

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ (VETERİNER)
ANABİLİM DALI

**FARELERDE KUPRİZON İLE OLUŞTURULAN
DEMİYELİNİZASYONDA PATOLOJİK VE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

Mehmet Önder KARAYİĞİT

**Samsun
Aralık-2012**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ (VETERİNER)
ANABİLİM DALI

**FARELERDE KUPRİZON İLE OLUŞTURULAN
DEMİYELİNİZASYONDA PATOLOJİK VE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

Mehmet Önder KARAYİĞİT

Danışman: Prof.Dr.Murat YARIM

**Samsun
Aralık-2012**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mehmet Önder KARAYİĞİT tarafından Prof.Dr. Murat YARIM' ın danışmanlığında hazırlanan “Farelerde Kuprizon ile Oluşturulan Demiyelinizasyonda Patolojik ve İmmunohistokimyasal Çalışmalar” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından ../12/2012 tarihinde yapılan sınav ile Patoloji (Veteriner) Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Rıfkı HAZIROĞLU

Ankara Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. M.Yavuz GÜLBAHAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Tolga GÜVENÇ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Murat YARIM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

...../...../.....

Prof.Dr. Süleyman KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile beni yetiştiren ve her zaman bana destek olan danışman hocam sayın Prof.Dr. Murat YARIM'a, bilgi ve becerilerini bana aktaran hocalarım sayın Prof.Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR, sayın Prof.Dr. Tolga GÜVENÇ ve sayın Doç.Dr. Mahmut SÖZMEN'e, yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Araş.Gör.Dr. Yonca B. KABAK ve Araş.Gör. Ayhan GACAR'a,

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY ve OMÜ Veteriner Fakültesi Biyometri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Yrd.Doç.Dr. Serhat ARSLAN'a,

Tez projemin (PYO.VET.1904.09.001) gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

FARELERDE KUPRİZON İLE OLUŞTURULAN DEMİYELİNİZASYONDA PATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Amaç: Demiyelinizasyon sınırları kaplayan miyelin kılıfın yıkımını ya da kaybını ifade eder. Demiyelinizasyonun mekanizması hala bilinmeyenlerle doludur ve araştırma konusudur. Östrojen ve progesteron gibi beyinde de sentezlenebilen nörosteroidlerin merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi üzerindeki koruyucu etkileri gün geçtikçe netlik kazanmaya başlamaktadır. Çalışmada bu iki nörosteroidin kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyon ve sonrasında kendiliğinden oluşan remiyelinizasyondaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal Metod: Çalışmada, ortalama 25±5g ağırlığında, 3 aylık, erkek C57BL/6 ırkı 36 adet fare kullanıldı. 12 hayvan 8 hafta boyunca kuprizonlu yem ile (Grup I), 12 hayvan 8 hafta boyunca kuprizonlu yem ve hemen takibinde 4 hafta boyunca normal yem ile (Grup II), 12 hayvan ise kontrol olarak 12 hafta boyunca sadece normal yem ile (Grup III) beslendi. Farelerin % 4'lük paraformaldehit ile perfüzyonu sonrası nekropsileri yapıldı.

Bulgular: Kuprizon ile MSS'nin korpus kallozum (KK), kornu ammonis (KA) ve serebellar superior pedünkül (SSP) bölgelerinde demiyelinizasyon oluştuğundan sonra bu bölgelerde oluşan lezyona yanıt olarak sırası ile östrojen ve progesteron'un sentezini katalize eden P450 aromataz (P450arom) ve 3Beta hidroksi steroid dehidrojenaz (3βHSD) gibi steroidojenik enzimlerin glia hücrelerinden salınımlarının arttığı, remiyelinizasyon döneminin sonunda ise kontrollere yakın seviyeye gerilediği tespit edildi.

Sonuç: P450arom ve 3βHSD salınımlarının artması steroid hormon sentezini arttırdığı ve bu hormonların onarıcı etkisi ile demiyelinizasyonun gerileyip remiyelinizasyonun şekillenmeye başlamış olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: 3Beta hidroksi steroid dehidrojenaz, demiyelinizasyon, kuprizon, P450 aromataz, remiyelinizasyon.

Mehmet Önder KARAYİĞİT, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Aralık - 2012

ABSTRACT
IMMUNOHISTOCHEMICAL AND PATHOLOGICAL STUDIES IN
CUPRIZONE-INDUCED DEMYELINATION IN MICE

Aim: Demyelination describes destruction of myelin sheaths covering nerves. Although, it is known that demyelination mechanism of which is still not yet fully understood and it is subjected to various researches. The protective effects of neurosteroids including estrogen and progesterone synthesized in the brain over the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system are becoming more evident. Study aims to roles of this two steroids in the demyelination and spontaneous remyelination associated with the cuprizone toxication.

Material and Method: In the study, 12 weeks old, 36 male C57BL/6 mice (n=24 for the experimental group and n=12 for the control group) with an average weight of 25 ± 5 g were used. 12 mice were fed for 8 weeks with cuprizoneated rodent chow (Group I), 12 mice were fed with cuprizone eaten rodent chow for 8 weeks and animals continued to fed with normal rodent chow for further 4 weeks (Group II). 12 mice in the control group were fed with normal rodent chow for 12 weeks (Group III). At the end of experiment animals were sacrificed with 4 % paraformaldehyde perfusion and necropsied.

Results: The present study revealed that the expression levels of steroidogenic enzymes such as P450 aromatase (P450arom) and 3Beta hydroxy steroid dehydrogenase (3 β HSD) that catalysed synthesis of estrogen and progesterone increased in the glial cells following demyelination occurred in the the corpus callosum (CC), cornu ammonis (CA), and in the cerebellar superior peduncule (CSP) of the CNS as a result of cuprizone administration. It decreased to near control levels were determined at the end of the period of remyelination.

Conclusion: Increased expression levels of steroidogenic enzymes such as P450arom and 3 β HSD could increase estrogen and progesterone and this contribute significantly through regression of the demyelination and progression of the remyelination.

Key Words: 3Beta hydroxy steroid dehydrogenase, cuprizone, demyelination, P450 aromatase, remyelination.

Mehmet Onder KARAYIGIT, PhD Thesis
University of Ondokuz Mayıs Samsun, December– 2012

SİMGE VE KISALTMALAR

3 β HSD	3 Beta Hidroksi Steroid Dehidrojenaz
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
AR	Androjen Reseptörü
BSA	Sığır Serum Albumin
CC 1	Olgun Oligodendrosit Belirteci
cm	Santimetre
CNPase	2', 3' - Siklik-Nükleotide 3' – Fosfodiesteraz
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahidroklorid
Dk	Dakika
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HADYEK	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HCL	Hidrojen Klorür
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1	İnterlökin 1
KA	Kornu Ammonis
KGH	Köpek Gençlik Hastalığı
KGHV	Köpek Gençlik Hastalığı Virus
KK	Korpus Kallozum
LFB	Luxol Fast Blue
MAG	Miyelin İlişkili Glikoprotein
MBP	Miyelin Temel Protein
ml	Mililitre
MOG	Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein
MS	Multiple Sklerozis
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NG2	Nöral / Glia Antijen 2
OMÜ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi
OPC	Oligodendrosit Öncül Hücre

ÖR	Östrojen Reseptörü
P450arom	P450 Aromataz
PBR	Periferel Benzodiazepin Reseptör
PBS	Fosfatlı Tampon Solüsyonu
PDGF- α	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Alfa
PLP	Proteolipid Protein
PR	Progesteron Reseptörü
SABK	Strepto Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks
SLM	Stratum Lakunozum Moleküllere
SSP	Serebellar Süperior Pedinkül
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
SİMGE VE KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Miyelinin Yapısı.....	3
2.1.1. Miyelin Proteinleri.....	3
2.2. Miyelinin Yapısında Bulunan Diğer Proteinler.....	5
2.3. Kuprizon.....	5
2.3.1. Kuprizon ile Oluşturulan Demiyelinizasyonun Mekanizması.....	7
2.4. Demiyelinizasyon Meydana Getiren Nedenler.....	8
2.4.1. Multiple Skleroz.....	8
2.4.2. Köpek Gençlik Hastalığı.....	10
2.5. Demiyelinizasyonda Rol Oynayan Glial Hücreler.....	12
2.5.1. Oligodendrositler.....	12
2.5.2. Mikroglialar.....	15
2.5.3. Astrositler.....	17
2.6. Nörosteroidler.....	19
2.6.1. Nörosteroidlerin Sinir Sistemi ve Davranış Üzerine Etkileri.....	20
2.6.2. Beyin Hasarı ve Miyelinizasyonda Rol Alan Nörosteroidler ve Steroidojenik Enzimler.....	21
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1. Deney Hayvanları.....	27
3.2. Kuprizonlu Yemin Hazırlanması.....	27
3.3. Deneme Grupları ve Toksikasyonun Oluşturulması.....	27
3.4. Perfüzyon Tekniğinin Uygulanması.....	28
3.5. Histopatolojik İnceleme İçin Doku Kesitlerinin Hazırlanması.....	28
3.6. Luxol Fast Blue-Cresyl Violet Boyama Tekniği.....	31
3.7. İmunohistokimyasal Boyama Tekniği.....	31

3.8. Triton x100 Solüsyonunun Hazırlanması.....	32
3.9. Demiyelinizasyonun Değerlendirilmesi.....	34
3.10. Hücre Sayım Metodu.....	34
3.11. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Klinik Bulgular.....	35
4.2. Makroskopik Bulgular.....	35
4.3. Histokimyasal Bulgular.....	35
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	38
4.4.1. Miyelin Temel Protein.....	38
4.4.2. Glial Fibriler Asidik Protein.....	40
4.4.3. NG2 Kondriotin Sülfat.....	45
4.4.4. Aromataz P450.....	48
4.4.5. 3Beta-Hidroksi Steroid Dehidrojenaz.....	51
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	83

1. GİRİŞ

Miyelin, merkezi sinir sisteminde (MSS) oligodendrosit plazma membranlarının özelleşmiş uzantıları tarafından oluşturulan bir yapıdır. Demiyelinizasyon miyelin kılıfın yıkımını ya da kaybını ifade eder. Demiyelinizasyon ya direk miyelin kılıfın dejenerasyonu şeklinde ya da akson dejenerasyonu sonrasında meydana gelebilir. Anoksik, iskemik, enfeksiyöz ve toksik nedenlerle demiyelinizasyon şekillenebilir. Miyelin kılıfın kaybı ya da harabiyeti sonucu sinirler görevlerini tam yapamazlar ve etkilenen yere bağlı olarak klinik belirtiler ortaya çıkar. İnsanlarda çok yaygın ve önemli hastalıklardan biri olan multiple sklerozis (MS) ve köpeklerde görülen köpek gençlik hastalığı (KGH) demiyelinizasyon ile seyreden hastalıklardandır. Gerek MS'de gerekse KGH'da yaygın demiyelinizasyonun şekillendiği bilinmesine rağmen, demiyelinizasyonun mekanizması hala bilinmeyenlerle doludur ve araştırma konusudur. Son yıllarda, beyinin kendi ürettiği ve 'nörosteroidler' olarak adlandırılan hormonların bu hastalıklar üzerinde olumlu etkiler yaratabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Peter ve ark., 2009; Taylor ve ark., 2010; Yarım ve ark., 2002; 2007; 2010).

Kuprizonun miyelin hasarı oluşturduğu bilinmektedir (Matsushima ve Morell, 2001). Fareler kuprizon ile demiyelinizasyon çalışmaları için en uygun hayvanlardır (Carlton, 1969). Kuprizon, genç erkek farelere yedirildiğinde demiyelinizasyon şekillendiği görülmüştür (Morell ve ark., 1998). Merkezi sinir sistemin'de lezyonların şekillendiği alanlarda hücresel, moleküler, biyokimyasal ve morfolojik parametrelerde değişiklikler tespit edilmiştir (Morell ve ark., 1998; Matsushima ve Morell, 2001). Ayrıca, kuprizonun farelerin diyetinden çıkarılması sonrasında yavaş yavaş remiyelinizasyonun şekillendiği de tespit edilmiştir (Matsushima ve Morell, 2001). Kuprizon toksikasyonunda gözlenen demiyelinizasyonun sadece oligodendrositlerin etkilenmesi sonucu mu şekillendiği, yoksa diğer MSS hücrelerinin de rolünün olup olmadığı tartışma konusudur.

Yapılan bu tez ile kuprizon toksikasyonu sonucunda oluşturulan demiyelinizasyon ve yemden kuprizonun çıkarıldığı dönemde şekillenen remiyelinizasyon sürecinde östrojen ve progesteron gibi nörosteroid hormonların sentezini katalize eden P450 aromataz (P450arom) ve 3Beta hidroksi steroid

dehidrojenaz (3 β HSD) gibi enzimlerin salınımlarına bakılacaktır. Bununla birlikte bu iki steroidojenik enzimlerin sentezini katalize ettiği östrojen ve progesteronun hormonlarının demiyelinizasyon ve remiyelinizasyondaki rolleri hakkında bilgi sahibi olmak amaçlanmıştır.

Bu tezde C57BL/6 ırkı farelerde kuprizon toksikasyonu ile korpus kallozum (KK), kornu ammonis (KA) ve serebellar süperior pedünkül (SSP) bölgelerinde demiyelinizasyon oluşturuldu, oluşan demiyelinizasyonun derecesi belirlendi ve bu olaylar sırasında MSS'de meydana gelen histokimyasal değişiklikler değerlendirildi. İmmunohistokimyasal olarak da, demiyelinizasyon ve sonrasında şekillenen remiyelinizasyon ile ilişkisi olduğu düşünülen P450arom ve 3 β HSD'nin hücresel bazda salınımlarına bakılarak bu steroidojenik enzimlerin ve glial hücrelerin artışının veya azalışının demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon olayları ile ilişkisi incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Miyelinin Yapısı

Merkezi sinir sistemi miyelini, oligodendrosit plazma membranlarının özelleşmiş uzantıları tarafından oluşturulan bir yapıdır. Miyelinin yapısının % 70'ini lipid, % 30'unu protein oluşturmaktadır. Miyelin kılıfını oluşturan lipidlerin bileşiminde fosfolipidler % 46, galaktolipid % 29 ve kolesterol % 25 oranında bulunmaktadır (Benjamins, 2003).

Proteolipid protein (PLP) ekstraselüler alanda hücre membranının dış yüzeyindedir. Miyelin kılıfı, akson parçası etrafında spiral şeklinde sarılmış olan uzun ve modifiye bir plazma membranıdır. Bazı çalışmalarda gelişmekte olan aksonla miyelin arasında bir sinerjinin olduğu ve miyelin yokluğunda akson yapısının düzgün gelişmediği iddia edilmektedir (Brady ve ark., 1999). Merkezi sinir sistemin'de aksonun bulunmadığı *in vitro* koşullarda oligodendrositlerde miyelin gen salınımı artabilmekte, ancak gen salınımının yüksek seviyelere ulaşabilmesi ve yaygın çok katlı miyelin yapısının oluşabilmesi için aksonal etkileşim gerekmektedir (Benjamins, 2003). Son yapılan çalışmalar miyelinin yapımından sorumlu hücreler olan oligodendrositlerin astrositler, nöronlar ve onların aksonları ile sıkı bir ilişki içinde olduğunu göstermiştir. Örneğin, nöronlar oligodendrositlerin proliferasyonu ve fonksiyonlarının devamlılığı üzerinde etkilidirler. Oligodendrositler de nöronları etkileyebilirler. Tüm bu hücreler birbirleri ile yakın ilişkide olan bir ağ oluşturmaktadırlar (Edgar ve Garbern, 2004).

2.1.1. Miyelin Proteinleri

Proteolipid Protein

Miyelinin iki önemli yapısal proteini PLP ve miyelin temel proteindir (MBP). PLP miyelin protein ağırlığının yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. PLP dört sarmal içermektedir. Bunlar lipid membranı geçip ekstraselüler alana uzanarak burada bir sonraki spiral lobun miyelin membranındaki PLP ile homofilik ilişki kurmaktadır (Weimbs ve Stoffel, 1992). Yayınlanan bazı çalışmalar, PLP'nin aksonal metabolizmanın devamında metabolik rol oynadığını göstermektedir (Knapp, 1996).

Miyelin Temel Protein

Miyelin temel proteinler aynı moleküler yapıya sahip farklı dizilimler gösteren izoformlardan oluşur. MBP, miyelin protein ağırlığının % 30–40'ını oluşturduğu (Barkovich, 2000) ve PLP protein ile etkileşim içinde olduğu bilinmektedir (Wood ve ark., 1984; Edwards ve ark., 1989). Miyelin temel protein, MSS'deki sinirlerin miyelinizasyonunda çok önemli olduğu düşünülen bir proteindir. Miyelin temel protein eksik olan knock out farelerde MSS'nin miyelinizasyonunda yetersizlikler görülmüş, tremor ve nöbetlerle seyreden bozukluklar meydana gelmiş ve erken ölümler gözlenmiştir.

Miyelin temel protein özellikle de MS gibi demiyelinizasyonla seyreden hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışma MS'nin patogeneziinde MBP'nin rolünün olduğunu ortaya koymuştur (Berger ve ark., 2003). Dışarıdan verilen MBP kan beyin bariyerinin permeabilitesini arttırmaktadır. Miyelin temel protein, farelerde deneysel olarak oluşturulan kuduzun tedavisinde kullanılmış ve kan beyin bariyerinin permeabilitesini arttırarak kuduz virusunun replike olduğu bölgede immun hücrelerin beyne geçişini kolaylaştırdığı saptanmıştır. Miyelin temel protein verilen gruplardaki ölüm oranı kontrol grubuna göre % 20 - 30 daha düşük bulunmuştur (Roy ve Hooper, 2007).

2', 3' - Siklik-Nükleotide 3' - Fosfodiesteraz

Miyelin biyogeneziinde 2', 3' - siklik-nükleotide 3' - fosfodiesteraz (CNPaz), MSS'de ilk önce sentezlenen ve toplam miyelin proteininin % 4'ünü meydana getiren miyelin ile ilişkili bir enzimdir. 2', 3' - siklik-nükleotide 3' - fosfodiesteraz CNP geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Yaşla birlikte önemli değişikliklere uğradığı düşünülmektedir (Hinman ve ark., 2007). Bu isim, 2', 3' - siklik nükleotidlerin fosfodiester hidrolizlerini 2' - nükleotidlere katalize edebildiği için verilmiştir (Kursula, 2008).

