AI, Nedelkoska L, Benjamins JA. Synergism of nitric oxide and iron killing the transformed murine oligodendrocyte cell line N20.1. *J Neurochem* 1999;72:1050-1060
39. Boutros T, Croze E, Yong VW. Interferon-beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *J Neurochem* 1997;69:939-946
40. Brenner T, Brocke S, Szafer F, Sobel RA, Parkinson JF, Perez DH, Steinman L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1997;158:2940-2946
41. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526-10531
42. Brogi A, Strazza M, Melli M, Costantino-Ceccarini E. Induction of intracellular ceramide by interleukin-1 beta in oligodendrocytes. *J Cell Biochem* 1997;66:532-541
43. Brosnan C, Battistini FL, Raine CS, Dickson DW, Csasadewall A, Lee SC. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci* 1994;16:152-161
44. Brun A, Englund E. A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study. *Ann Neurol* 1986;19:253-262

45. Brück W, Schmied M, Suchanek G, Brück Y, Breitschopf H, Poser S, Piddlesden S, Lassmann H. Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;35:65-73
46. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995;376:599-602
47. Butt AM, Jenkins HG. Morphological changes in oligodendrocytes in the intact mouse optic nerve following intravitreal injection of tumour necrosis factor. *J Neuroimmunol* 1994;51:27-33
48. Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000;401:349-356
49. Cammer W, Zhang H. Maturation of oligodendrocytes is more sensitive to TNF $\alpha$  than is survival of precursors and immature oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* 1999;97:37-42
50. Cammer W. Effects of TNF $\alpha$  on immature and mature oligodendrocytes and their progenitors in vitro. *Brain Res* 2000;864:213-219
51. Cammer W. Apoptosis of oligodendrocytes in secondary cultures from neonatal rat brains. *Neurosci Lett* 2002; başkida
52. Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J* 2001;15:1804-1806
53. Cannella BC, Raine CS. The adhesion molecules and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995;37:424-435
54. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-1321
55. Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, Blanca I, Weisinger JR, Rothstein M, Bellorin-Font E. Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney Int* 1999;55:546-553
56. Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int* 1993;43:1010-1014
57. Carlini RG, Gupta A, Liapis H, Rothstein M. Endothelin-1 release by erythropoietin involves calcium signaling in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:889-892

58. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor receptor p75. *Nature* 1996;383:716-719
59. Casaccia-Bonnel P, Aibel L, Chao MV. Central glial and neuronal populations display differential sensitivity to ceramide-dependent cell death. *J Neurosci Res* 1996;43:382-389
60. Casaccia-Bonnel P. Cell death in the oligodendrocyte lineage: a molecular perspective of life/death decisions in development and disease. *Glia* 2000;29:124-135
61. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 2001;103:203-218
62. Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 1995;201:223-226
63. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari J. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995;7:61-64
64. Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, Datta AG. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* 2000;59:419-425
65. Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E1242-1248
66. Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;81:29-42
67. Cohen RI, Marmur R, Norton WT, Mehler MF, Kessler JA. Nerve growth factor and neurotrophin-3 differentially regulate the proliferation and survival of developing rat brain oligodendrocytes. *J Neurosci* 1996;16:6433-6442
68. Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Rad Biol* 1992;61:451-453
69. Corbin JG, Kelly D, Rath EM, Baewals KD, Suzuki K, Popko B. Targeted CNS expression of interferon-gamma in transgenic mice leads to hypomyelination, reactive gliosis, and abnormal cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 1996;7:354-370

70. Cossins JA, Clements JM, Ford J, Miller KM, Pigott R, Vos W, Van Der Valk P, De Groot CJA. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol* 1997;94:590-598
71. Creedon DJ, Johnson EM, Lawrence JC. Mitogen-activated protein kinase-independent pathways mediate the effects of nerve growth factor and cAMP on neuronal survival. *J Biol Chem* 1996;271:20713-20718
72. Crowder RJ, Freeman RS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998;18:2933-2943
73. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997;3:73-76
74. Cuzner ML, Loughlin AJ, Mosley K, Woodroffe MN. The role of microglia macrophages in the processes of inflammatory demyelination and remyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994;20:200-201
75. Çelik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2258-2263
76. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-241
77. Dawson TM. Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin? *Lancet* 2002;359:96-97
78. De Vellis J, Espinosa de los Monteros A. Oligodendrocytes. In "Practical Cell Culture Techniques" A. A. Boulton, G. B. Baker, W. Walz (eds.), p. 323-353, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1992
79. Defrances MC, Wolf HK, Michalopoulos GK, Zarnegar R. The presence of hepatocyte growth factor in the developing rat. *Development* 1992;116:387-395
80. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687-689
81. Dewar D, Yam P, McCulloch J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter. *Eur J Pharmacol* 1999;375:41-50

82. Dhib-Jalbut S. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 2002;58:S3-9
83. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001;412:641-647
84. Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 1997;151:1205-1213
85. Dopp JM, Mackenziograham A, Otero GC, Merrill JE. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of Type-1 and Type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* 1997;75:104-112
86. Dowling P, Husar W, Menonna J, Donnenfeld H, Cook S, Sidhu M. Cell death and birth in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 1997;149:1-11
87. Dowling P, Husar W, Menonna J, Casaccia-Bonnel P, Chao MVC, Cook S. Expression of p75 neurotrophin receptor in multiple sclerosis brain. *Neurology* 1997;18:3273-3281
88. Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1996;184:1513-1518
89. D'Souza SD, Alinauskas K, McCrea E, Goodyear C, Antel JP. Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci* 1995;15:7293-7300
90. D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Trout AB, Raine CS, Antel JP. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 1996;184:2361-2370
91. D'Souza SD, Alinauskas K, Antel JP. Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J Neurosci Res* 1996;43:289-298
92. Dugandzja-Novakovic S, Shrager P. Survival, development and electrical activity of central nervous system myelinated axons exposed to tumor necrosis factor in vitro. *J Neurosci Res* 1995;40:117-126
93. Eschbach IW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 1987;316:73-78

94. Eves EM, Xiong W, Bellacosa A, Kennedy SG, Tschlis PN, Rosner MR, Hay N. Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol Cell Biol* 1998;18:2143-2152
95. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999;49:377-391
96. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120:393-399
97. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-3822
98. Follett PL, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci* 2000;20:9235-9241
99. Foresta C, Mioni R, Bordon P, Gottardello F, Nogara A, Rossato M. Erythropoietin stimulates testosterone production in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:753-756
100. Foresta C, Mioni R, Bordon P, Miotto D, Montini G, Varotto A. Erythropoietin and testicular steroidogenesis: The role of seconder messengers. *Eur J Endocrinol* 1995;132:103-108
101. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996;383:166-168
102. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tschlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995;81:727-736
103. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997;88:435-437
104. Frankfurt OS. Detection of apoptotic leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA. *Anticancer Res* 1994;14:1861-1870
105. Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide induced DNA denaturation in situ. *J Histochem Cytochem* 2001;49:369-378
106. Frankfurt OS. Decreased stability of DNA in cells treated with alkylating agents. *Exp Cell Res* 1990;191:181-185
107. Frei E, Klusman I, Schnell L, Schwab ME. Reactions of oligodendrocytes to spinal cord injury: cell survival and myelin repair. *Exp Neurol* 2000;163:373-380

108. Frei L, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation in the central nervous system: the inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the induction signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 1994;152:2720-2726
109. Frei K, Eugster HP, Bopst M, Constantinescu CS, Lavi E, Fontana A. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and lymphotoxin  $\alpha$  are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;185:2177-2182
110. Freyer D, Weih M, Weber JR, Burger W, Scholz P, Manz R, Ziegenhorn A, Angestwurm K, Dirnagl U. Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF-alpha in astroglial-enriched cultures. *Glia* 1996;16:1-6
111. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999;5:170-175
112. Genain CP, Roberts T, Davis RL, Nguyen MH, Uccelli A, Faulds D, Li Y, Hedgpeth J, Hauser SL. Prevention of autoimmune demyelination in non-human primates by a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3601-3605
113. Genç Ş, Kuralay F, Genç K, Akhisaroğlu M, Fadiloğlu Ş, Yörükoğlu K, Fadiloğlu M, Güre A. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001;298:139-141
114. Genç Ş, Akhisaroğlu M, Kuralay F, Genç K. Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci Lett* 2002;321:73-76
115. Genç Ş, Akhisaroğlu M, Genç K. Eritropoietinin PC12 hücre hattında amiloid-beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi. *Geriatri (Turkish Journal of Geriatrics)* 2002;5/1: 1-7
116. Glabinski A, Mirecka M, Pokoca L. Tumor necrosis factor alpha but not lymphotoxin is overproduced by blood mononuclear cells in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1995;91:276-279
117. Gold R, Hartung H-P, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 2000;6:88-91