Merkezi sinir sisteminde bu protein, gelişen oligodendrositlerden sunulur (Kasama-Yoshida ve ark., 1997). CNPaz'ın miyelinizasyonda kritik bir rol oynadığı

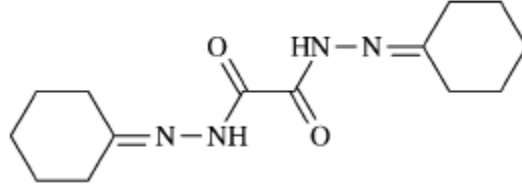
düşünülmektedir (Gravel ve ark., 1996). CNPaz, kendisinin oligodendrosit plazma membranı ile yakın ilişki kurmasına aracılık eden aktin iskeleti için bağlayıcı bir yatkınlık da gösterir (Braun ve ark., 1990; De Angelis ve Braun, 1996). CNPaz'ın fizyolojik rolü tam anlaşılabilmiş değildir. Bununla birlikte CNPaz'ın yoğunluğu demiyelinizasyon ve yıkıma uğrayan miyelin kılıf hakkında bilgi verir (Banik ve ark., 1979).

2.2. Miyelinin Yapısında Bulunan Diğer Proteinler

Miyelin yapısında başka proteinler de belirlenmiş olup, halen bunlara yenileri eklenmektedir. Miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) miyelin kılıfının gelişiminde önemli bir yere sahiptir. MAG miyelinizasyonun başlamasında temel oluşturan aksonal – glial temasta önemli bir araçtır (Li ve ark., 1994; Schnaar ve ark., 1998). MAG'ın diğer önemli bir görevi de ana yapısal proteinler yapılarına kadar bir iskelet gibi davranarak olgunlaşmamış miyelin kıvrımlarını belirli mesafelerde tutmaktır. MAG aksonal kılavuzluk görevi de üstlenmektedir. Buna rağmen halen MAG miyelin kılıfının temel yapısal proteini olarak kabul edilmemiştir (Trapp, 1998).

2. 3. Kuprizon

Kuprizon (bis-cyclohexanone oxaldihydrazone) (Şekil 1) klinik kimyada kullanılmak için üretilmiş bir bakır şelatörüdür. Bakır şelatörü olan kuprizon, farelerin yemlerine katıldığında, bakır eksikliği ile beraber MSS'de demiyelinizasyon meydana gelmektedir (Suzuki ve Kikkawa, 1969; Blakemore, 1972; Blakemore, 1973; Ludwin, 1978; Benetti ve ark., 2010). Kuprizonla meydana gelen bakır eksikliğinde, oligodendrositlerde dejenerasyonun yanısıra sitokrom C seviyelerindeki metabolik değişimlerden kaynaklanan karaciğerde megamitokondriler şekillenmektedir (Suzuki ve Kikkawa, 1969). Kuprizonun düşük seviyelerine bile oligodendrositler oldukça duyarlı iken, MSS'deki diğer hücre tiplerinde minimal seviyede hasar meydana gelmektedir (Blakemore, 1973; Ludwin, 1978; Cammer ve Zhang, 1993). Farelere kuprizon verilmesi beyindeki bir başka mitokondrial enzim olan sitokrom oksidaz aktivitesini de azaltır (Venturini, 1973).



Şekil 1. Kuprizonun kimyasal yapısı. (Muniz-Miranda ve arkadaşları'ndan, 2008)

Önceleri serumdaki bakırı belirlemek amacı ile kullanılan kuprizonun, oral yolla verilmesinin MSS'de şiddetli spongiosis (Carlton, 1967; Suziki ve Kikkava, 1969), demiyelinizasyon ve hepatik lezyonlar (Suziki ve Kikkava, 1969) meydana getirdiği dikkati çekmiştir. Daha sonra hayvanlara kuprizon verilerek demiyelinizasyon ile ilişkili hastalıklar için model oluşturulmaya başlanılmıştır. Kuprizon verilen farelerin beyin kökünde (özellikle orta beyin ve ponsun sap kısmında), diensefalonda (talamik nükleusta), serebral ve serebellar ak maddede yaygın spongiosis tespit edilmiştir. Merkezi sinir sistemin'de kuprizon ile oluşan demiyelinizasyonda başlıca oligodendrositlerin yıkımlandığı bildirilmiştir (Matsushima ve Morell, 2001; Stidworthy ve ark., 2003; Binder ve ark., 2008). Bu durumun, mikrogliaların aktivasyonu sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir (Raivich ve Banati, 2004). Aktive olan mikrogliaların oligodendrositlere zarar verebilecek sitokin ve radikal oksijen türlerini içeren yangı başlatıcı molekülleri salgıladıkları belirlenmiştir (Bakker ve Ludwik, 1987; Binder ve ark., 2008).

Serebral korteks ve talamusta bakır eksikliği ile mikroglial aktivasyon arasında bir ilişki mevcuttur (Hiremath ve ark., 1998; Pasquini ve ark., 2007; Zucconi ve ark., 2007). Bununla birlikte kuprizon ile meydana getirilen hastalıkların patolojik semptomları, kalıtsal bakır eksikliği sonucu şekillenen Menkes ve Wilson hastalıklarında da meydana gelen geç gelişim, hepatik yetmezlik, serebral atrofi ve serebellar demiyelinizasyon (Kaler ve ark., 1995; Geller ve ark., 1997; Kodama ve ark., 1999; Madsen ve Gitlin, 2007), gri maddede dejenerasyon özellikle de hipokampus ve serebellumda nöronal kayıp gibi semptomlar ile benzerlik göstermektedir (Barnard ve ark., 1978; Oder ve ark., 1991; Okeda ve ark., 1991).

Kuprizonun bakır ile şelat oluşturabilme kabiliyeti bilinmesine rağmen nörotoksik mekanizması hala kesinlik kazanmamıştır (Zatta ve ark., 2005; Messori ve ark., 2007).

2.3.1. Kuprizon ile Oluşturulan Demiyelinizasyonun Mekanizması

Kuprizon ile oligodendrosit yıkımının mekanizması hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Kuprizon ile beslenme sonucunda karaciğerde dev mitokondri oluşumu iyi bilinmektedir. Dev mitokondri oluşumu iki farklı mekanizma ile meydana gelebilmektedir. Normal boyutlardaki mitokondri genişlemiş veya kaynaşmıştır (Hoppel ve Tandler, 1973; Kipp ve ark., 2009). Hem mitokondrial kaynaşma hem de genişleme mega mitokondri meydana getirebilmektedir (Hoppel ve Tandler, 1973; Wakabayashi ve ark., 1974). Bununla birlikte mitokondrial bölünmenin engellenmesi de varsayılan bir mekanizma olarak kabul görmektedir (Flatmark ve ark., 1980). Kuprizon mitokondrial morfolojide değişiklikler meydana getirdiği için, mitokondrinin anahtar fonksiyonu olan hücresel solunumun bozulması nedeniyle bakır ile şelat oluşturan bileşimin nörotoksik özelliklerinin olabileceğini düşündürmüştür (Arnold ve Beyer, 2009). Bunun yanında mitokondrial morfolojide meydana gelen yapısal değişiklikler, kuprizonun verildiği ilk haftalarda veya günlerde miyelin kaybından önce birtakım enzimlerin aktivitesini bozmaktadır. Kuprizon verilmesini takiben karaciğerde ve beyinde monoamin oksidaz ve sitokrom oksidaz aktiviteleri azalmaktadır (Venturini, 1973). Sitokrom oksidaz 13 alt üniteden oluşan kompleks bir enzimdir. Bunlardan 3'ü mitokondri genomu tarafından kodlanır ve katalitik fonksiyonları yerine getirir. Nükleer kodlu diğer 10 ünitesi ise enzime düzenleyici güç sağlar (Arnold ve Beyer, 2009). Karbonik anhidraz II aktivitesi kuprizon verilen hayvanların beyinde demiyelinizasyon oluşmadan önce azalır (Komoly ve ark., 1987; Cammer ve ark., 1995). Bu enzim beyinde pH'daki akut değişikliklerde önemli rol oynar. Beyindeki pH'ın bozulması (asidozis) oligodendrositik strese ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açabilir (Kida ve ark., 2006). Miyelin kılıftaki karbonik anhidraz II, miyelin membranlarından su ve iyonların akışını ve birlikte taşınmasını uyararak miyelinin sağlam bir yapı kazanmasını sağlar (Carlton, 1966; 1967). Bunun yanında hayvanlara bakır ile şelat oluşturulmuş

kuprizon yedirildiğinde enzimatik aktivitenin etkilenmediği gözlenmiştir (Venturini, 1973).

Kuprizon aynı zamanda demir (Fe^{+2}), mangan (Mn^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) gibi diğer ağır metallerle de şelat oluşturabilir (Hoppel ve Tandler, 1973; Venturini, 1973; Zatta ve ark., 2005). Gerçekte bakır, demir veya mangan gibi metallerin tek başına eksikliği, kuprizonun yalnız başına meydana getirdiği şelasyon ile oluşan mekanizma sonucu gerçekleşen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri meydana getirmez. Elde edilen sonuçlar kuprizonun metabolitleri sonucunda da meydana gelebiliyor olabilir. Bununla birlikte buradaki mekanizmada kuprizonun metabolik dönüşümüne ait bir kanıt da bulunamamıştır. Bir başka mekanizma olarak, oligodendrosit öncül hücrelerin (OPC) farklılaşmasının engellenmesi (Cammer, 1999) ve aktive olan mikroglia/makrofajlardan yangıyı başlatan sitokinlerin salgılanması üzerinde durulmaktadır (Pasquini ve ark., 2007).

2.4. Demiyelinizasyon Meydana Getiren Nedenler

Kuprizon, lizolesitin, heksaklorofen ve etidium bromid gibi demiyelinizasyon oluşturabilen kimyasalların yanı sıra (Winchell ve ark., 1982; Gensert ve Goldman, 1997; Redwine ve Armstrong, 1998; Levine ve Reynolds, 1999; Peter ve ark., 2009; Pott ve ark., 2009) köpeklerde Köpek Gençlik Hastalığı Virusü (KGVH), insan ve kemirgenlerde Kızamık virusu, koyunlarda Maedi-Visna Virus, farelerde Veziküler Stomatitis Virus, fare ve insanlarda Herpes Simpleks Virus demiyelinizasyon oluşturabilmektedir (Redwine ve Armstrong, 1998; Cenci di Bello ve ark., 1999; Levine ve Reynolds, 1999). Merkezi sinir sistemin'deki bu lezyon, MS gibi etiyolojisi belirlenemeyen hastalıklarda da meydana gelmekle beraber (Dangond, 2005), *Angiostrongylus cantonensis* (Lin ve Lai, 2009) gibi parazit de sıçanlarda demiyelinizasyon şekillendirebilmektedir.

2.4.1. Multiple Sklerozis

Multiple sklerozis, MSS'de demiyelinizasyon ve yangısal değişiklikler ile karakterize bir hastalıktır. Miyelin kılıfın yıkımlanması sinir izolasyonunun kaybına yol

açar ve iletim sisteminde bozukluk meydana gelir. Akson ve nöronlar hasar görür ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde kaybolurlar (Trapp ve ark., 1999).

Multiple sklerozis, genetik olarak yatkın kişilerde; çevresel faktörler, viral ya da bakteriyel ajanlar, yangısal ve otoimmün cevap sırasında salgılanan sitokinler ve henüz tanımlanamayan bazı etiyolojik ajanların kombinasyonu sonucu gelişir. Hastalık, MSS'de marjinal demiyelinizasyondan, oligodendrositlerin tam kaybına kadar değişen doku kaybı, ağır glial skar gelişimi ve aksonal kesilerin oluşması ile şekillenmektedir. MS lezyonları yangı hücreleri, astrositik skar oluşumu, miyelin artıkları, miyelini fagosite etmiş makrofajlar, hücreler arası matriks azalması, çıplak aksonlar, OPC ve kan beyin bariyerinin yapısının bozulmasından ibarettir. (Noseworthy ve ark., 2000).

İnsanda en sık görülen demiyelinizan hastalık olan MS'de, oligodendrositler demiyelinizasyonun tamirinde (remiyelinizasyon) başarısız kalmaktadırlar. Sonuçta kalıcı miyelin ve oligodendrosit kaybı ile şekillenen lezyonlar ve nörolojik bozukluklar gelişmektedir. Hastalığın erken dönemlerinde bir miktar miyelin tamiri oluşmaktadır. Bunlar, olgunlaşmamış oligodendrositler tarafından oluşturulan normalden daha ince miyelinize aksonlar olarak görülmektedir (Wolswijk, 1998). Merkezi sinir sistemin'de remiyelinizasyonu sağlamaya yönelik tedavi stratejilerini geliştirebilmek için, MS'de miyelin onarımındaki yetersizliğin mekanizmaları iyi bilinmelidir.

MS'de deneysel demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon çalışmaları için toksin (kuprizon veya Lysolecithine) ve miyelin antijenlerinin kullanıldığı demiyelinizasyon modelleri vardır. İlginç olarak, miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) gibi miyelin proteinlerine karşı antikorlar deneysel otoimmün ensefalomyelitisteki demiyelinizasyonda (Linington ve ark., 1988) önemli bir rol oynarlar ve MS lezyonları gözlenirken (Raine ve ark., 1999), diğer antikorlar deneysel otoimmün ensefalomyelitis ve tayler fare ensefalomyelitis virus (TFEV) ile oluşan demiyelinizasyonda promiyelinize özellikler taşırlar (Rodriguez ve Lennon, 1990; Miller ve ark., 1997).

Olgun oligodendrositler aksonlara besleyici destek sağlar ve nöronları apoptozdan korurlar (Wilkins ve ark., 2001; Taniike ve ark., 2002). Hedef proteinlere otoimmün yanıt sırasında OPC'in olgunlaşp ve hasar gören oligodendrositleri yenilemek için yıkımlanan doku bölgesine göç ettikleri düşünülmektedir. Oligodendrosit öncül hücreler subventriküler ve ventriküler bölge boyunca

yerleşmişlerdir ve olgun oligodendrositlere farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Stangel ve Hartung, 2002). Olgun oligodendrositler MBP, PLP, MAG sunabilirken, tam olgunlaşmamış olanlar CNPase salınımı sağlarlar. MS lezyonlarında olgun OPC varlığı tespit edilmiştir (Scolding ve ark., 1998), fakat yangının kendisinde OPC göçünü sağlamış olabileceği bildirilmektedir (Tourbah ve ark., 1997). Bununla birlikte MS plaklarında kısmi remiyelinizasyon sağlayan primer hücrelerin, yeni gelen OPC'den mi, yoksa hasara uğramamış oligodendrositlerin veya lezyonlu bölgede zaten bulunan OPC'den mi olduğu hala bilinmemektedir.

2.4.2. Köpek Gençlik Hastalığı

Köpek gençlik hastalığı, köpeklerde ve diğer etçillerde şiddetli immün baskılanma ve MSS'nin gri ve ak maddesinde multifokal lezyonlarla karakterize nörolojik bozukluklara neden olan bir hastalıktır (Summers ve Appel, 1994). Beyaz maddede meydana gelen lezyon ilerleyici demiyelinizasyondur (Kabakçı ve ark., 2004). Hastalığın erken döneminde şekillenen demiyelinizasyon beyaz maddede virusun replikasyonuna ilişkindir ve miyelin transkripsiyonundaki düzensizlik ve miyelin üreten hücrelerin metabolik hasarı sonucu meydana gelmektedir. Fakat bu hücrelerde nekroz veya apoptoz şekillendiğine dair herhangi bir kanıt mevcut değildir. Oligodendrositlerdeki değişiklikler bu hücrelerde transkripsiyonun meydana gelmesi fakat, translasyonun olmaması ile ilişkilidir. Aynı zamanda akut lezyonlarda mikrogial hücrelerin aktivasyonu da şekillenmektedir. Hastalığın ilerleyen safhalarında meydana gelen immunolojik iyileşme ile beraber, bazı hayvanlarda lezyonların ilerlemesi ile demiyelinizasyon plakları şekillenmektedir. Hastalığın seyri ile ilişkili olmamakla beraber otoimmün reaksiyon da şekillenmektedir. Hastalığın ilerlemesi virusun MSS'de kalıcı olmasına bağlıdır (Vandeveld ve Zurbriggen, 2005).

Hastalıkta miyelin hasarının başlaması, immün sistemin baskılandığı periyotta olur ve yangı gözlenmez (Vandeveld ve ark., 1982). Başlangıç lezyonları beyaz maddede vakuolizasyon ile birlikte miyelin kılıfın balon gibi şişkinleşmesi ile karakterizedir. Yapılan birçok immunohistokimyasal ve *in-situ* hibridizasyon çalışmaları demiyelinizasyonun beyaz maddede glial hücrelerdeki virus replikasyonu ile aynı zamanda şekillendiğini göstermektedir (Vandeveld ve ark., 1985; Zurbriggen ve

ark., 1987). Demiyelinizasyonun oluşumunda oligodendrositlerin enfeksiyonu olağan bir durumdur. Higgins ve ark., (1982) KGH'da segmental demiyelinizasyon bulguları ile ilk defa oligodendrosit hasarını destekleyen görüşler ortaya koymuşlardır. Bu yüzden sonraki araştırmalar daha çok KGH'da oligodendrositlerin rollerine yöneliktir. Diğer taraftan ışık mikroskopik seviyede etkilenen hücrelerin büyük bir kısmının astrositler olduğu görülmüş (Mutinelli ve ark., 1989) ve elektron mikroskopik çalışmalar ile de KGH'da oligodendrosit enfeksiyonunun çok az olduğu belirlenmiştir (Raine, 1976; Blakemore ve ark., 1989; Mutinelli ve ark., 1989). Yapılan bir çalışmada (Zurbriggen ve ark., 1998) oligodendrositlerin yaklaşık % 8'nin etkilendiği bildirilmiştir. KGHV proteinlerinin veya viral nükleokapsitlerin oligodendrosit kültüründe oldukça nadir olduğu, aksine astrosit ve mikroglial hücrelerde KGHV enfeksiyonunun daha fazla olduğu belirlenmiştir (Vandeveld ve ark., 1985; Zurbriggen ve ark., 1986; 1987).