118. Gorio A, Gökmen N, Erbayraktar S, Yılmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, baskıda
119. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology* 1995;21:1465-1468
120. Grasso G, Buemi M, Alafaci C, Sfacteria A, Passalacqua M, Sturiale A, Calapai G, De Vico G, Piedimonte G, Salpietro FM, Tomasello F. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5627-5631
121. Greene LA, Kaplan DR. Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol* 1995;5:579-587
122. Grinspan JB, Stern J, Franceschini B, Yasuda T, Pleasure D. Protein growth factors as potential therapies for central nervous system demyelinating disorders. *Ann Neurol* 1994;36:S140-142
123. Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 2001;168:273-282
124. Gu C, Cassacia-Bonnefil P, Srinivasan A, Chao MV. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci* 1999;19:3043-3049
125. Haviv R, Stein R. Nerve growth factor inhibits apoptosis induced by tumor necrosis factor in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1999;55:269-277
126. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 1991;350:678-683
127. Hewett JA, Hewett SJ, Winkler S, Pfeiffer SE. Inducible nitric oxide synthase expression in culture enriched for mature oligodendrocytes is due to microglia. *J Neurosci Res* 1999;56:189-198
128. Hisahara S, Yuan J, Momoi T, Okano H, Miura M. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. *J Exp Med* 2001;193:111-122



129. Hisahara S, Shoji S, Okano H, Miura M. ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J Neurochem* 1997;69:10-20
130. Hisahara S, Araki T, Sugiyama F, Yagami K, Suzuki M, Abe K, Yamamura K, Miyazaki J, Momoi T, Saruta T, Bernard CCA, Okano H, Miura M. Targeted expression of baculovirus p35 caspase inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. *EMBO* 2000;19:341-348
131. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1989;170:607-612
132. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2892-2897
133. Horwitz MS, Evans CF, McGavern DB, Rodriguez M, Oldstone MBA. Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma. *Nat Med* 1997;3:1037-1041
134. Hua LL, Liu JS, Brosnan CF, Lee SC. Selective inhibition of human glial inducible nitric oxide synthase by interferon-beta: implications for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998;43:384-387
135. Husain J, Juurlink BH. Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. *Brain Res* 1995;698:86-94
136. Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DL, Macrae IM. Ebselen protects gray and white matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 2001;32:2149-2154
137. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Sehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-810
138. Jendroska K, Poewe W, Daniel SE, Pluess J, Iwerssen-Schmidt H, Paulsen J, Barthel S, Schelosky L, Cervos-Navarro J, DeArmond SJ. Ischemic stress induces deposition of amyloid beta immunoreactivity in human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995;90:461-466
139. Jin YX, Xu LY, Guo H, Ishikawa M, Link H, Xiao BG. TGF-beta1 inhibits protracted-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by activating dendritic cells. *J Autoimmun* 2000;14:213-220

140. Jing S, Tapley P, Barbacid M. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 1992;9:1067-1079
141. Johnstone M, Gearing AJH, Miller KM. A central role for astrocytes in the inflammatory response to  $\beta$ -amyloid: chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 1999;93:182-193
142. Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998;43:40-49
143. Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999;2:148-158
144. Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, Ledbetter DJ. Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. *Pediatr Res* 1999;46:263-268
145. Juurlink BH, Husain J. Hyperthermic injury of oligodendrocyte precursor cells: implications for dysmyelination disorders. *Brain Res* 1994;641:353-356
146. Juurlink BH, Thorburne SK, Hertz L. Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia* 1998;22:371-378
147. Juurlink BH, Hertz L. Astrocytes. In "Practical Cell Culture Techniques" A. A. Boulton, G. B. Baker, W. Walz (eds.), p. 269-323, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1992
148. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: Implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 2001;193:427-434
149. Kassiotis G, Kollias G. TNF and receptors in organ-specific autoimmune disease: multi-layered functioning mirrored in animal models. *J Clin Invest* 2001;107:1057-1058
150. Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human leukemia cells by etoposide, camptotecin, and other cytotoxic anticancer agents: a cautionary note. *Cancer Res* 1989;49:5870-5878
151. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem*. 2001;276:39469-39475

152. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokines mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 1992;149:2496-2505
153. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997;11:701-713
154. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 1999;19:5800-5810
155. Kilpatrick TJ, Ortuno D, Bucci T, Lai C, Lemke G. Rat oligodendroglia express c-met and focal adhesion kinase, protein tyrosine kinases implicated in regulating epithelial cell motility. *Neurosci Lett* 2000;279:5-8
156. Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 1994;77:325-328
157. Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res* 1993;609:29-35
158. Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem* 1999;72:2565-2572
159. Krasnoselsky A, Massay MJ, DeFrances MC, Michalopoulos G, Zarnegar R, Ratner N. Hepatocyte growth factor is mitogen for Schwann cells and is present in neurofibromas. *J Neurosci* 1994;14:7284-7290
160. Kuhlmann T, Lucchinetti C, Zettl UK, Bitsch A, Lassmann H, Brück W. Bcl-2 expressing oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Glia* 1999;28:34-49
161. Kunioku H, Inoue K, Tomida M. Interleukin-6 protects rat PC12 cells from serum deprivation or chemotherapeutic agents through the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT3 pathways. *Neurosci Lett* 2001;309:13-16
162. Kuribayashi N, Sakagami H, Iida M, Takeda M. Chromatin structure and endonuclease sensitivity in human leukemic cell lines. *Anticancer Res* 1996;16:1225-1230

163. Ladiwala U, Lachance C, Simoneau SJ, Bhakar A, Barker PA, Antel JP. p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: signaling without cell death in response to NGF. *J Neurosci* 1998;18:1297-1304
164. Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski, HM. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995;89:35-41
165. Laudiero LB, Aloe L, Levi-Montalcini R, Buttinelli C, Schilter D, Gillessen S, Otten U. Multiple sclerosis patients express increased levels of beta-nerve growth factor in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 1992;147:9-12
166. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 2001;24:39-47
167. Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Siren AL, Ehrenreich H. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* 2000;11:3485-3488
168. Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, Goeddel DV. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2830-2834
169. Li GL, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol* 1999;98:473-480
170. Li S, Mealing GA, Morley P, Stys PK. Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter. *J Neurosci* 1999;19:RC16
171. Liefeldt L, Schmidt-Ott KM, Orzechowski HD, Distler A, Paul M. Transcriptional regulation of endothelin-1 by erythropoietin in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:S464-466
172. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7580-7584
173. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157

174. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17:5395-5406
175. Liu J, Marino MW, Wong G, Grail D, Dunn A, Bettadapura J, Slavin AJ, Old L, Bernard CC. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in auto-immune-mediated demyelination. *Nat Med* 1998;4:78-83
176. Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 1993;259:689-692
177. Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* 2000;123:308-317
178. Lucchinetti CF, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions: a study of 113 cases. *Brain* 2000;122:2279-2295
179. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol* 1996;6:259-274
180. Ludwin SK. The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:111-124
181. Mackenzie-Graham AJ, Mitrovic B, Smoll A, Merrill JE. Differential sensitivity to nitric oxide in immortalized, cloned murine oligodendrocyte cell line. *Dev Neurosci* 1994;16:162-171
182. Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 1994;269:6884-6891
183. Massaro AR, Soranzo C, Carnevale A. Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients. *Eur Neurol* 1997;37:243-246
184. Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 1985;4:2757-2763
185. Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics: Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993;268:11208-11216

186. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production: Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-19493
187. Matsumoto K, Kagoshima M, Nakamura T. Hepatocyte growth factor as a potent survival factor for rat pheochromocytoma PC12 cells. *Exp Cell Res* 1995;220:71-78
188. Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, Tohyama M. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem* 1999;73:2037-2046
189. Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez-Millan L, Miledi R. Glutamate receptor-mediated toxicity in the optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8830-8835
190. Matute C. Characteristics of acute and chronic kainate excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10229-10234
191. Mayer M, Noble M. N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic-factor mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7496-7500
192. Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D. Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* 1999;19:9716-9727
193. McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 1998;4:291-297
194. McDonald J, Levine JM, Qu Y. Multiple classes of the oligodendrocyte lineage are highly vulnerable to excitotoxicity. *Neuroreport* 1998;9:2757-2762
195. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahbaubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In "Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death", LM Schwartz and BA Osborne (eds.), p. 150-181, Academic Press, San Diego, 1995
196. MCGAVERN DB, MURRAY PD, RIVERA-QUINONES C, SCHMELZER JD, LOW PA, RODRIGUEZ M. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and

- neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 2000;123:519-531
197. McLarnon JG, Michikawa M, Kim SU. Effects of tumor necrosis factor on inward potassium current and cell morphology in cultured human oligodendrocytes. *Glia* 1993;9:120-126
  198. McLaurin J, D'Souza S, Stewart J, Blain M, Nalbantoglu J, Antel JP. Effect of tumor necrosis factor alpha and beta on human oligodendrocytes and neurons in culture. *Int J Dev Neurosci* 1995;13:369-381
  199. Menard A, Amouri R, Dobransky T, Charriaut-Marlangue C, Pierig R, Cifuentes-Diaz C, Ghandour S, Belliveau J, Gascan H, Hentati F, Lyon-Caen O, Perron H, Rieger F. A gliotoxic factor and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;154:209-221
  200. Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenzie-Graham A, Dopp JC, Ding M, Griscavage J, Ignaro LJ, Lowenstein CJ. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1997;48:372-384
  201. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 1996;19:331-338
  202. Merrill JE, Ignaro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell toxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 1993;151:2132-2141
  203. Merrill JE. Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci* 1991;13:130-137
  204. Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, de Graaf KL, Kramer B, Bahr M. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 2001;21:6214-6220
  205. Miller RH, Hayes JE, Dyer KL, Sussman CR. Mechanisms of oligodendrocyte commitment in the vertebrate CNS. *Int J Dev Neurosci* 1999;8:753-763
  206. Mioni R, Gottardello F, Bordon P, Montini G, Foresta C. Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells. *Acta Endocrinol* 1992;127:459-465
  207. Mitrovic B, Ignaro LJ, Montestruque S, Smoll A, Merrill JE. Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cell in vitro. *J Neurosci* 1995;61:575-585
  208. Mitrovic B, Parkinson J, Merrill JE. An in vitro model of oligodendrocyte destruction by nitric oxide and its relevance to multiple sclerosis. *Methods* 1996;10:501-513