Son yıllarda KGHV ile enfekte köpeklerin serebellumlarında meydana gelen demiyelinizasyonda çeşitli faktörlerin etkili olabileceği üzerinde durulmaktadır. Özellikle de nörosteroid hormonların rol oynadığını öne süren çalışmalar yapılmıştır (Yarım ve Kabakçı, 2002; Yarım ve ark., 2010). Periferal ve MSS tarafından sentezlenen progesteron ve pregnenolon, nörosteroidler olarak adlandırılırlar (Tsutsui ve ark., 1999). Periferal sinir sisteminde meydana gelen bir hasardan sonra Schwann hücrelerinden sentezlenen progesteronun yeni miyelin kılıf oluşumunu tetiklediği bilinmektedir (Koenig ve ark., 1995). KGH'da oluşan demiyelinizasyonda immunohistokimyasal olarak progesteron salınımının demiyelinize alanlardaki astrositlerde arttığı bildirilmiştir. Bu steroid hormonun MSS'de oluşan demiyelinizasyonun ardından astrositlerden salınımının artması, progesteronun KGH'da MSS'de oluşan lezyon sonrası koruyucu etki yapabileceği yönünde yorumlanmıştır (Yarım ve Kabakçı, 2002).

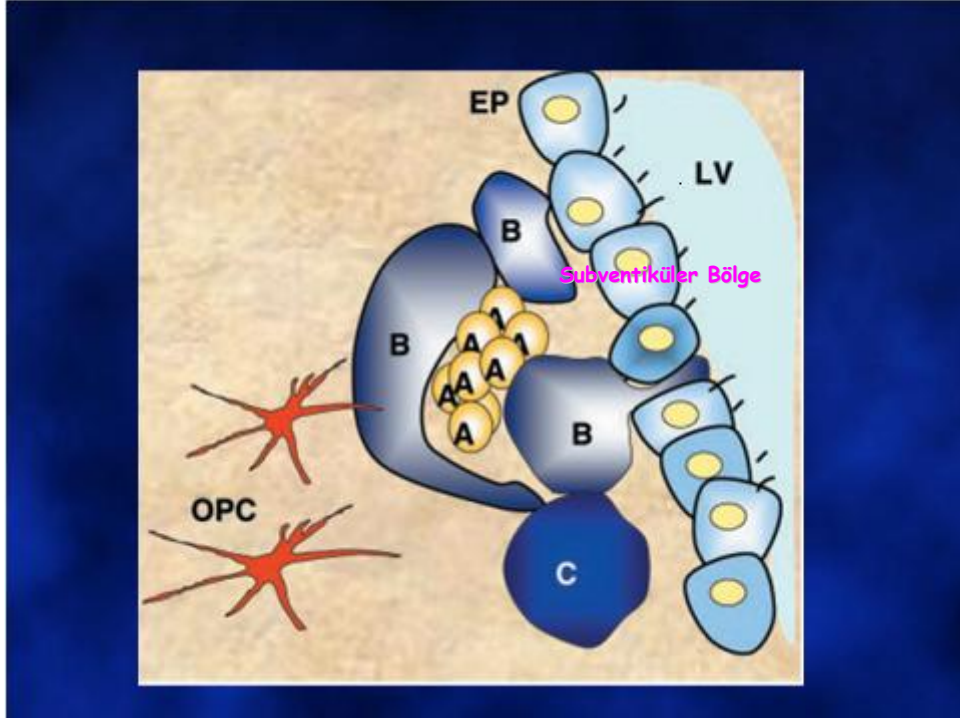
KGH virusu ile enfekte köpeklerde yapılan bir çalışmada, enfekte köpeklerin serebellumundaki astrositlerden P450arom salınımının arttığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Bu durum, demiyelinizasyon oluşan bölgedeki östrojen salınımının artması olarak yorumlanmıştır. Araştırmacılar, beyinde hasar gören bölgede astrositlerden östrojen salınımının artmasının progesteron salınımını da tetikleyerek demiyelinizasyonu onarmak amacı ile meydana gelmiş olabileceğini belirtmişlerdir (Yarım ve ark., 2010).

2.5. Demiyelinizasyonda Rol Oynayan Glial hücreler

2.5.1. Oligodendrositler

Bu hücreler MSS’de miyelin kılıfı üretir ve sürekliliğini sağlarlar. Miyelinizasyon esnasında oligodendrosit plazma membranı aksonun etrafını sıkıca sarar, miyelin kılıfın kalınlığı tabaka sayısı ile belirlenir. Merkezi sinir sistemin’de miyelinsiz aksonlar çevresinde bir zarf oluşturmaz, bazal laminayla çevrelenmez ve MSS hasarları sonrası rejenerasyona nispeten zayıf katkıda bulunabilir. Karbonik anhidraz enzimi kullanarak MSS’de ekstrasellüler pH kontrolünü sağlayarak asit-baz dengelenmesinde de kritik rol oynarlar (Müftüoğlu ve ark., 2009).

Embriyonik sinir sisteminde tüm makroglia (oligodendrosit ve astrositler) ve nöronlar, ventriküler tabakada yerleşen öncül hücrelerden gelişmektedirler. Ventriküler tabaka, lateral ventriküllerin rostral ucundan spinal kanalın kaudal ucuna kadar uzanan hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 2). Subventriküler bölge ventriküler tabakaya hemen bitişik olarak yerleşen, özellikle erişkindeki glial öncül hücrelerin kaynağı olan bölgedir (Skoff, 2003). Gelişim esnasında nöronal ve glial hücreler, subventriküler bölgedeki öncül hücre haline dönüşmüş nöral kök hücrelerinden köken alırlar (Baumann ve Pham-Dinh, 2001).



Şekil 2. Subventriküler bölge: Lateral ventrikülleri (LV) çevreleyen ependim hücrelerine (EP) komşu birkaç tabakadan oluşan bölge. A: nöral öncül hücreler, B: astrosite dönüşecek nöral kök hücreleri, C: multipotent öncül hücreler, OPC: Oligodendrosit öncül hücreler. (Imitola ve arkadaşları, 2003'den uyarlanmıştır)

Merkezi sinir sistemin'de meydana gelen demiyelinizasyonda oligodendrosit hasarı meydana gelmekte ve buna bağlı olarak miyelin kılıf yeterli şekillenememektedir. Kuprizon olgun oligodendrositleri apoptoza uğratarak demiyelinizasyon şekillendirmektedir (Mason ve ark., 2000). Kuprizon ile oluşturulan deneysel demiyelinizasyon çalışmalarında, demiyelinizasyon şekillenen bölgede olgun oligodendrositlerin sayısının, bölgesel olarak kontrol hayvanlarla karşılaştırıldığında azaldığı gözlenmiştir (Skripuletz ve ark., 2008; Norkute ve ark., 2009; Peter ve ark., 2009; Taylor ve ark., 2010). Bu azalma beşinci haftada maksimum seviyeye çıkarken, altıncı haftadan sonra yavaş yavaş bölgede olgun oligodendrositlerin sayısının tekrar arttığı ve remiyelinizasyonun şekillenmeye başladığı gözlenmiştir. Bu durumun, demiyelinizasyon oluştuktan sonra olgun oligodendrositlerin yıkılmanması ile çevredeki ve subventriküler bölgedeki OPC lezyonlu bölgeye göç etmesi ve daha sonra olgun oligodendrositlere farklılaşması ile meydana geldiği düşünülmektedir (Matsushima ve Morell, 2001). Oluşan demiyelinizasyona karşı yanıtta bu hücreler bölünür ve

kaybolanların yerine yeni oligodendrositlerin oluşmasını sağlamak için farklılaşırlar. Olgun OPC mekanik yaralanma, ekzotoksisite ve viral enfeksiyonlar gibi MSS'de oluşan bir çok hasar durumunda aktive olup çoğalmaktadır. Bu hücreler muhtemelen akson rejenerasyonunu engelleyen kondriotin sülfat proteoglikanları salgılar (Levine ve ark., 2001).

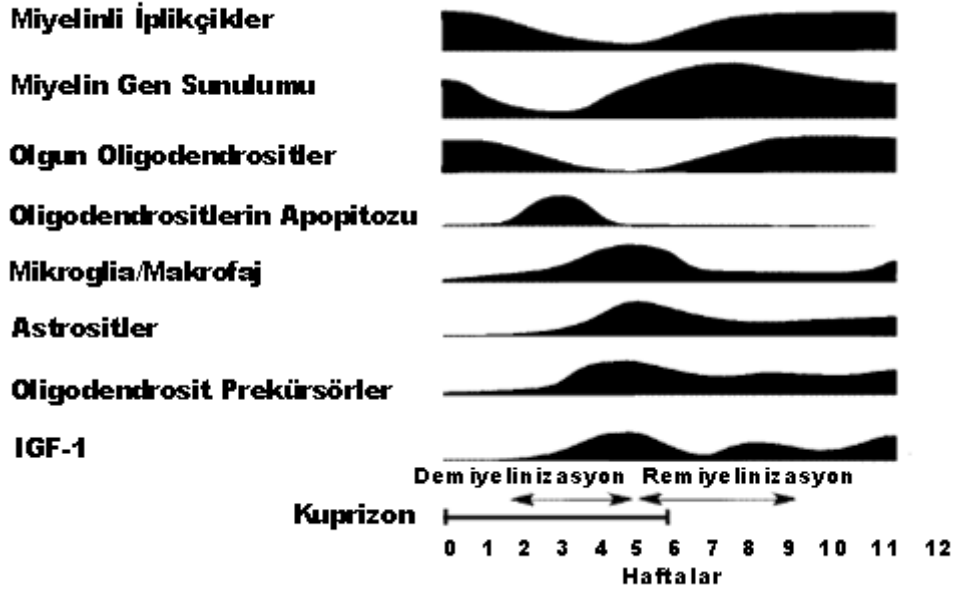
Remiyelinizasyon, lezyon ve onun etrafında endojen OPC bölünmesi ile başlayan bir süreçtir. Oligodendrosit öncül hücrelerin lezyonlu bölgede hızlı bir şekilde çoğalması ve daha sonra yeni oligodendrositlere farklılaşması, hızlı bir remiyelinizasyonun anahtarıdır. Olgun OPC MSS'de glial hücre popülasyonunun yaklaşık % 5-8'ini meydana getirir. Morfolojik olarak bu hücreler 10-15 µm ebadında ve birçok dallanmış çıkıntılara sahiptirler. Gri maddede bu çıkıntılar merkezden kenara doğru iken beyaz maddede çıkıntılar daha uzunlamasına ve sinir iplikleri ile aynı yönde seyrederler (Ong ve Levine, 1999; Bergles ve ark., 2000). Oligodendrosit öncül hücreler immunohistokimyasal olarak Nöral / Glia Antijen 2 (NG2) proteoglikan antikoru ile görülür hale getirilebilmektedir (Levine ve ark., 2001).

Diyet içerisine kuprizon katılması hücredeki mitokondriyal fonksiyonu engellemektedir. Fakat bundan neden en çok oligodendrositlerin etkilendiği hakkında hala sınırlı veri mevcuttur. Oligodendroglial hücrelerdeki metabolik ihtiyaç yüksek olduğu için bu hücrelerin tercihen daha yatkın hale geldiği düşünülmektedir. Oligodendrositlerdeki hasar, miyelin desteğini ve spesifik genlerin sentezini azaltır. Mitokondriilerdeki hasar en sonunda oligodendrositlerde apoptoza yol açar. Bazı çözülebilir faktörler, mikrogliaların proliferasyonu ve iç göçünün başlaması esnasında salınabilirler. Mikroglialardan salınan faktörler (belki önceleri sadece IL-1) oligodendrosit öncüllerin poliferasyonunu, iç göçünü ve sonuç olarak bunların farklılaşmasını başlatır. Öncül hücrelerin büyük bir kısmı, iç göç ile gelir ve farklılaşırlar, bu durum remiyelinizasyon boyunca devam eder. İlginç olarak bu durum kuprizon verilmesinin devam edildiği süreçte de gerçekleşir. Bu durumun, seviyesi artan IGF-1'in (sentezlenmesi ve astrosit, oligodendrosit gibi glia hücrelerinden salınması sayesinde) yeni şekillenen birçok olgun oligodendrositleri apoptotik hücre ölümünden koruması sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Eğer kuprizon diyetten çıkarılırsa remiyelinizasyon ve iyileşme devam eder (Matsushima ve Morell, 2001).

2.5.2. Mikroglialar

Demiyelinizasyonun mikroglia proliferasyonu ve astrogliozis ile birlikte seyrettiği bilinmektedir (Blakemore, 1972; 1973; Ludwin, 1978). C57BL/6 ırkı farelerde kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyonda ilk iki hafta sonunda mikroglia/makrofaj birikimi tespit edilmiş ve bu hücre birikiminin 4-6. haftalarda en üst düzeyde olduğu gözlenmiştir (Hiremath ve ark., 1998; Morell ve ark., 1998). İlk yapılan ultrastruktural çalışmalar kuprizonun mikroglial mitozu uyarmadığını göstermiştir (Blakemore, 1972; 1973). Mikrogliaların sayılarının demiyelinizasyon bölgesinde artması; bölgesel olarak bu hücre tipindeki bir proliferasyondan veya beynin diğer bölgelerinden göçten kaynaklanmaktadır. Mikroglialar, demiyelinizasyon meydana gelen bölgede miyelin kalıntılarını temizleme görevi yapmaktadırlar (Blakemore, 1972; Smith, 1999). Buna ilave olarak oligodendrositlerin demiyelinizasyon sürecine olumlu katkı sağlamak amacıyla stratejik olarak çoğaldıkları da geçerli bir görüştür (Matsushima ve Morell, 2001). Mikrogliaların ortaya çıkışı, kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyonun 3. haftasında OPC'lerin ve astrositlerin sayısının artması ile eş zamanlı olmaktadır (Hiremath ve ark., 1998; Morell ve ark., 1998; Mason ve ark., 2000). Mikrogliaların varlığı ve demiyelinizasyona yol açan olaylar arasında muhtemelen hücreden hücreye sinyal yolu ile meydana gelen fonksiyonel bir ilişki bulunmaktadır. Bu amaçla, kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyon ve kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonraki demiyelinizasyon sürecinde bazı sitokinler ve büyüme faktörlerinin varlığını göstermeye yönelik bir çalışmada (Matsushima ve Morell, 2001) ilginç olarak İnterlökin-1 (IL-1) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi sadece belirli sitokinler ve büyüme faktörlerinin 3-6. haftalar arasında biriktiği gözlenmiştir

Kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyonda IGF-1 üç haftada yükselmiştir (Mason ve ark., 2000). Aynı zaman diliminde OPC birikimi veya iç göçünün göze çarptığı ve daha önce bölgede bulunan oligodendrogliaların apoptotik ölümünün devam ettiği bildirilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Kuprizon toksikasyonunda şekillenen akut demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon esnasındaki morfolojik, hücresel ve biyokimyasal değişiklikler (Mason ve arkadaşları 2000'den uyarlanmıştır)

Yapılan immunohistokimyasal boyamalar ile IGF-1'in hem astrositler hem de mikroglialar tarafından salgılandığı görülmüştür. IL-1 seviyelerinin IGF-1 den önce bile arttığı belirtilmiştir. Bu durum mikroglialar tarafından salınan bu sitokinin, IGF-1 üretimi ve salınımına yol açan basamakları başlatabileceğini akla getirmiştir. Bu sayede mikroglialar iyileşme sürecinde bir sıçrama başlatabilmektedir (Şekil 4). Tüm bunlar IGF-1'in her nasılsa oligodendrosit farklılaşmasını ve hayatta kalabilme gücünü arttırabildiğini düşündürmüştür (Matsushima ve Morell, 2001).

Demiyelinizasyon

Remiyelinizasyon



Şekil 4. Kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyon ve sonrasında oluşan remiyelinizasyon esnasında oligodendrosit, astrosit ve mikroglialar arasındaki etkileşim (Matsushima ve Morell, 2001'den uyarlanmıştır)

2.5.3. Astrositler

Astrositler beynin intersitisyel hücreleri gibidirler. Nöronlar ve oligodendrositler çevresinde, perivasküler ve subpial bölgelerde en çok bulunan nöroglial hücre tipidir. Astrositler, sitoplazmik uzantılarından bir kısmı ile kan kapıllar duvarına genişlemiş bir ayak ile oturur ve diğer uzantıları ile sinir hücreleri arasında sinapslar oluşturarak kan ile sinir hücreleri arasında özellikle su ve mineral olmak üzere madde alışverişini sağlarlar. Ayrıca, astrositlerin uzantıları MSS'nin destek stroması olan glia ağını ya da nöropilin büyük bölümünü oluşturur. Sinir hücresi için zararlı olabilecek kandaki maddelerin geçişine olanak vermezler (Kan-beyin bariyeri). Astrositlerin destek ve alışveriş fonksiyonlarının dışında, zedelenmelerde onarım fonksiyonları da vardır (Aytekin ve ark., 1998; Nishiyama ve ark., 2005).

Yapılan birçok çalışmada deneysel olarak oluşturulan demiyelinizasyondan sonra lezyonun meydana geldiği bölgelerde astrositozis gözlenmiştir (Norkute ve ark.,

2009; Pott ve ark., 2009). Astrositler patolojik ve dejeneratif durumlarda bölgesel olarak enerji gereksinimini sağlarlar (Horvat ve ark., 2006). MS hastalığında aktif demiyelinizasyonda astrositlerin proliferasyonu bilinen bir olaydır (Keegan ve ark., 2005; Lassmann, 2008). Astrositler demiyelinizasyon ve dejenerasyon esnasında yangıyı ilerleterek oligodendrositlerin ve aksonların hasara uğraması ve glial skar dokusu oluşmasında önemli bir rol oynayabilirler. Fakat aynı zamanda remiyelinizasyon, OPC göçü, proliferasyonu ve farklılaşması için de uygun ortam oluşturabilirler (Williams ve ark., 2007). Astrositler, prostaglandinler (Johann ve ark., 2008) kadar, TNF- α veya IL-1 gibi beyin dokusuna zarar verebilecek sitokinleri de salgılayabilirler (Kipp ve ark., 2007). Bunun sonucunda oligodendrositler hasara uğrar ve demiyelinizasyon ilerler. Diğer taraftan bu hücreler IGF-1 ve bazik fibroblast büyüme faktör gibi oligodendrosit apoptozunu önleyen maddeler salgılayarak remiyelinizasyonda önemli rol oynayabilirler (Komoly ve ark., 1992; Mason ve ark., 2000). Astrositler TNF- α veya IL-1 salgılayarak akut fokal demiyelinizasyon esnasında ve hastalığın ilerleme döneminde yıkılayıcı etki göstermektedirler (Aktas ve ark., 2007; Kipp ve ark., 2007). Fakat hastalığın geç devresinde yeniden olgun oligodendrosit oluşumunu sağlayarak remiyelinizasyonu sağlayabilmektedirler (Mason ve ark., 2001; Barnett ve Prineas, 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kuprizonla oluşturulan demiyelinizasyonda, astrositlerden IGF-1 salınımı tespit edilmiş ve OPC'in yeni oligodendrosit sentezini meydana getirerek remiyelinizasyonu şekillendirdiği bildirilmiştir (Norkute ve ark., 2009).

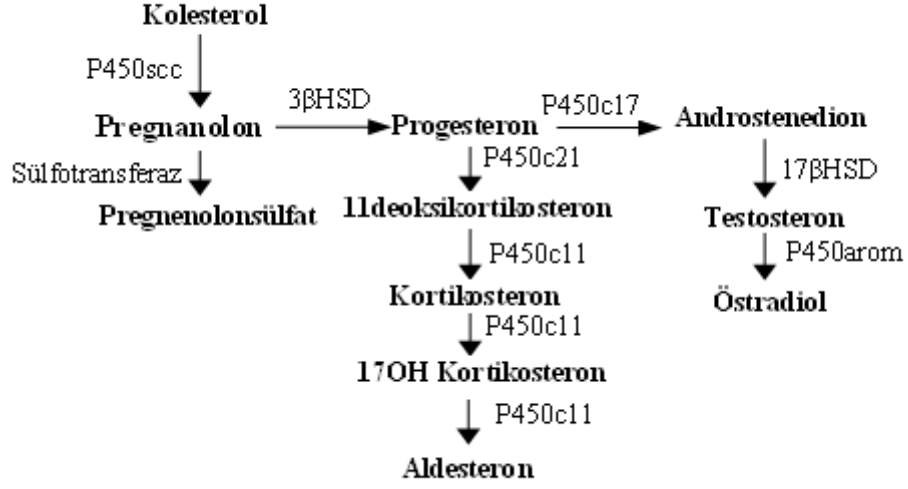
Glial fibriler asidik protein (GFAP) MSS'nde astrositlerden expresse edilir. Bu hücre yapısı, hareket, hücre iletişimi ve kan beyin bariyerinin fonksiyonu gibi bir çok hücre fonksiyon gerektirir. GFAP hücredeki düzenlenen filament ağı ile mitozda rol oynar. Mitoz esnasında fosforilasyona uğramış GFAP miktarında bir artış meydana gelir ve hücre bölünmesi meydana gelen kırılma bölgesindeki modifiye protein hareket eder (Tardy ve ark., 1990). GFAP aynı zamanda astrosit-nöron etkileşiminde de rol oynamaktadır. İn vitro ortamda GFAP'tan yoksun astrositler genellikle varolan nöronlarla birlikte fazladan şekillenmemektedirler. GFAP knockout farelerde purkinje hücrelerinde normal yapı meydana gelmemekte ve bu fareler göz kırpma testi gibi deneylerde eksiklik göstermektedirler. Bu yüzden GFAP Purkinje ve belki de diğer

birçok nöronal hücre tiplerinin iletişimde büyük rol oynamaktadır (Goss ve ark., 1991).

2.6. Nörosteroidler

Daha önceleri steroidlerin gonadlar, adrenal bezler ve plasenta tarafından sentezlendiği düşünölmekteydi. Bu steroidlere ek olarak, bazı steroidlerin beyinde de sentezlenebildiği ve nöronal uyarılabilirliği değiştirebildikleri ve beyin ve işlevlerini etkiledikleri bildirilmiştir. Bu steroidlere ‘nörosteroidler’ adı verilmiştir (Paul ve Purdy, 1992; Baulieu, 1998). Bir steroidin nörosteroid olarak tanımlanması için iki temel esas vardır. Birincisi steroidin steroidojenik endokrin bezlerin yokluğunda da beyinde var olması, ikincisi sinir sisteminde enzimatik aktivite gösterebilmesi ve burada salınımının yapılabilmesidir (Schumacher ve ark., 2004).

Nörosteroid yapımının temelini kolesterolün nöronların ve glia hücrelerinin mitokondrilere girerek burada birtakım enzimlerin katalizörlüğü vasıtasıyla mineralokortikoidlere, glikokortikoidlere ve cinsiyet hormonlarına çevrilmesi oluşturur. Bu çevrilme olayının periferal steroidojenik organlarda ve beyinde oluşum mekanizması aynıdır (Mellon ve ark., 2001). Bu olay nöronlarda ve glia hücrelerinin (oligodendrosit ve astrosit) mitokondrilinde gerçekleşmektedir (Schumacher ve ark., 2000). Kolesterol, dış mitokondri zarı üzerinde yerleşmiş olan periferal tip benzodiazepin reseptörleri yolu ile mitokondri içine geçer. Kolesterol daha sonra pregnenolona dönüştürölür ki bu steroid yapımında hız sınırlayıcı bir basamaktır ve iç mitokondri membranında yerleşmiş olan sitokrom P450 side chain cleavage (P450ssc) enzimi tarafından katalizlenir. Pregnenolon daha sonra pregnanlara ve androstanlara metabolize olur (van Broekhoven ve Verkes, 2003) (Şekil 5).



Şekil 5. Steroid sentezinin şeması (Mellon ve Griffin, 2002'den uyarlanmıştır)

Nörosteroid sentezindeki biyokimyasal yolların çoğu açığa çıkarılmış olmasına rağmen, nörosteroid sentezleyen hücrelerin aktivitesini kontrol eden şema halen tam olarak bilinmemektedir. Gama amino butirik asit (GABA)'ın kendisi ve reseptör kompleksinin nörosteroid yapan enzim aktivitelerini baskıladığı gösterilmiştir. Nöroaktif steroidler de GABA_A reseptör etkinliğini değiştirerek kendi yapımlarını düzenleyebilecekleri bildirilmiştir (Do-Rego ve ark., 2000).

Sinir sisteminde nörosteroidler hem glia hücreleri hem de nöronlardan sentezlenir. Örneğin P450scc başlıca astrositler (Mellon ve Deschepper, 1993), oligodendrositler (Jung-Testas ve ark., 1989) gibi glial hücreler yanında sinir sisteminin bazı bölgelerinde nöronlar (Örneğin süperior servikal ganglion) ve serebellar Purkinje hücrelerinden de sentezlenir (Furukawa ve ark., 1998; Ukena ve ark., 1998).

2.6.1. Nörosteroidlerin Sinir Sistemi ve Davranış Üzerine Etkileri

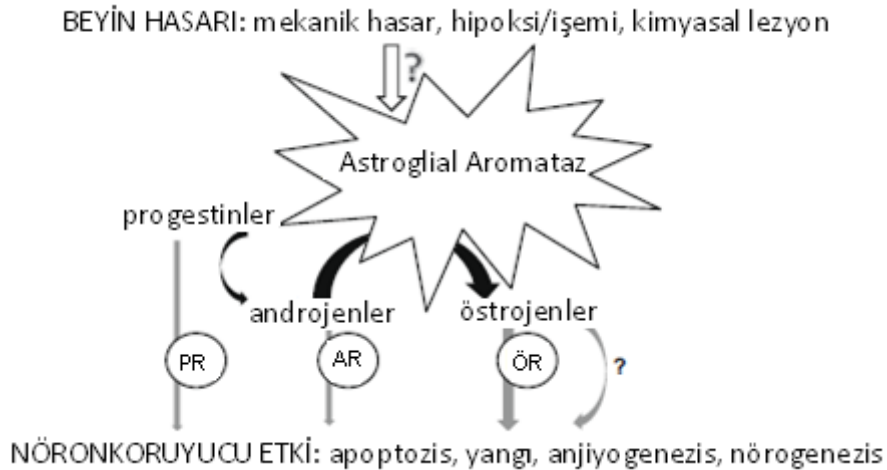
Nörosteroidlerin embriyonik aksonal ve dentritik büyüme, nöron koruyucu ve miyelinizasyondaki (Baulieu, 1998; Tsutsui, 2006) etkilerinin yanısıra depresyon, uyku, stres gibi birçok davranışları kontrol ettiği düşünülmektedir (Biggio ve ark., 2001). Eldeki veriler nörosteroidler premenstrüel distforik bozukluk (Girdler ve ark., 2001), yeme bozuklukları (Monteleone ve ark., 2001), dikkat eksikliği, hiperaktivite (Strous ve

ark., 2001), anksiyete (Bicikova ve ark., 2000) ve panik bozuklukları (Brambilla ve ark., 2003), hafıza modülasyonu (Baulieu ve Robel, 1998), Alzheimer hastalığındaki agresif davranışları (Bernardi ve ark., 2000), agresyon (Nicolas ve ark., 2001) ve alkolün etkileri (Khisti ve ark., 2002) gibi durumlarda da rolü olduğunu göstermektedir.

2.6.2. Beyin Hasarı ve Miyelinizasyonda Rol Alan Nörosteroidler ve Steroidojenik Enzimler

Aromataz P450 ve Östrojen

Aromataz P450 östrojen biyosentezinde gerekli olan anahtar bir enzimdir (Garcia-Segura ve Melcangi, 2006). Buna bağlı olarak P450arom ovaryumlardan (Stocco, 2008), adrenal bezlerden (Moreau ve ark., 2009) ve testislerden (Carreau ve ark., 2007) sunulur. P450arom salınımı sadece klasik endokrin bezlerle sınırlı değildir. Gebelik veya gelişim süreçlerinde farklı dokulardan ve hücre tiplerinden de sunulabilirler (Simpson ve ark., 2002). P450arom salınımı seviyelerinin kolayca ölçülebileceği diğer dokular arasında kemik (Yanase ve ark., 2003), fetal karaciğer (Toda ve ark., 1994), plasenta (Mendelson ve Kamat, 2007), deri (Zouboulis ve ark., 2007), meme kanser hücreleri (Bulun ve Simpson, 2008) ve beyin (Naftolin, 2008) sayılabilir.



Şekil 6. Beyinde meydana gelen bir hasar henüz çok az anlaşılabilen bir mekanizma ile memelilerde ve kuşlarda radial glia (astroglia) ve reaktif astrositlerde P450arom translasyon ve transkripsiyonunun düzenlenmesi ile sonuçlanır. PR: Progesteron reseptörü, ÖR: Östrojen reseptörü, AR: Androjen reseptörü (Saldanha ve arkadaşları, 2009'dan uyarlanmıştır)

Aromatazin nöronal hasarı takiben hücre göçünü ve sitogenezisi düzenlediği düşünülmektedir. Omurgalıların beyinde oluşan hasarda da radial glialarda P450arom salınımının meydana geldiği bildirilmiştir (Peterson ve ark., 2004). Radial glia hücre tiplerinin nöronal hasar sonrasında hücre göçü ve sitogenezisin düzenlenmesinde önemli olabileceği düşünülmektedir. Radial glialarda P450arom salınımının beyin hasarını takiben beyin yapısının ve fonksiyonunun onarıldığı bölgelerde nöronal göç için anahtar görevi gördüğü düşünülmektedir. Beyindeki P450arom'un sitogenezis, nöronal hasar, nöronal migrasyon ve nöronal hayatta kalma süresi üzerine birtakım mekanizmalarla katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Saldanha ve ark., 2009).

Östrojen, hasara uğrayan bir nöronun iyileşmesine, nöronal uzantıların rejenerasyonuna ve hasar olan bölgede normal kan akışının sağlanmasına katkıda bulunur (Garcia-Segura ve ark., 1999). Östrojenin, astrositler üzerine etki ederek bir nörosteroid olan ve miyelinizasyonu ilerleten progesteronun astrositlerden lokal sentezini arttırıcı etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (Sinchak ve ark., 2003; Micevych ve ark., 2008; Micevych ve Sinchak, 2008). Astrosit kültürüne östrojen eklenmesi astrositlerden progesteron sentezini arttırmıştır (Sinchak ve ark., 2003). Kuşlarda ve memelilerde beyin hasarı olan bölgede P450arom'un transkripsiyonu ve translasyonunu hızlandırarak östrojen sentezini gerçekleştirdiği görülmüştür. P450arom'un salınımının yükselmesi, lokal östrojen seviyesini yükseltir ve böylece apoptotik yolları aksatır. Bunun sonucunda sekonder dejenerasyon azalır ve sonunda hasar azaltılmış olur (Şekil 6). Buna benzer yapılan çalışmalarla aromatisasyonun beyinde oluşan hasara bağlı sitogenezisi etkilediği ve dejenerasyonu yavaşlatıp onarımı hızlandırarak, bir dizi mekanizma ile nöron koruyucu olarak rol oynadığı kabul görmektedir (Saldanha ve ark., 2009).

Östrojen deneysel otoimmün ensefalomyelitisi hayvanlarda klinik semptomları azaltmaktadır (Bebo ve ark., 2001). Ayrıca östrojen primer kemirici oligodendrosit hücre kültürlerinde OPC proliferasyonunda ve membran kılıf oluşumunda etkili olmuştur (Ghoumari ve ark., 2003; Marin-Husstege ve ark., 2004). Aynı zamanda östrojen kültür içerisinde toksin ve oksijen ilişkili oligodendrosit ölümünü ve neonatal

sıçanların ak maddesindeki oksijen ilişkili miyelin temel protein kaybını da önlediği bildirilmiştir (Takao ve ark., 2004; Gerstner ve ark., 2007). Östrojen verilmesi oligodendrositlerden yangı başlatıcı sitokinlerin salınımını azaltmıştır (Bruce-Keller ve ark., 2000; Drew ve Chavis, 2000; Vegeto ve ark., 2006). Östrojenin beyinde demiyelinizasyon üzerine etkisini araştıran bir çalışmada, C57BL/6 ırkı farelerden oluşan iki deneme grubu ve bir kontrol grubu oluşturulmuştur. 1. deneme grubu C57BL/6 ırkı farelerin yemine % 0.125 oranında kuprizon eklenmiş, 2. deneme grubunun yemine yine % 0.125 oranında kuprizon eklenirken aynı zamanda da bu gruptaki farelere deri altı implant şeklinde östrojen uygulanmıştır. Üçüncü grup ise kontrol grubu olarak normal yem ile beslenmeye alınmıştır. 5. hafta sonunda kuprizon ile beslenen her iki grupta oluşan demiyelinizasyon oranına bakıldığında, kuprizon ile beslenen fakat implant uygulanmayan hayvanlarda şiddetli demiyelinizasyon oluşurken, kuprizon ile beslenen ve aynı zamanda da östrojen implantı uygulanan hayvanların myelin miktarı normal yem ile beslenen kontrol gruplarına yakın bulunmuştur. Östrojen verilmesi kuprizonun etkisini engelleyerek olgun oligodendrositlerin hayatta kalmasını sağlamıştır (Taylor ve ark., 2010).

3 Beta Hidroksi Steroid Dehidrojenaz ve Progesteron

Sinir sisteminde lokal olarak sentezlenen ya da dolaşımdan gelen pregnenolon, 3 β HSD tarafından progesterona çevrilir. 3 β HSD'a serebellum, hipokampus, korteks, striatum, septum ve bulbus olfactoryus taki nöronlarda rastlanmıştır (Guennoun ve ark., 1995).

Progesteron perifer sinirler, omurilik ve beyinde sentezlenir. Progesteronun öncülü olan pregnanolon MSS'de ya doğrudan dolaşımdan gelir ya da P450scc enzimi aracılığıyla kolesterolden sentezlenir. Pregnenolon 3 β HSD enzimi tarafından progesterona çevrilir. *In situ* hibridizasyon çalışmalarında bu enzimin sıçan beyni, omurilik ve dorsal kök gangliyonlarındaki nöronlardan sentezlendiği gösterilmiştir. Astrosit ve oligodendrosit gibi glial hücreler ve Schwann hücreleri progesteron sentezleme yeteneğine sahiptir. Fakat, bu hücrelerdeki 3 β HSD salınımı ve aktivitesi hücrel etkileşim sonucunda meydana gelir. Böylelikle Schwann hücreleri nöronal uyarıya yanıt olarak pregnenolonu progesterona çevirebilir. P450scc ve 3 β HSD'nin

insan sinir sisteminden de salınımı yapılabilir. Progesteronun nöron koruyucu etkisi Wobblers farelerin omurilik motor nöron dejenerasyonunda ortaya konmuştur. Wobblers farelerin progesteron ile 15 günlük semptomatik tedavisi ile omurilik motor nöronlarında nöropatolojik değişiklikler azalmış ve hayvanların yaşam süreleri ile kas boylarının uzunluklarında olumlu değişiklikler meydana gelmiştir. Progesteron, nöronların ve hasar sonrasında hormon duyarlı hale gelen glial hücrelerin spesifik genlerini düzenleyerek nöron koruyucu etkisini gösterir. Progesteron aynı zamanda da miyelinizasyonu sağlamaktadır (Schumacher ve ark., 2004).