209. Miura M, Friedlander RM, Yuan J. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8318-8322
210. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977;252:5558-5564
211. Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Guazza C. LPS/IFN- $\gamma$  cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci* 2001;13:493-502
212. Morakkabati N, Gollnick F, Meyer R, Fandrey J, Jelkmann W. Erythropoietin induces  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol* 1996;24:392-397
213. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105-116
214. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: Regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 2000;29:1-14
215. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:386-392
216. Nagai T, Akizawa T, Nakashima Y, Kohjiro S, Nabeshima K, Kanamori N, Takayama K, Kinugasa E, Koshikawa S. Effects of rhEpo on cellular proliferation and endothelin-1 production in cultured endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:1814-1819
217. Navakas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996;45:322-333
218. Ness JK, Romanko MJ, Rothstein RP, Wood TL, Levison SW. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. *Dev Neurosci* 2001;23:203-208
219. Nicholas RS, Stevens S, Wing MG, Compston DA. Microglia-derived IGF-2 prevents TNF $\alpha$  induced death of mature oligodendrocytes in vitro. *J Neuroimmunol* 2002;124:36-44



220. Noack H, Possel H, Rethfeldt C, Keilhoff G, Wolf G. Peorxynitrite mediated damage and lowered superoxide tolerance in primary cortical glial cultures after induction of the inducible isoforms of NOS. *Glia* 1999;28:13-24
221. Noble PG, Antel JP, Yong VW. Astrocytes and catalase prevent the toxicity of catecholamines to oligodendrocytes. *Brain Res* 1994;633:83-90
222. O'Brien JT, Ames D, Schweitzer I. White matter in depression and Alzheimer's disease: a review of magnetic resonance imaging studies. *Int J Geriatr Psychiatry* 1996;11:681-694
223. Ohneda O, Yanai N, Obinata M. Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis. *Exp Cell Res* 1993;208:327-331
224. Okada A, Kinoshita Y, Maekawa T, Hassan MS, Kawanami C, Asahara M, Matsushima Y, Kishi K, Nakata H, Naribayashi Y, Chiba T. Erythropoietin stimulates proliferation of rat-cultured gastric mucosal cells. *Digestion* 1996;57:328-332
225. O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN. Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10. *Eur J Immunol* 1999;29:1275-1285
226. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1997;73:107-116
227. Oleszak EL, Katsetos CD, Kuzmak J, Varadhachary A. Inducible nitric oxide synthase in Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J Virol* 1997;71:3228-3235
228. Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, Brück W, Budka H, Jellinger K, Lassmann H. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 1994;117:1311-1322
229. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999;401:82-85
230. Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbation associated with activation of the immune system. *Neurology* 1987;37:1097-1102
231. Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke* 1996;27:1641-1647

232. Pastorino JG, Tafani M, Farber JL. Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999;274:19411-19416
233. Pender MP, Nguyen KB, McCombe PA, Kerr JF. Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 1991;104:81-87
234. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate toxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2000;6:67-70
235. Plioplys AV, Massimini N. Alpha/beta interferon is a neuronal growth factor. *Neuroimmunomodulation* 1995;2:31-35
236. Popko B, Corbin JG, Baerwald KD, Dupree J, Garcia AM. The effects of interferon- $\gamma$  on the central nervous system. *Mol Neurobiol* 1997;14:19-35
237. Popko B, Baerwald KD. Oligodendroglial response to the immune cytokine interferon gamma. *Neurochem Res* 1999;24:331-338
238. Pouly S, Becher B, Blain M, Antel JP. Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:280-286
239. Pousset F, Cremona S, Dantzer R, Kelley K, Parnet P. Interleukin-4 and interleukin-10 regulate IL-1-beta induced mouse primary astrocyte activation: a comparative study. *Glia* 1999;26:12-21
240. Powell M, Mitchell D, Lederman J, Buckmeier J, Zamvil S, Graham M, Ruddle N, Steinman L. Lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha production by myelin basic protein-specific T cell clones correlates with encephalitogenicity. *Int Immunol* 1990;2:539-544
241. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11294-11298
242. Probert L, Akassoglou K. Glial expression of tumor necrosis factor in transgenic animals: How do these models reflect the "normal situation"? *Glia* 2001;36:212-219
243. Pulliam L, Zhou M, Stubblebine M, Bitler CM. Differential modulation of cell death proteins in human brain cells by tumor necrosis factor alpha and platelet activating factor. *J Neurosci Res* 1998;54:530-538