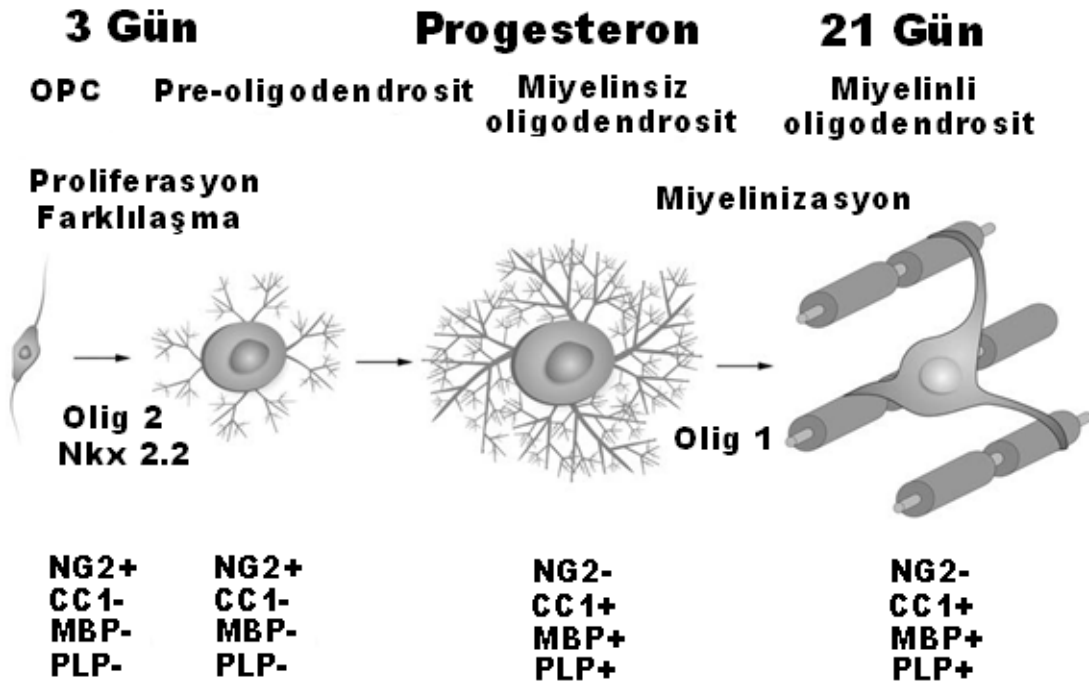
Progesteronun nöron koruyucu etkisini açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür (Stein, 2001; Gonzalez ve ark., 2002). Bunlardan ilki, progesteronun serbest radikaller tarafından hücre membranının bozulmasını ve lipid peroksidasyonunu azaltmasıdır (Roof ve ark., 1997). İkincisi, progesteron ve onun metabolitleri nörotransmitter reseptörlerin aktivitesini düzenleyerek nöronal uyarılabilirliği azaltırlar ve hasar sonrası ekzotoksik hücre ölümünden nöronları korur (Ogata ve ark., 1993). Üçüncüsü ise progesteron hasardan sonra hormona duyarlı hale gelebilen nöron ve glia hücrelerindeki spesifik genlerin salınımını düzenler. Progesteron nöron koruyucu etkisini ya doğrudan nöronları, ya da dolaylı olarak hasar bölgesini çevreleyen glia hücrelerini etkileyerek gösterir (De Nicola ve ark., 2003).

Progesteronun yeni miyelin kılıf oluşumuna olumlu etki yaptığı bilinmektedir (Schumacher ve ark., 2001). Bu, ilk defa siyatik sinirlerde ortaya konmuştur. Schwann hücreleri aksonal sinyale yanıt olarak fonksiyonel 3 β HSD salınımı gerçekleştirirler ve 3 β HSD siyatik sinirlerdeki progesteron seviyesini belirlemede kullanılır (Koenig ve ark., 1995). Erkek sıçanların siyatik sinirlerinde soğuk ile oluşturulan bir lezyondan sonra 3 β HSD mRNA seviyeleri, periferik miyelin proteinlerindeki değişiklikler ile paralellik göstermiştir. Bu durum, lokal olarak progesteron sentezinin miyelinizasyonda önemli rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Robert ve ark., 2001). Diğer taraftan, soğuk ile oluşturulan lezyondan sonra lokal olarak progesteron sentezini (trilostan) ya da aktivasyonunu (mifepriston) engelleyen maddeler verildiğinde ise yeni miyelin kılıf oluşumu büyük ölçüde engellenmiştir. Fakat, lokal olarak yüksek doz progesteron verilmesi miyelinizasyonu ilerletmiştir (Koenig ve ark., 1995).

Omurilikte oluşturulan bir hasardan sonra beyaz maddede ve gri maddede OPC hücreleri belirleyen NG2 belirteci orta derecede pozitif reaksiyon vermesine rağmen, kontrollerde negatif sonuç vermiştir. Aynı koşullarda MBP salınımının azalması hasar sonrası demiyelinizasyonun arttığını işaret etmektedir. Omurilik hasarından sonra progesteron uygulanması, MBP ve NG2 salınımının, progesteron uygulanmayan omurilik lezyonlarına göre yüksek derecede arttırmaktadır. Bir çalışmada, 3 ve 21 gün süre ile günlük 16 mg/kg progesteron uygulanıp omurilikte OPC ve olgun oligodendrosit sayıları ile MBP, PLP ve MOG ve oligodendrosit kuşağında farklılaşmayı (olig2 ve Nkx.2.2) ve remiyelinizasyonu (olig1) uyaran transkripsiyon faktörlerinin salınımlarına bakılmıştır. Normal koşullarda omurilikte oluşan lezyondan sonra 3 ve 21 günlük periyotlardan sonra oluşan lezyon dorsal ve ventral yollardaki beyaz maddede OPC'nin çoğalmasını uyarmıştır. Fakat, OPC'deki bu çoğalma demiyelinizasyon oluşmasını engellememiştir. Çünkü immunohistokimyasal olarak bakıldığında hem 3 hem de 21 günde olgun oligodendrositlerin sayısında olduğu kadar MBP ve PLP salınımlarında da azalma meydana gelmiştir (De Nicola ve ark., 2009). Transkripsiyon faktörde meydana gelen bir azalma miyelinizasyon ve miyelinizasyon ilişkili oligodendrosit olgunlaşmasında yetersizlik ile sonuçlanmıştır. Franklin ve Kotter, (2008)'e göre remiyelinizasyonun bozulması, OPC'nin defektif çoğalmasından çok, OPC'nin defektif olgunlaşması ve farklılaşmasından kaynaklanmaktadır. Fakat oluşan lezyondan sonra 3 ve 21 günlük periyotlarda günlük progesteron uygulanması remiyelinizasyon oluşumunu sağlayabilmiştir. Üç günlük progesteron uygulamasından sonra reaktif morfoloji gösteren OPC sayısında, MBP mRNA, transkripsiyon faktörler olig2 ve Nkx.2.2 mRNA seviyelerinde daha fazla bir artış meydana gelmiştir. Nkx.2.2, temel miyelin proteinlerinin direk sentezinin kontrolü için PLP ve MBP düzenleyicileri tarafına bağlanır. OPC'de olig2 ve Nkx.2.2 progesteron stimülasyonu bunların olgun formlara farklılaşmasını ve aynı zamanda da oligodendrositlerde hayatta kalmayı uyarıyor olabilir (Watanabe ve ark., 2004; Ligon ve ark., 2006).

Buna ek olarak 21 gün süre ile progesteron uygulanması da miyelinizasyon üzerinde olumlu etkiler yapmıştır. Bu zaman diliminde de progesteron uygulanması OPC'nin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını sağlamıştır. Bu değişiklikler PLP protein ve olig1 transkripsiyon faktörün artışı ile birlikte meydana gelmektedir. Olig1, kuprizon

veya lysolecithin ile oluşan demiyelinizasyonda, demiyelinizasyonun tamirinde ve oligodendrogeneziste gereklidir (Arnett ve ark., 2004). Bu yapılan çalışmalar, progesteronun OPC'nin farklılaşmasını ve olgunlaşıp miyelinli oligodendrosite dönüşümünü artırıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 7).



Şekil 7. Oligodendrosit öncül hücreler ve pre-oligodendrositler NG2 için immün pozitifdir fakat olgun oligodendrosit belirteci (CC1) miyelin proteinleri için negatif reaksiyon vermektedir. Miyelinize ve miyelinize olmayan oligodendrositler NG2 negatif fakat CC1, MBP, PLP pozitifdir. 3 gün progesteron verilmesi OPC yoğunluğunu arttırmış ve transkripsiyon faktörler olig2 ve Nkx2.2'nin salınımını arttırarak OPC'nin farklılaşmasını uyarmıştır. Hasardan sonra 21 gün progesteron verilmesi ise oligodendrosit olgunlaşmasını ilerletmiş ve olig1 (demyelinize lezyonların onarımı için gerekli) artışını sağlayarak remiyelinizasyonu ilerletmiştir. Bu oligodendrosit nesillerinin ilerlemesi, miyelin proteinleri üzerinde progesteronun etkisi ile paralellik göstermektedir ve bu omurilikte meydana gelen travmatik hasarın tamirinde temel bir basamak oluşturuyor olabilir (De Nicola ve arkadaşları, 2009'dan uyarlanmıştır)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma için etik kurul izni alındı (OMÜ HADYEK, 2008/01). Çalışmada TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nden sağlanan, ortalama 25±5g ağırlığında, 3 aylık, C57BL/6 ırkı 36 adet erkek fare kullanıldı. Bunlardan 24 adedi deneme, 12 adedi ise kontrol olarak tutuldu. Deneme süresince fareler *ad libitum* beslendi.

3.2. Kuprizonlu Yemin Hazırlanması

Farelerde toksikasyon kuprizon (Sigma, C9012) ile oluşturuldu. Standart toz halindeki 50 kg fare yeminin içerisine 100 gr kuprizon katılarak, karışım iyice homojenize edildi. % 0.2 oranında kuprizon içeren karışım, pelet yem haline getirildi.

3.3. Deneme Grupları ve Toksikasyonun Oluşturulması

Çalışmada 12 adet fare 8 hafta süreyle kuprizonlu yem ile beslenirken (Grup I), 12 adedi 8 hafta süreyle kuprizonlu yem ve bunu takiben 4 hafta süreyle normal yem ile beslendi (Grup II), 12 fare ise 12 hafta süreyle atandart fare yemi ile beslenerek kontrol olarak tutuldu (Grup III). Tüm farelerin içme suyuna *ad libitum* ulaşmaları sağlandı. Çalışma sonunda tüm fareler 3 mg/kg ketamin HCl anestezisi altında perfüzyonlarını takiben nekropsileri yapıldı. Grupların dağılımı ve toksikasyon süreleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Deneme planına göre oluşturulan gruplar, kuprizonun veriliş dönemi ve deneme süreleri

Grup	Verilen kimyasal ajan	Deneme süresi (hafta)
Grup I (Demyelinizasyon grubu)	% 0.2'lik kuprizonlu yem	8
Grup II (Remiyelinizasyon grubu)	% 0.2'lik kuprizonlu yem (8 hafta) + Normal yem (4 hafta)	12
Grup III (Kontrol grubu)	Standart yem	12

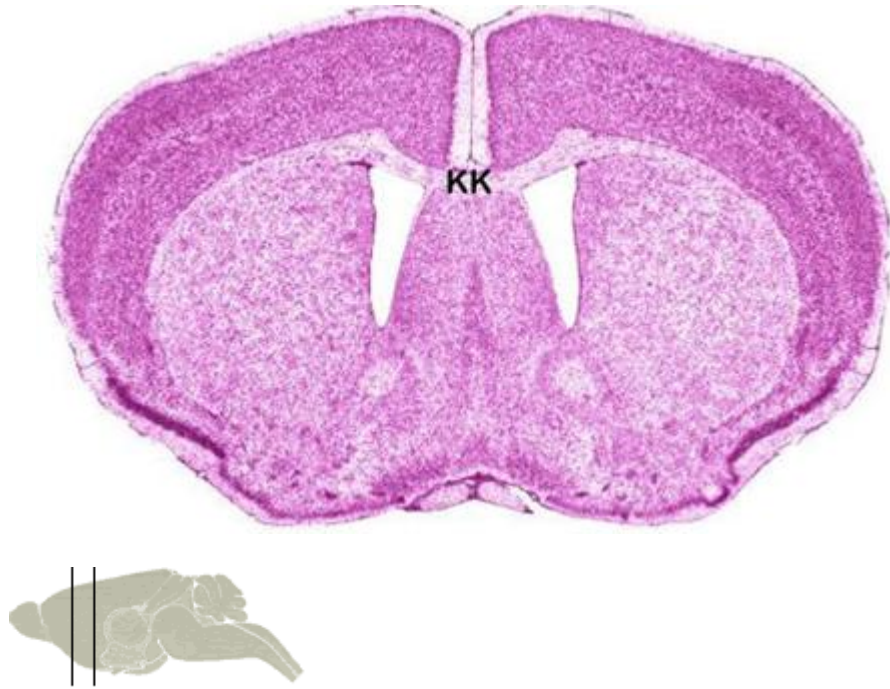
3.4. Perfüzyon Tekniğinin Uygulanması

Perfüzyon için distile su içerisinde % 4'lük paraformaldehit solusyonu hazırlanıp pH'ı 7.4'e ayarlandı. Takibinde perfüzyon işleminden önce damarları yıkamak amacı ile % 0.9'luk NaCl solusyonu hazırlandı. Sıvı verilirken yüksek basınç nedeni ile damarların zarar görmesini önlemek amacı ile verilecek sıvının akış hızınının 20 ml/dk olması için hazırlanan her iki solüsyon şişesi operasyon masasından 100 cm yüksekliğe asıldı (dakikada 20 ml/dk akış sağlayacak şekilde). Her bir hayvan 3 mg/kg dozda ketamin HCl anestezisi altında uyutulduktan sonra göğüs boşluğu açılarak kalp ortaya çıkarıldı. Sol ventrikuldan ince uçlu intraket (5 mm'lik) ile girildi ve verilen sıvının vücudu dolaştıktan sonra çıkışını sağlamak amacıyla sağ atriyuma kesit atılarak önce % 0.9'luk 200 ml NaCl ile damarlar yıkandı (Eksanguinasyon metodu ile ötenazi) . Daha sonra 200 ml, % 4'lük paraformaldehit ile perfüzyon yapıldı (Australian Phenomics Network).

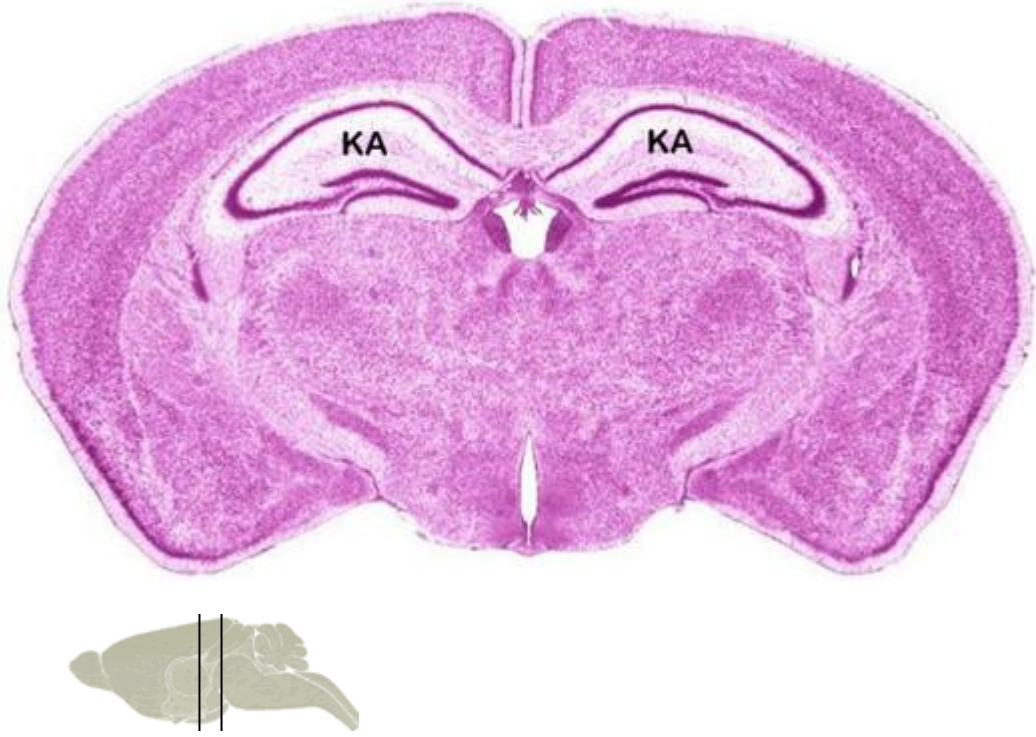
3.5. Histopatolojik İnceleme İçin Doku Kesitlerinin Hazırlanması

Perfüzyon sonunda hayvanların beyinleri çıkarılarak, Harward Üniversitesi tarafından fareler için hazırlanmış beyin atlasına göre 165, 315 ve 446. bölgelerden

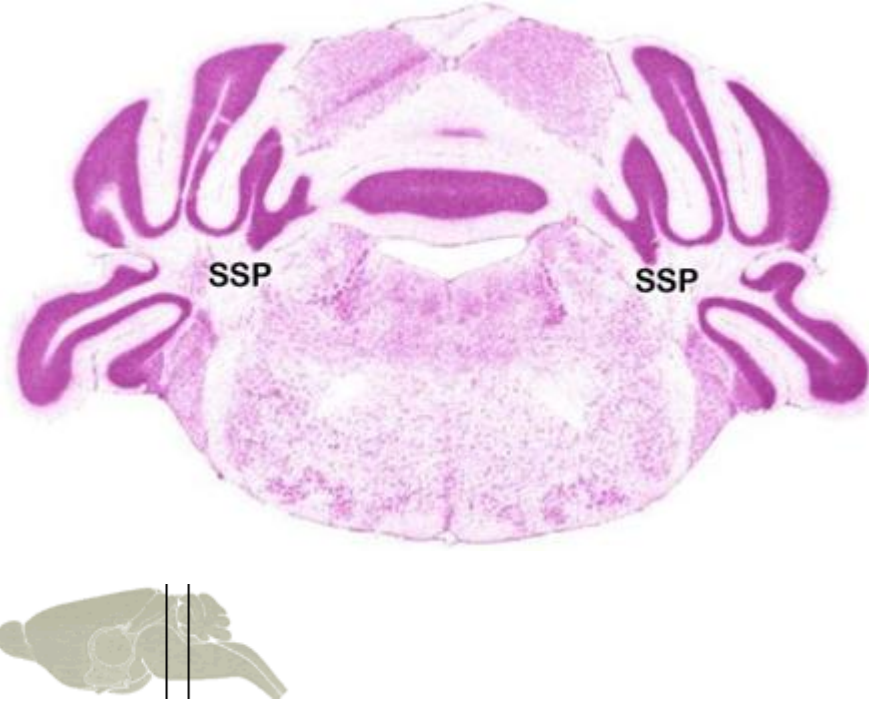
geçerek KK (Şekil 8), KA (Şekil 9) ve SSP (Şekil 10) bölgeleri açığa çıkacak şekilde beyin üç parçaya ayrıldı (Anonim). Trimlenen beyin örnekleri % 4'lük paraformaldehit ile +4 C° de 24 saat daha tespit edildikten sonra bir gün boyunca akarsu altında yıkandı ve alkol-ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Daha sonra Rotary (Leica, RM 2125) mikrotomda 6 µm kalınlığında kesitler alındı. Dokuların bir kısmı ise frozen kesit almak üzere ayrıldı. Frozen kesit alınacak dokular ise +4 C° de 24 saat post fikzasyondan sonra % 30'luk sukroz içerisinde 48 saat daha bekletildi. Bu süre sonunda dokulardan kryostat ile (Leica, CM 1510-1) yaklaşık 6 µm kalınlığında kesitler alınarak saklandı.