244. Qi Y, Dal Canto MC. Effect of Theiler's murine encephalomyelitis virus and cytokines on cultured oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res* 1996;45:364-374
245. Raff M, Barres B, Burne J, Coles H, Ishizaki Y, Jacobson M. Programmed cell death and the control of cell survival. Lessons from the nervous system. *Science* 1993;262:695-700
246. Raine CS, Scheinberg LC, Waltz JM. Multiple sclerosis: oligodendrocyte survival and proliferation in an active, established lesion. *Lab Invest* 1981;45:534-546
247. Raine CS. The Norton Lecture: A review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 1997;77:135-152
248. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;93:2627-2636
249. Richter-Landsberg C, Vollgraf U. Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* 1998;244:218-229
250. Riminton DS, Korner H, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD, Sedgwick JD. Challenging cytokine redundancy: inflammatory cell movement and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin -deficient, but not tumor necrosis factor-deficient mice. *J Exp Med* 1998;187:1517-1528
251. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Graham DI. beta A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma. *Lancet* 1991;338:1422-1423
252. Ruddle N, Bergman C, McGrath K, Lingenheld E, Grunnet M, Padula S, Clark R. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1990;172:1193-1200
253. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:26-32
254. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4635-4640
255. Salat DH, Kaye JA, Janowsky JS. Prefrontal gray and white matter volumes in healthy aging and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1999; 56:338-344

256. Sawada M, Suzumura A, Hosoya H, Marunouchi T, Nagatsu T. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J Neurochem* 1999;72:1466-1471
257. Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989;74:103-109
258. Scheltens P, Barkhof F, Valk J, Algra PR, van der Hoop RG, Nauta J, Wolters EC. White matter lesions on magnetic resonance imaging in clinically diagnosed Alzheimer's disease. Evidence for heterogeneity. *Brain* 1992;115:735-748
259. Scolding N, Franklin R, Stevens S, Heldin CH, Compston A, Newcombe J. Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:2221-2228
260. Scurlock B, Dawson G. Differential responses of oligodendrocytes to tumor necrosis factor and other pro-apoptotic agents: role of ceramide in apoptosis. *J Neurosci Res* 1999;55:504-513
261. Selmaj K, Raine C. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 1988;23:339-346
262. Selmaj K, Raine C, Cross A. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol* 1991;30:694-700
263. Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 1991;147:1522-1529
264. Selmaj K, Raine C, Canella B, Brosnan C. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 1991;87:949-954
265. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999;399:A23-31
266. Shibata M, Hisahara S, Hara H, Yamawaki T, Fukuuchi Y, Yuan J, Okano H, Miura M. Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000;106:643-653
267. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001;21:9733-9743

268. Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 1997;50:798-808
269. Simmons RD, Willenborg DO. Direct injection of cytokines into the spinal cord causes autoimmune encephalomyelitis-like inflammation. *J Neurol Sci* 1990;100:37-42
270. Sinor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett*. 2000;290:213-215
271. Siren A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and in metabolically stressed neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4044-4049
272. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;101:271-276
273. Siren A-L, Ehrenreich H. Erythropoietin - a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001;251:179-184
274. Skoff RP, Bessert DA, Barks JD, Song D, Cerghet M, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Dev Neurosci* 2001;19:197-208
275. Smith DH, Nakamura M, McIntosh TK, Wang J, Rodriguez A, Chen XH, Raghupathi R, Saatman KE, Clemens J, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ. Brain trauma induces massive hippocampal neuron death linked to a surge in beta-amyloid levels in mice overexpressing mutant amyloid precursor protein. *Am J Pathol* 1998;153:1005-1010
276. Solliven B, Szuchet S, Nelson DJ. Tumor necrosis factor inhibits K<sup>+</sup> current expression in cultured oligodendrocytes. *J Memb Biol* 1991;124:127-137
277. Springborg JB, Ma X, Rochat P, Knudsen GM, Amtorp O, Paulson OB, Juhler M, Olsen NV. A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid haemorrhage in rats. *Br J Pharmacol* 2002;135:823-829
278. Stadelmann C, Bruck W, Bancher C, Jellinger K, Lassmann H. Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:456-464
279. Steinman L. Multiple approaches to multiple sclerosis. *Nat Med* 2000;6:15-16

280. Stohlman SA, Pei L, Cua DJ, Li Z, Hilton DR. Activation of regulatory cells suppresses experimental allergic encephalomyelitis via secretion of IL-10. *J Immunol* 1999;163:6338-6344
281. Stout JC, Jernigan TL, Archibald SL, Salmon DP. Association of dementia severity with cortical gray matter and abnormal white matter volumes in dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol* 1996;53:742-749
282. Stys PK. Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: from mechanistic concepts to therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:2-25
283. Sun W, Funakoshi H, Nakamura T. Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-met in the rat developing cerebral cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; baskıda
284. Tabira T, Konishi Y, Gallyas F. Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons in vitro. *Int J Dev Neurosci* 1995;13:241-252
285. Takano R, Hisahara S, Namikawa K, Kiyama H, Okano H, Miura M. Nerve growth factor protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced injury through Akt-mediated signaling mechanisms. *J Biol Chem* 2000;275:16360-16365
286. Tanaka F, Kachi T, Yamada T, Sobue G. Auditory and visual event-related potentials and flash visual evoked potentials in Alzheimer's disease: correlations with Mini-Mental state Examination and Raven's Coloured Progressive Matrices. *J Neurol Sci* 1998;156:83-88
287. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998;56:341-358
288. Taupin V, Renno T, Bourbonniere L, Peterson AC, Rodriguez M, Owens T. Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage / microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor- $\alpha$  in the central nervous system. *Eur J Immunol* 1997;27:905-913
289. Tchelingirian J-L, Monge M, Le Saux F, Zalc B, Jacque C. Differential oligodendroglial expression of the tumor necrosis factor receptors in vivo and in vitro. *J Neurochem* 1995;65:2377-2380
290. Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 1995;270:3255-3260

291. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. TNF neutralization in MS: results of randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 1999;53:457-465
292. Thomas T, Thomas G, Mclendon C, Sutton T, Mullan M. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996;380:168-171
293. Thorburne SK, Juurlink BH. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *J Neurochem* 1996;67:1014-1022
294. Torres C, Aranguiz I, Rubio N. Expression of interferon- $\gamma$  receptors on murine oligodendrocytes and its regulation by cytokines and mitogens. *Immunology* 1995;86:250-255
295. Tourbah A, Linnington C, Bachelin C, Avellana-Adalid V, Wekerle H, Baron-Van Evercooren A. Inflammation promotes survival and migration of the CG4 oligodendrocyte progenitors transplanted in the spinal cord of both inflammatory and demyelinated EAE rats. *J Neurosci Res* 1997;50:853-861
296. Tran EH, Hardin-Pouzet H, Verge G, Owens T. Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1997;74:121-129
297. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Eng J Med* 1998;338:278-285
298. Uberti D, Yavin E, Gil S, Ayasola KR, Goldfinger N, Rotter V. Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;65:167-175
299. Vaillant AR, Mazzoni I, Tudan C, Boudreau M, Kaplan DR, Miller FD. Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol* 1999;146:955-966
300. Van Dam AM, Bauer J, Man A, King WHK, Marquette C, Tilders FJH, Berkenbosh F. Appearance of inducible nitric oxide synthase in the rat central nervous system after rabies virus infection and during experimental allergic encephalomyelitis but not after peripheral administration of endotoxin. *J Neurosci Res* 1995;40:251-260
301. Van Noort JM, Van Sechel AC, Bajramovic J, El Ouagmiri M, Polman CH, Lassmann H, Ravid R. A novel candidate autoantigen in multiple sclerosis: alpha B-crystallin, a small heat shock protein. *Nature* 1995;375:798-801

302. Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K. Interferon- $\gamma$ -induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1995;1:732-743
303. Vemuri GS, McMorris FA. Oligodendrocytes and their precursors require phosphatidylinositol 3-kinase signaling for survival. *Development* 1996;122:2529-2537
304. Verdi JM, Birren SJ, Ibanez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV, Anderson DJ. p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 1994;12:733-745
305. Verity AN, Bredesen D, Vonderscher C, Handley VW, Campagnoni AT. Expression of myelin protein genes and other myelin components in an oligodendrocytic cell line conditionally immortalized with a temperature-sensitive retrovirus. *J Neurochem* 1993;60:577-587
306. Villoslada P, Hauser SL, Bartke I, Unger J, Heald N, Rosenberg D, Cheung SW, Mobley WC, Fisher S, Genain CP. Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *J Exp Med* 2000;191:1799-1806
307. Virdee K, Tolkovsky AM. Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor-induced survival of sympathetic neurones. *J Neurochem* 1996;67:1801-1805
308. Vogel V, Kramer HJ, Backer A, Meyer-Lehnert H, Jelkmann W, Fandrey J. Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. *Am J Hypertens* 1997;10:289-296
309. Vrdoljak E, Bill CA, Stephens LC, van der Kogel AJ, Ang KK, Tofilon PJ. Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in vitro. *Int J Radiat Biol* 1992;62:475-480
310. Wald MR, Borda ES, Sterin-Borda L. Mitogenic effects of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes: Signal transduction pathways. *J Cell Physiol* 1996;167:461-468
311. Wekerle H. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:779-784
312. Wekerle H. The viral triggering of autoimmune disease. *Nat Med* 1998;4:770-771
313. Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX, Nakata K, Ma YJ, Hata R, Sakanaka M. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* 2002;67:795-803