Şekil 8 Harvard Üniversitesi tarafından fareler için hazırlanmış beyin atlasına göre beyin 165. bölgesinden geçen kesitte KK'un görünümü (anonim)



Şekil 9. Harvard Üniversitesi tarafından C57BL/6 fareler için hazırlanmış beyin atlasına göre beyin 315. bölgesinden geçen kesitte KA'nın görünümü (anonim)



Şekil 10. Harvard Üniversitesi tarafından C57BL/6 fareler için hazırlanmış beyin atlasına göre beyin 446. bölgesinden geçen kesitte SSP'ün görünümü (anonim)

3.6. Luxol-Fast Blue Crsyl Violet Tekniği

Alınan tüm doku kesitlerine demyelinizasyon-remyelinizasyonu belirlemek amacıyla Luxol-Fast Blue (LFB) metodu ile miyelin boyası yapıldı. Kesitler ksilol'de deparafinize edilip, seri alkollerden geçirilerek dehidre edildikten sonra 56 C° ısıda, LFB solusyonu içerisinde bir gece bekletildi. Bu süre sonunda boyanın fazlasını gidermek amacı ile kesitler % 95'lik alkol içerisinde beş dakika bekletildikten sonra distile suya alındı. Boyanan kesitler farklılaştırmalarının sağlanması amacı ile 30 saniye (sn) lityum karbonat solusyonuna daldırıldı. Farklılaştırma işlemine % 70'lik alkolde 30 sn daha devam edilip, kesitler distile suya alındı. Bu işlemlerden sonra mikroskop altında gri maddenin ak maddeden keskin bir sınırla ayrıldığı gözleninceye kadar farklılaştırma işlemine devam edildi. Sonrasında kesitler distile suya alındı. Daha sonra cresyl-violet ile 30-40 sn. kadar çekirdek boyası yapıldı ve kesitler tekrar distile suya alındı. Bu işlemi takiben kesitler % 95'lik alkollerden 2 kere 5'er dk ve % 100'lük alkollerden geçirilip ksilende 2 kere 5'er dk daha bekletildikten sonra, Entellan (Merck) kullanılarak kapatıldı (Ashley ve ark., 2006). Sonuçların değerlendirilmesi Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu yardımıyla yapıldı ve gerekli görülen alanların Nikon, DS Camera Head DS-5M ile mikroskobik fotoğrafları çekildi.

3.7. İmmunohistokimyasal Boyama Tekniği

Parafinde hazırlanan doku bloklarından alınan kesitlere Tablo 2'de isimleri verilen proteinlerin varlığını belirlemek için strepto avidin biotin peroksidaz kompleks tekniği (SABK) uygulandı. Primer antikolar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) ile sulandırıldı (Tablo 2). İmmunohistokimyasal boyamalarda SABK teknik için alınan hazır kit (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) kullanıldı ve tüm uygulamalar önerilen standart prosedüre göre yapıldı Buna göre kesitler, aseton-3-etoksipropilamin (Merck, katalog no: 8.21619, 100 ml aseton, 2 ml 3-etoksipropilamin) ile kaplanmış lamlara alındı. 30 dakika 58 °C'lik etüvde kurutuldu. Kesitler ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için, kesitler sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga

fırında 600 watta 20 dakika kaynatıldı ya da % 0,1'lik sığır serum albümin-triton x100 karışımı (BSA, Sigma-Aldrich, A9418) damlatılarak 20 dakika bekletildi. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek üzere metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'te 7 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Daha sonra tablo 2'de gösterildiği gibi primer antikorlar ile +4 C° inkübe edildi. Primer antikorların üretici firmalarının önerileri doğrultusunda pozitif kontroller ile negatif kontrol olarak PBS (pH 7.4) kullanıldı. Yıkamayı takiben kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immount) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskopunda (Nikon, YS 100) incelendi.

Glial fibriler asidik protein, P450arom, 3βHSD ve NG2 ile immunohistokimyasal boyama yapılan kesitlerin değerlendirilmesi, her üç beyin bölgesinde de boyanan hücre stoplazması sayılarak yapıldı.

3.8. Triton x100 Solusyonunun Hazırlanması

100 ml PBS içerisine 0.1 gr BSA (Sigma A-4503) katılarak eritildi. Daha sonra üzerine 30 µl triton x100 (AMRESCO, 0694) eklenip karıştırıldı (Cell staining protocol).

Tablo 2. İmmunohistokimyasal boyamalar için çalışmada kullanılan antikorlar ve bu antikorların özellikleri

Antikor (Klon)	Antikor türü	Antijeni açığa çıkarma yöntemi	Sulandırma oranı	Üretici firma
MBP	Monoklonal	Sitrat tamponlu solusyonda Mikrodalga fırında 600watt 20 dk	1/100	Abcam (ab7349)
3 β HSD	Poliklonal	BSA 20 dk. Oda ısısında	1/3000	Abcam (ab65156)
P450arom	Poliklonal	BSA 20 dk. Oda ısısında	1/1000	Novus (AP00001PU- N)
GFAP	Poliklonal	Sitrat tamponlu solusyonda Mikrodalga fırında 600watt 20 dk	1/500	Abcam (ab7779)
NG2	Poliklonal	BSA 20 dk. Oda ısısında	1/1000	Abcam (ab81104)

3.9. Demyelinizasyonun Değerlendirilmesi

Luxol-Fast Blue ve MBP ile yapılan boyama sonuçlarına göre demyelinizasyon ve remyelinizasyon derecelerini belirlemek amacı ile 0 dan 3'e kadar iki patolog tarafından kör olarak skorlandı. 3, normal yem ile beslenen kontrol gruplarındaki miyelin miktarını, 2, hafif derecede demyelinizasyonu, 1, şiddetli ve 0 ise tam demyelinizasyonun şekillendiğini ifade etti (Peter ve ark., 2009).

3.10. Hücre Sayımı Metodu

Harvard Üniversitesi tarafından C57BL/6 fareler için hazırlanmış beyin atlasına göre KK, KA ve SSP bölgelerinden geçecek şekilde alınan kesitler immunohistokimyasal olarak GFAP, NG2, P450arom ve 3 β HSD antikoları ile boyandı ve Nikon, DS Camera Head DS-5M sistemi ile 20'lik objektifle adı geçen bölgelerin tümü fotoğraflandı. Elde edilen fotoğraflarda immunohistokimyasal olarak sitoplazması pozitif boyanan herbir hücre, her üç bölge için ayrı ayrı sayıldı.

3.11. İstatistiksel Analiz Metodu

Çalışmada gruplar arasındaki farklılıklar organlara göre tek yönlü varyans analizi tekniğine göre yapıldı. Gruplar arası farklılıklar DUNCAN çoklu karşılaştırma testi ile araştırıldı. Ayrıca, gruplar için tanıtıcı istatistikler Tablo 4'de özetlendi. Sonuçlar SAS, (2009) istatistik paket programı kullanılarak elde edildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Deneme gruplarındaki farelerde, kuprizonlu yem ile beslenmeye başlandıktan bir hafta sonra klinik bulgu olarak sadece durgunluk gözlemlendi. Deney süresince erken ölümlere rastlanmadı.

4.2. Makroskopik Bulgular

Kuprizonlu yem ile beslenmeye alınan farelerin MSS'de herhangi bir makroskopik bulgu gözlenmedi.

4.3. Histokimyasal Bulgular

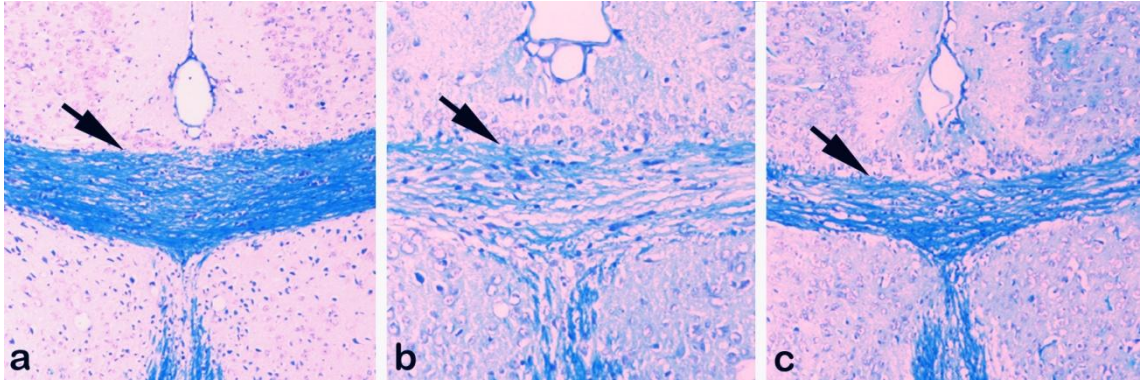
Çalışma grupları ile kontrol gruplarına ait KK, KA ve SSP bölgeleri, miyelin miktarını belirlemek amacı ile immunohistokimyasal olarak MBP antikoru ile ve histokimyasal olarak LFB ile boyandı. Değerlendirme semikalitatif olarak yapıldı. Her iki boyanma sonrasında aynı veriler elde edildi. LFB ile boyanma sonucu Tablo 3'te gösterilmiştir. Miyelin temel protein antikoru ile boyanma sonuçları Şekil 15 ve 16'da gösterilmiştir.

Tablo 3. LFB ve MBP ile boyanan grupların semikalitatif olarak ortalama değerleri

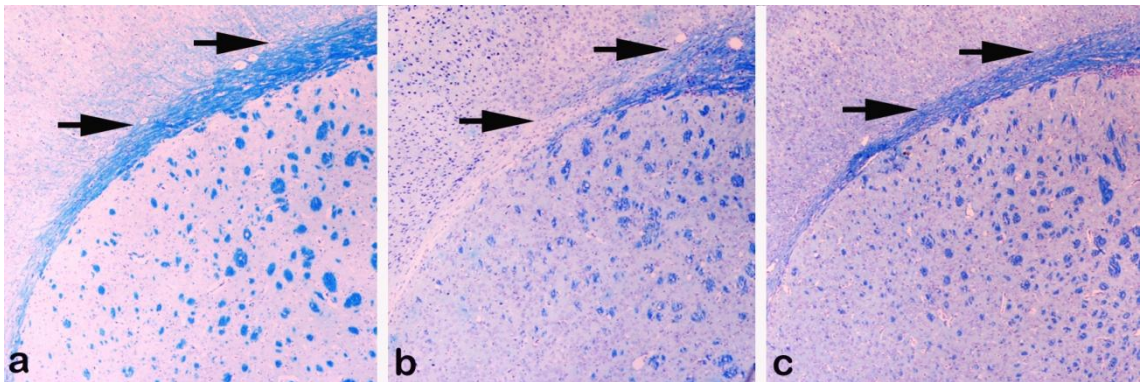
	Korpus Kallozum	Kornu Ammonis	Serebellar Süperior Pedünkül
Grup I ortalaması	1	0	1
Grup II ortalaması	2	2	2
Grup III (Kontrol) ortalaması	3	3	3

0=Tam demiyelinizasyon, 1=Şiddetli demiyelinizasyon, 2=Hafif demiyelinizasyon, 3=Tam miyelinizasyon

Kontrol grubundaki farelerin KK bölgesinde meydana gelen boyanma (Şekil 11 a, 12 a) ile kıyaslandığında I. deneme grubunda KK bölgesinde miyelin kaybının genel olarak hem orta hem de lateral bölgede daha şiddetli olduğu gözlenirken (olgu no: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) (Şekil 11 b, 12 b), 1 farede hafif olduğu dikkati çekti (olgu no: 2). II. deneme grunda ise miyelin kaybının 10 farede hafif derecede olduğu belirlenirken (olgu no: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12), 2 farede miyelin miktarının kontrollerin miyelin miktarı ile aynı olduğu (olgu no: 6, 10) gözlendi (Şekil 11 c, 12 c).

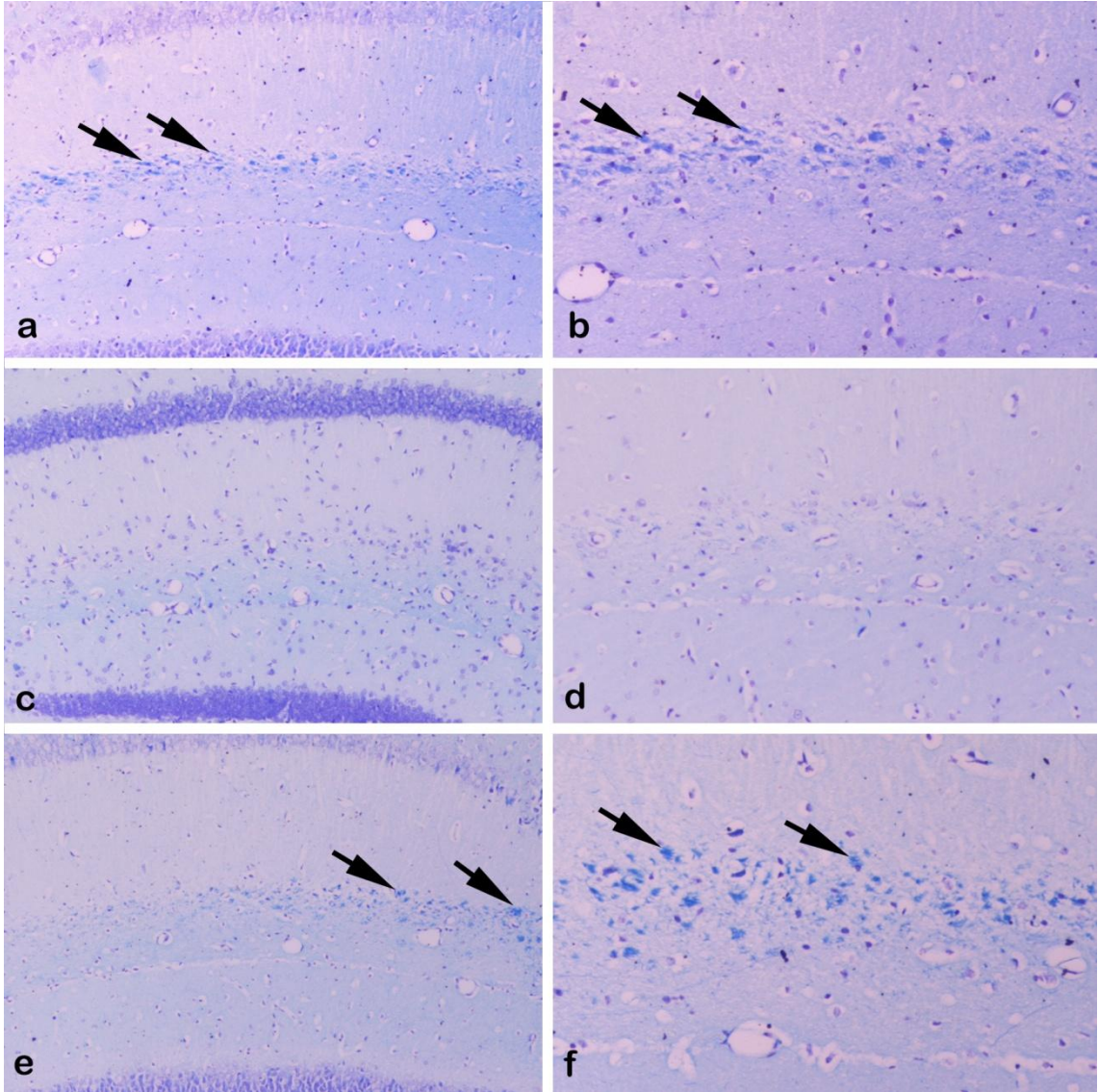


Şekil 11. KK'nın orta bölgesi **a:** LFB ile boyanan miyelin (ok), kontrol grubu, **b:** Kuprizonlu yem yedirilen farelerde KK'da şekillenen demiyelinize alanlar (ok), I. deneme grubu, **c:** KK'da demiyelinizasyonun ardından normal yeme geçildikten sonra miyelin kılıfın yeniden oluştuğu alanlar (ok), II. deneme grubu, LFB x4 objektif



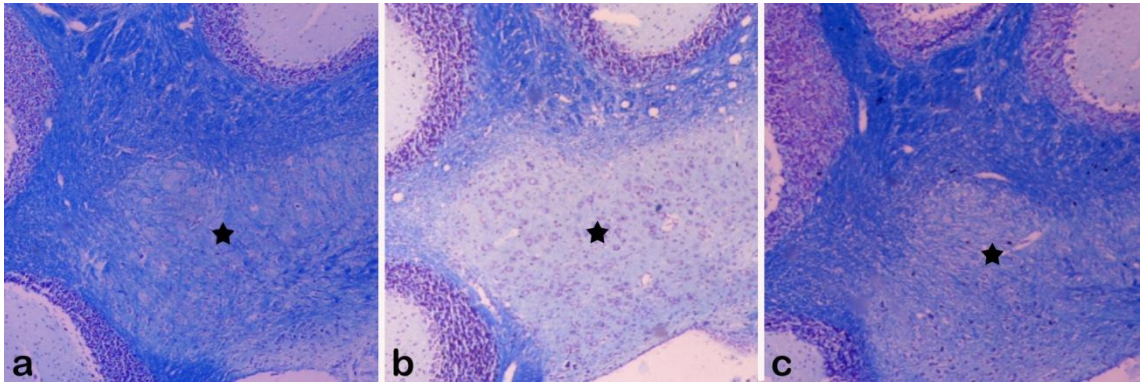
Şekil 12. KK'nın lateral bölgesi **a:** LFB ile boyanan miyelin (oklar), kontrol grubu, **b:** Kuprizonlu yem yedirilen farelerde KK'da şekillenen demiyelinize alanlar (oklar), I. deneme grubu, **c:** KK'da demiyelinizasyonun ardından normal yeme geçildikten sonra miyelin kılıfın yeniden oluştuğu alanlar (oklar), II. deneme grubu, LFB x4 objektif

Kornu ammonisin stratum lakunozum molekulare (SLM) katmanındaki boyanmalar kontrol grupları (Şekil 13 a, b) ile karşılaştırıldığında I. deneme grubunda 8 farede tam demiyelinizasyon meydana gelirken (olgu no: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10) (Şekil 13 c, d), 3 farede şiddetli (olgu no: 5, 6, 11), 1 farede ise hafif demiyelinizasyonun (Şekil 13 e, f) şekillendiği tespit edildi (olgu no: 12). II. deneme grubunda 10 farede hafif şiddette demiyelinizasyon gözlenirken (olgu no: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12), 2 farede şiddetli derecede (olgu no: 10, 11) demiyelinizasyonun olduğu gözlemlendi.



Şekil 13. KA'de LFB boyamaları, **a ve b:** LFB ile boyanan miyelinize alanlar (oklar), kontrol grubu, **c ve d:** Kuprizonlu yem ile beslenen farelerde KA'da oluşan demiyelinize alanlar, I. deneme grubu, **e ve f:** Normal yeme geçtikten sonra tekrar şekillenen miyel (oklar), II. deneme grubu, LFB, a, c, e x10 objektif ve b, d, f x20 objektif

Kontrol grubundaki fareler (Şekil 14 a) ile kıyaslandığında I. deneme grubunun SSP'ünde 3 adet farede tam (olgu no: 4, 6, 8), 7 farede şiddetli (olgu no: 1, 2, 3, 5, 10, 11, 12), 2 adet farede ise (olgu no: 7, 9) hafif derecede demiyelinizasyonun meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 14 b). II. deneme grubunda 1 adet farede şiddetli (olgu no: 12), 9 adet farede hafif şiddette (olgu no: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10) demiyelinizasyon şekillenirken, 2 adet faredeki miyelin miktarı kontrol grupları ile aynı bulundu (olgu no: 4, 11) (Şekil 14 c).



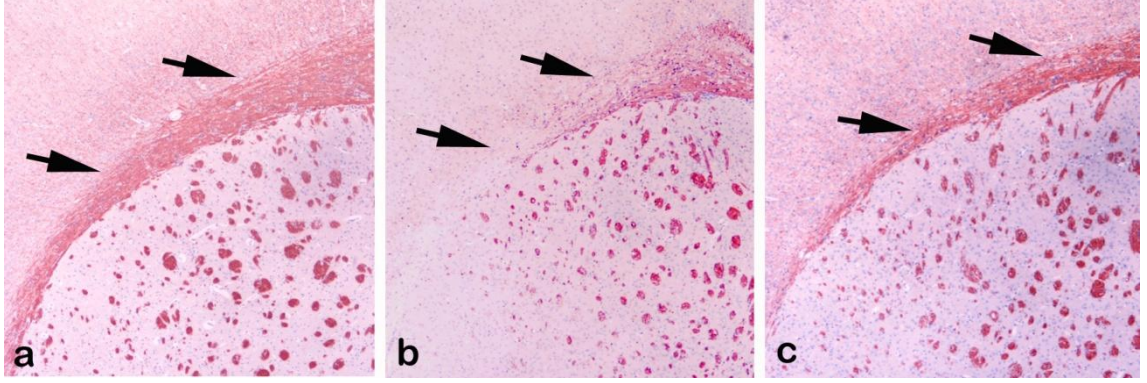
Şekil 14. SSP'de LFB boyamaları, **a:** Kontrol grubundaki yoğun miyelinize alanlar (yıldız), **b:** Kuprizonlu yem ile beslenen farelerde oluşan demiyelinizasyon (yıldız), I. deneme grubu, **c:** II. deneme grubunda remiyelinizasyon alanları (yıldız), LFB, x4 objektif

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.4.1 Miyelin Temel Protein

Miyelin temel protein antikoruna ile boyanan çalışma grupları ile kontrol gruplarına ait KK, KA ve SSP bölgelerinin incelemesi semikalitatif olarak yapıldı ve sonuçlar Tablo 3'te değerlendirildi.

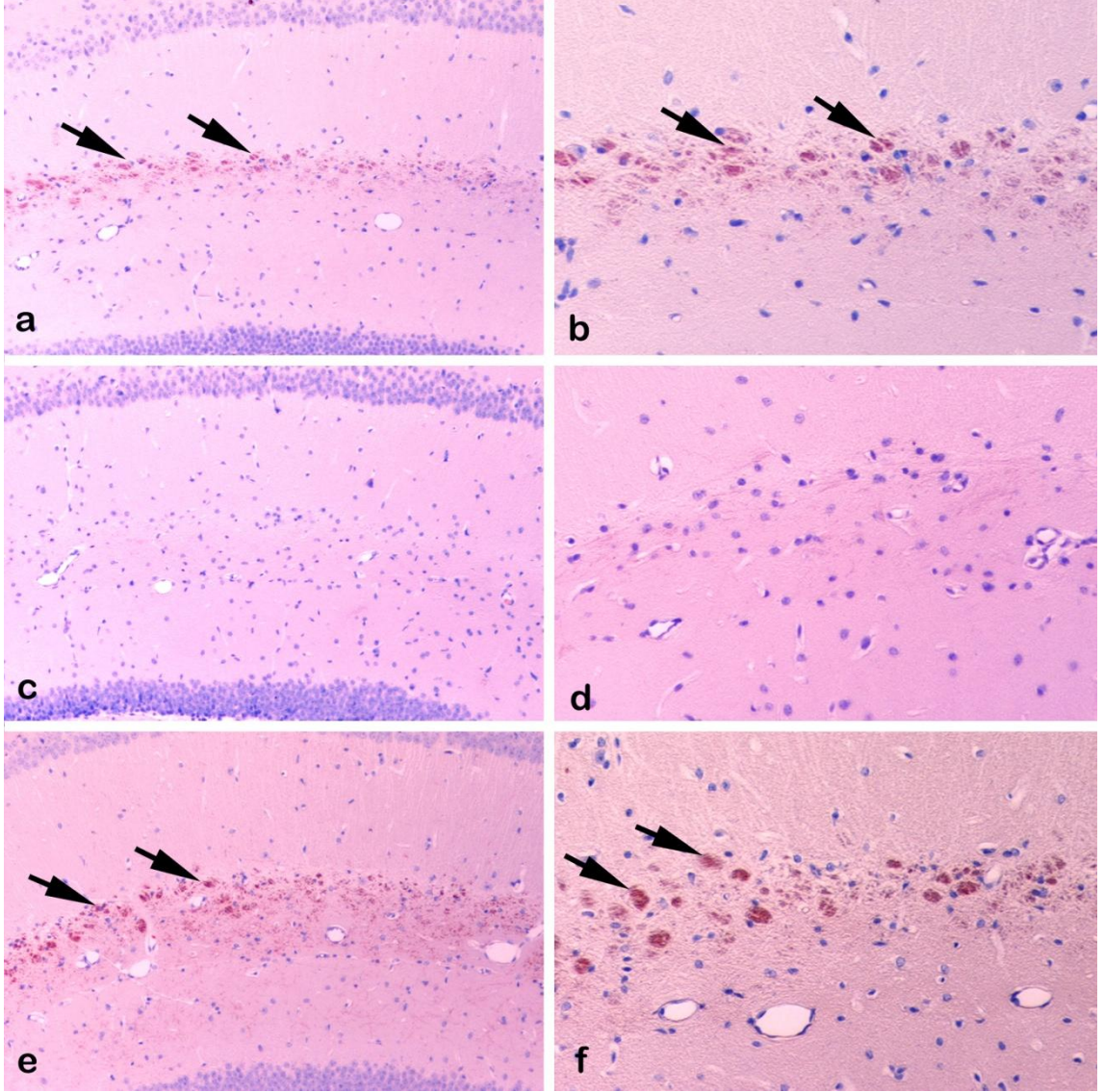
KK bölgesinde yapılan immunohistokimyasal boyamada kontroller ile karşılaştırıldığında demiyelinizasyon grubunda (grup I) şiddetli miyelin kaybının olduğu gözlemlendi. Remiyelinizasyon grubunda ise (II. deneme grubu) boyanmanın I. deneme grubuna oranla fazla, fakat kontrol gruplarından daha az yoğunlukta olduğu dikkati çekti (Şekil 15).



Şekil 15. KK'daki MBP İmmunopozitifliği, KK, **a:** Şiddetli MBP immunopozitif alanlar (oklar), kontrol grubu, **b:** KK'da oluşan demiyelinize alanlar (oklar), I. deneme grubu, **c:** Kuprizon ile oluşan demiyelinizasyonun ardından normal yeme geçtikten sonra KK bölgesinde MBP immunopozitifliği (oklar), II. deneme grubu SABK metod/AEC, x4 objektif

KA bölgesinde SLM'de yapılan immunohistokimyasal boyamalarda kontrol gruplarında miyelin kılıflarda yoğun bir boyanma gözlenirken, demiyelinizasyon grubunda (grup I) bu bölgede herhangi bir boyanma meydana gelmedi. II. grupta ise kontrollere yakın yoğunlukta bir boyanma gözlemlendi (Şekil 16).

SSP bölgesinde ise kontrol gruplarında yoğun şekilde bir boyanma elde edilirken, I. deneme grubunda şiddetli demiyelinizasyonu işaret eden çok az miktarda miyelin boyanması gerçekleşti. Remiyelinizasyon grubunda (II. deneme grubu) ise, kontrollere yakın bir boyanmanın meydana geldiği belirlendi.



Şekil 16. KA'de MBP immunopozitifliği **a ve b**: SLM'deki MBP immunopozitif alanlar (oklar), kontrol grubu, **c ve d**: SLM'de tam demiyelinizasyon şekillenen bölgedeki MBP immunonegatif alanlar, I. deneme grubu,, **e ve f**: SLM'de tekrar şekillenen miyelin kılıfta meydana gelen MBP immunopozitif alanlar (oklar), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x10 objektif ve b, d, f x20 objektif

4.4.2. Glial Fibriler Asidik Protein

Deneme ve kontrol gruplarındaki farelerin KK, KA ve SSP bölgelerinde GFAP antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda elde edilen bulguların semikalitatif değerleri ve istatistiksel farklılıklarını ortaya koyan sonuçlar Tablo 4'te gösterilmektedir.

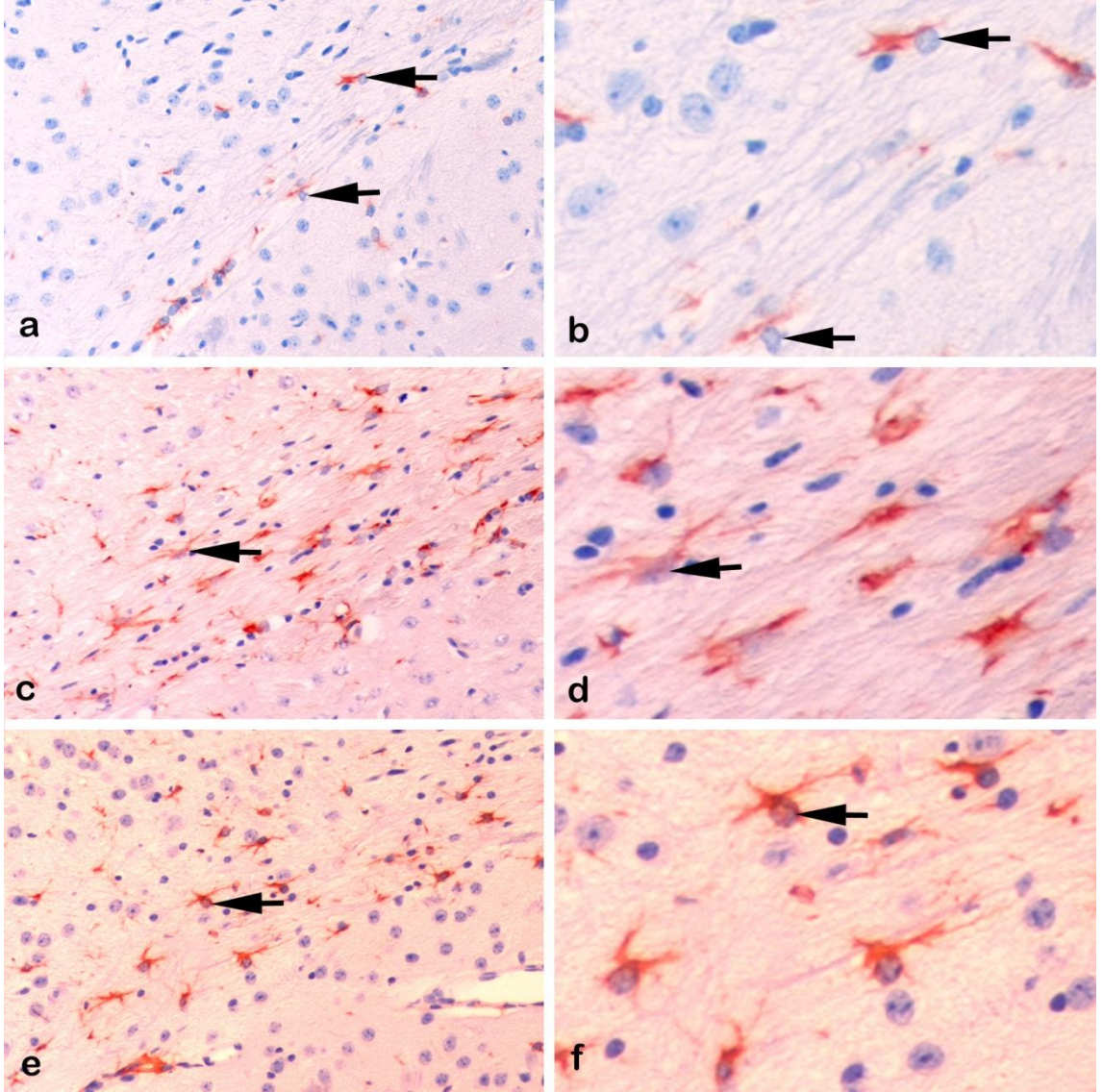
Glial fibriler asidik protein antikoruna ile yapılan boyamada sitoplazmik, homojen tarzda bir boyanma elde edildi. Kontrol gruplarında KK bölgesinde çok az sayıda kısa çıkıntılara sahip GFAP pozitif astrositler belirlendi (Şekil 17 a, b). I. deneme grubunun KK bölgesinde ise GFAP pozitif hücre sayısının kontrol grubu ile kıyaslandığında oldukça artmış olduğu belirlendi (Şekil 17 c, d). Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). Bununla birlikte I. deneme grubunda GFAP antikoruna ile immunopozitif boyanan astrositler, kontrol grubundaki GFAP pozitif olarak boyanan astrositlere oranla hipertrofik ve daha uzun çıkıntılara sahiptiler. II. deneme grubunda ise, GFAP pozitif astrosit sayısı kontrollere göre anlamlı derecede artmış olmakla birlikte, I. deneme grubu ile kıyaslandığında daha az sayıda olduğu belirlendi ($P<0.01$) (Şekil 17 e, f).

Kornu ammonisin SLM bölgesinde GFAP antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar sitoplazmik ve homojen karakterde gerçekleşti. Kontrol grubunda bölgede az sayıda GFAP pozitif astrosit tespit edildi (Şekil 18 a, b). I. deneme grubunda ise şiddetli astrogliozisin meydana geldiği ve buradaki astrositlerin de kontrollere oranla hipertrofik ve daha uzun çıkıntılara sahip oldukları dikkati çekti (Şekil 18 c, d). Remiyelinizasyon grubunda kontrollere kıyasla daha fazla sayıda GFAP pozitif astrosit (Şekil 18 e, f) tespit edilirken, bu gruptaki pozitif hücrelerin I. deneme grubundan daha az sayıda olduğu belirlendi. Yapılan değerlendirme sonucunda tüm gruplarda KA'de GFAP pozitif boyanan hücre sayısı arasındaki bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($P<0.01$).