314. Westland KW, Pollard JD, Sander S, Bonner JG, Linington C, McLeod JG. Activated non-neural specific T cells open the blood-brain barrier to circulating antibodies. *Brain* 1999;122:1283-1291
315. Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:857-864
316. Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN- $\gamma$  plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1996;157:3223-3227
317. Wilt SG, Milward E, Zhou JM, Nagasato K, Patton H, Rusten R, Griffin DE, O'Conner M, Dubois-Dalq M. In vitro evidence for a dual role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human deficiency virus type I encephalopathy. *Ann Neurol* 1995;37:381-394
318. Wisniewski HM, Bancher C, Barcikowska M, Wen GY, Currie J. Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 1989;78:337-347
319. Wolswijk G. Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain* 2000;123:105-115
320. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999;126:3597-3605
321. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-1331
322. Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Link H. Suppression of acute and protracted-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by nasal administration of low-dose IL-10 in rats. *J Neuroimmunol* 1998;84:230-237
323. Xu J, Chen S, Ahmed H, Chen H, Ku G, Goldberg MP, Hsu CY. Amyloid- $\beta$  peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *J Neurosci* 2001;21:RC118(1-5)
324. Yam PS, Patterson J, Graham DL, Takasago T, Dewar D, McCulloch I. Topographical and quantitative assessment of white matter injury following a focal ischaemic lesion in the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc* 1998;2:315-322
325. Yamada T, Tsuboi Y, Takahashi M. Interrelationship between beta-amyloid deposition and complement-activated oligodendroglia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1997;8:267-272

326. Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* 1996;239:494-500
327. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 1989;245:417-420
328. Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995;267:2003-2006
329. Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor I protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced injury. *Endocrinology* 1999;140:3063-3072
330. Ying HS, Gottron FJ, Choi DW. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* 2000;7.18.1-7.18.17
331. Yokota M, Saido TC, Tani E, Yamaura I, Minami N. Cytotoxic fragment of amyloid precursor protein accumulates in hippocampus after global forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:1219-1223
332. Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, Citron BA, Watanabe I, Berman NE, Festoff BW. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma* 1998;15:459-472
333. Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trend Neurosci* 1998;21:75-80
334. Yoon SO, Casaccia-Bonnett P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 1998;18:3273-3281
335. Yoshioka A, Bacskai B, Pleasure D. Pathophysiology of oligodendroglial excitotoxicity. *J Neurosci Res* 1996;46:427-437
336. Yoshioka A, Shimizu Y, Hirose G, Kitasato H, Pleasure D. Cyclic AMP-elevating agents prevent oligodendroglial excitotoxicity. *J Neurochem* 1998;70:2416-2423
337. Yu C, Takeda M, Solliven B. Regulation of cell cycle proteins by TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in cells of oligodendroglial lineage. *J Neuroimmunol* 2000;108:2-10
338. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin

- receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002;129:505-516
339. Zajicek JP, Wing M, Scolding NJ, Compston DAS. Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. *Brain* 1992;115:1611-1631
340. Zamzani N, Kroemer J. Condensed matter in cell death. *Nature* 1999;401:127-128
341. Zhao W, Tilton RG, Corbett JA, McDaniel M, Misko TP, Williamson JR, Cross AH, Hickey WF. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol* 1996;64:123-133
342. Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J. Transforming growth factor-beta. 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* 2002;22:3898-3909
343. Zielasek J, Jung S, Gold R, Liew FY, Toyka KV, Hartung HP. Administration of nitric oxide synthase inhibitors in experimental autoimmune neuritis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995;58:81-88
344. Zundel W, Giaccia A. Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev* 1998;12:1941-1946
345. Zunino SJ, Singh MK, Bass J, Picker LJ. Immunodetection of histone epitopes correlates with early stages of apoptosis in activated human peripheral T lymphocytes. *Am J Pathol* 1996;149:653-663