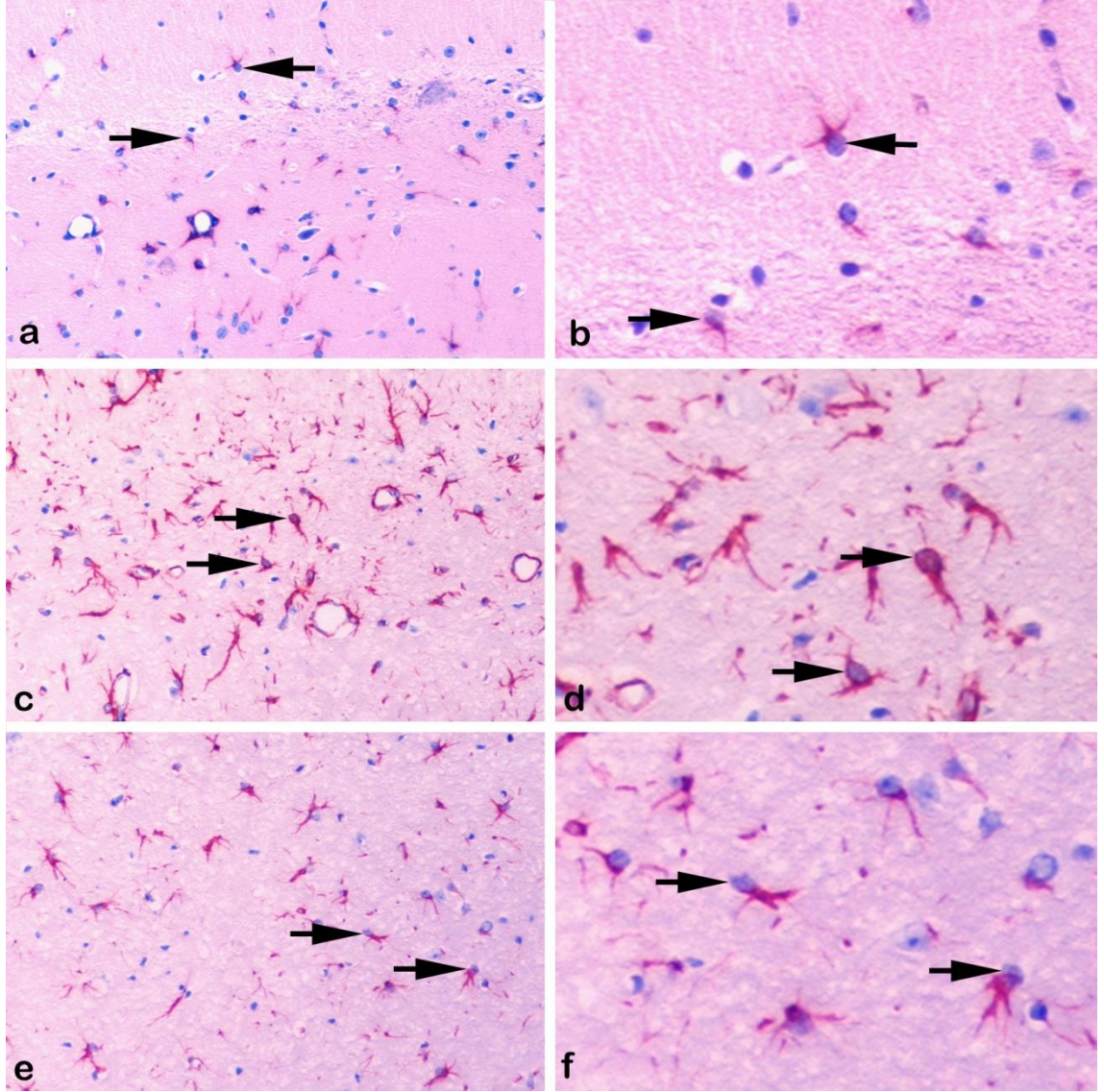
Tablo 4. KK, KA ve SSP’de yapılan immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel değerleri

Organlar	Çalışma Grupları	GFAP	P450arom	3βHSD	NG2
KK	I. Deneme Grubu	166.16±10.37 a	33.91±2.06 a	25.33±2.00 a	42.50±17.0 a
	II. Deneme Grubu	84.75±4.42 b	13.41±1.47 b	9.66±1.32 b	18.50±1.89 b
	Kontrol Grubu	23.00±1.86 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	10.25±0.75 c
KA	I. Deneme Grubu	79.9± 4.4 a	8.71±0.60 a	11.16±0.94 a	-
	II. Deneme Grubu	39.7±4.8 b	4.4±0.64 b	5.00±0.73 b	-
	Kontrol Grubu	15.7±1.38 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	-
SSP	I. Deneme Grubu	87.25±4.85 a	13.00±1.23 a	15.42±1.34 a	47.00±7.31 a
	II. Deneme Grubu	29.25±2.54 b	6.87±0.83 b	6.57±1.46 b	21.60±5.36 b
	Kontrol Grubu	13.75±1.23 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	13.00±2.12 c

a, b, c, farklı harfi taşıyan sütunlarda grup ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.01), (Değerler median cinsten elde edilen ortalama değerlerdir)

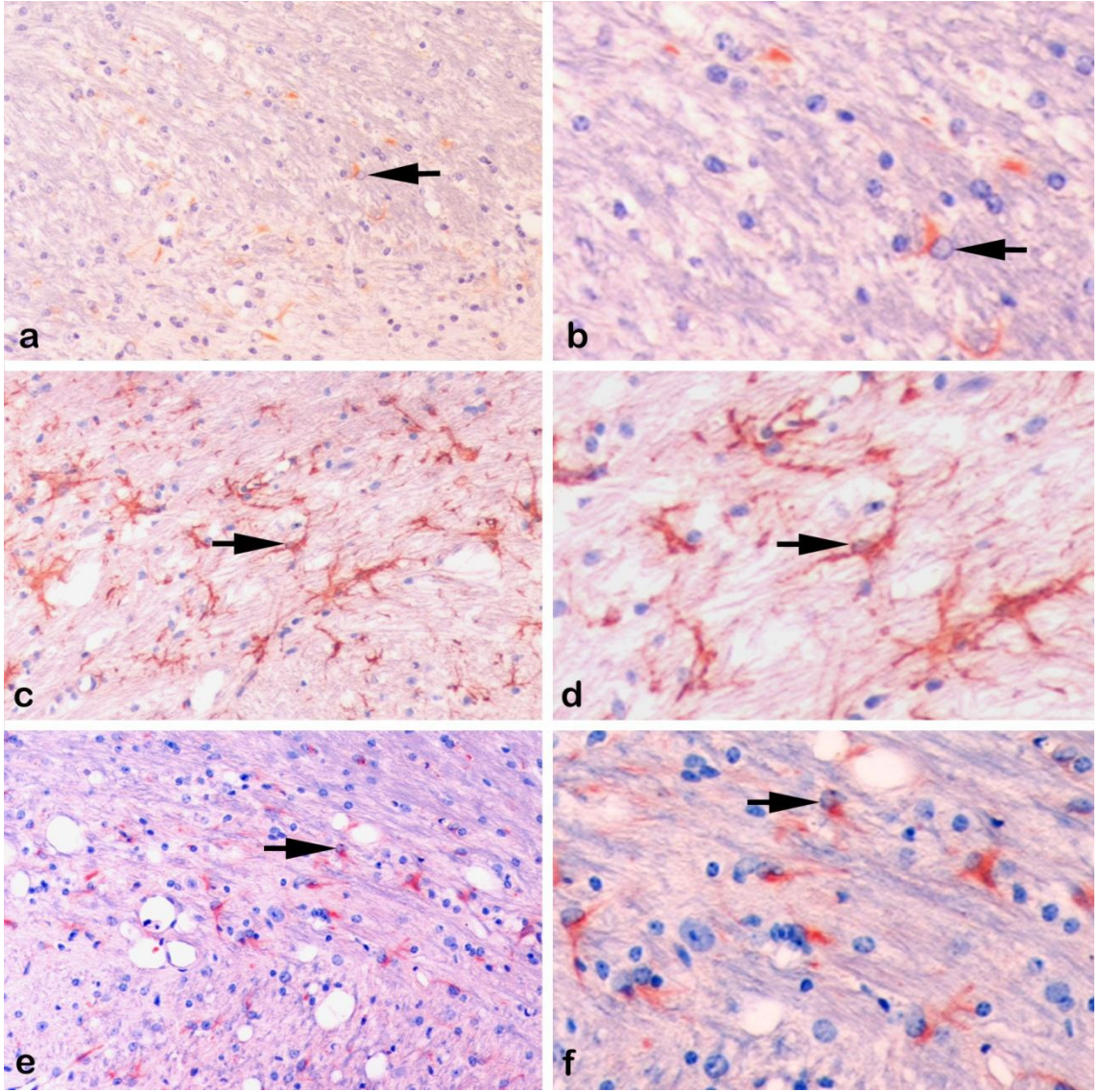


Şekil 17. KK'da GFAP immun boyanmaları, **a ve b:** GFAP immunopozitif astrositler (oklar), kontrol grubu, **c ve d:** Kuprizonlu yem ile beslenme sonucunda KK bölgesinde oluşan astrogliazis ve hipertrofik GFAP pozitif astrositler (ok), I. deneme grubu, **e ve f:** Kuprizonlu yem verilmesi kesildikten sonra remiyelinizasyon gerçekleşen KK bölgesindeki sayısı tekrar azalmaya başlayan GFAP pozitif astrositler (ok), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 objektif ve b, d, f x40 objektif



Şekil 18. KA'da GFAP immun boyanmaları, **a ve b:** Az sayıda GFAP pozitif astrositler (oklar), kontrol grubu, **c ve d:** Kuprizonlu yem ile beslenme sonucunda bölgede oluşan astrogliazis ve hipertrofik GFAP pozitif astrositler (oklar), I. deneme grubu, **e ve f:** Kuprizonlu yem verilmesi kesildikten sonra remiyelinizasyon gerçekleşen bölgede GFAP pozitif astrositler (oklar), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 objektif ve b, d, f x40 objektif

Serebellar süperior pedünkül bölgesinde GFAP antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyamada homojen ve sitoplazmik bir boyanma elde edildi. Kontrol grubunda diğer bölgelerde olduğu gibi çok az sayıda GFAP pozitif astrosit tespit edilirken, I. deneme grubunda yine çok şiddetli boyanan belirgin bir astrositoz olduğu dikkati çekti (Şekil 19 a-d). II. deneme grubunda orta şiddette astrositoz varlığı göze çarptı (Şekil 19 e, f). Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıydı ($P < 0.01$).



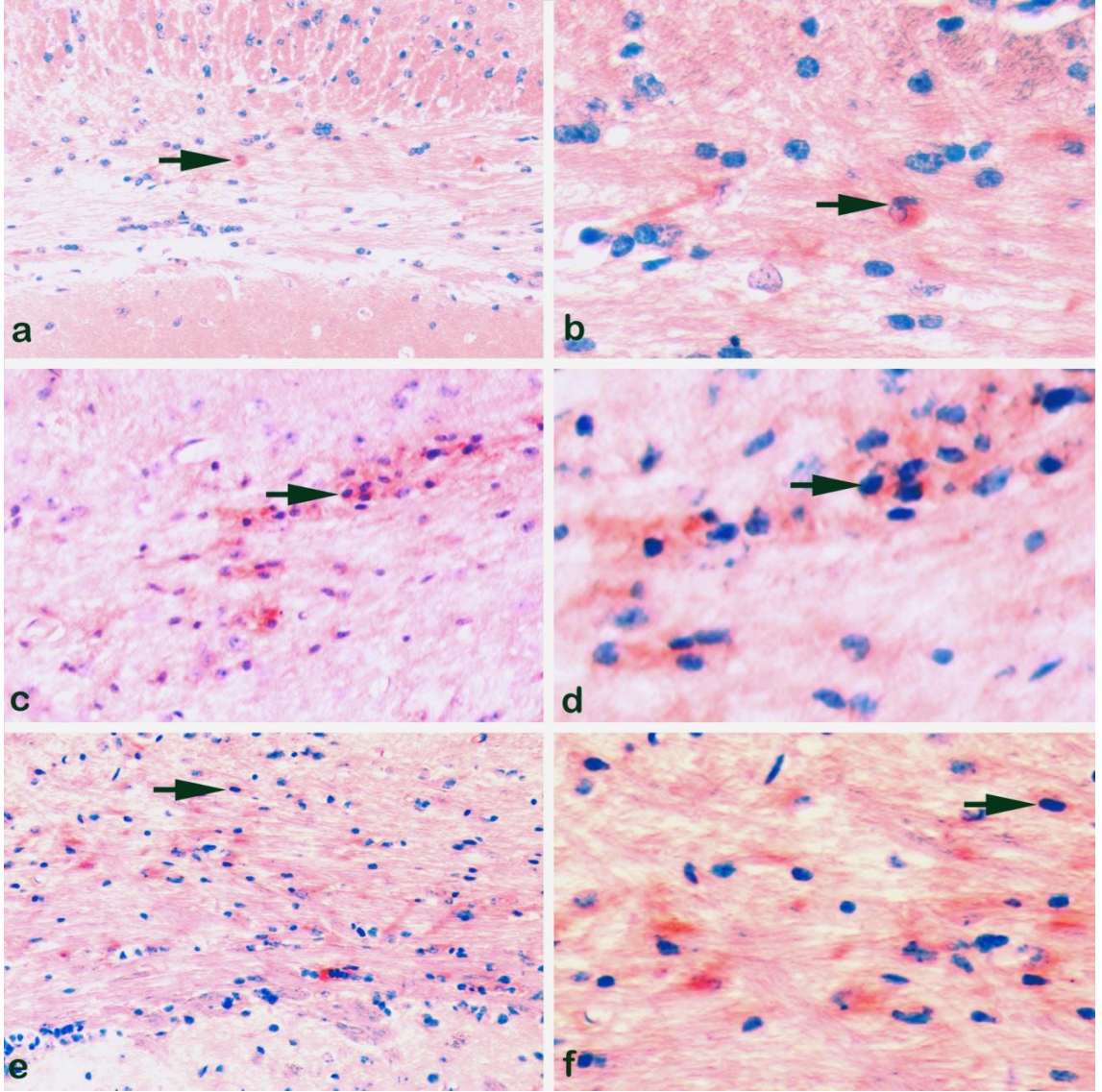
Şekil 19. SSP'de GFAP immün boyanmaları, **a ve b:** Az sayıda GFAP pozitif astrositler (ok), kontrol grubu, **c ve d:** Kuprizonlu yem ile beslenen grupta şekillenen astrositozis ve GFAP pozitif astrositler (ok), I. deneme grubu, **e ve f:** Kuprizonlu yem verilmesi kesildikten sonra remiyelinizasyon oluşan bölgede orta derecede astrositozis ve GFAP pozitif hücreler (ok), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 objektif ve b, d, f x40 objektif

4.4.3. NG2 Kondroitin Sülfat

Deneme ve kontrol gruplarındaki farelerin KK ve SSP bölgelerine ait NG2 antikoruna ile yapılan boyama sonuçlarının semikalitatif değerleri ve istatistiksel farklılıklarını ortaya koyan sonuçlar Tablo 4'te özetlenmektedir.

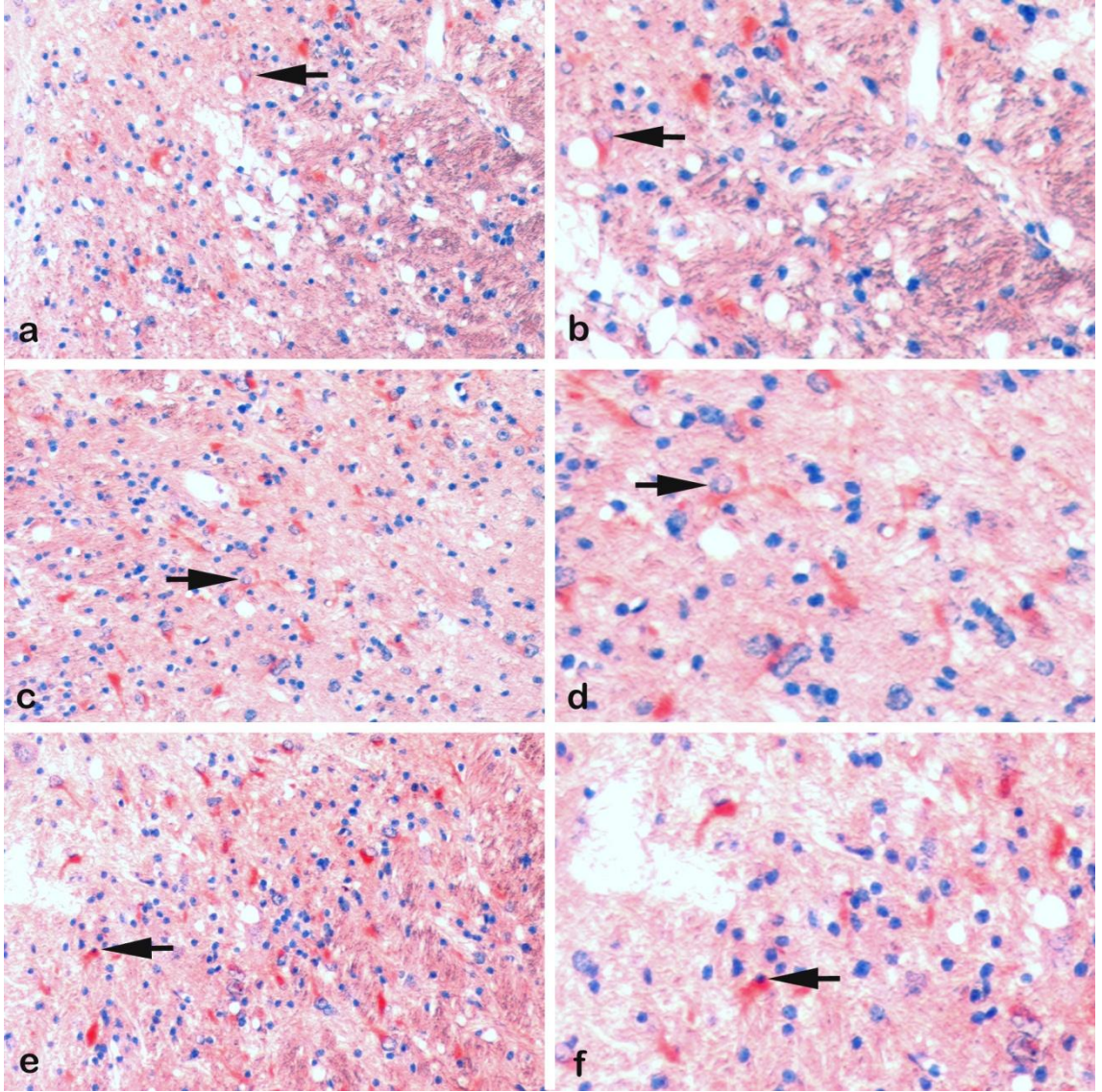
NG2 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamada homojen sitoplazmik bir reaksiyon elde edildi. Kontrol gruplarındaki hayvanların KK'da az sayıda pozitif hücelere rastlanırken, I. deneme grubunda bu hücelerde belirgin bir artış gözlemlendi (Şekil 20 a-d). II. deneme grubundaki farelerin KK'da ise yoğun fakat I. deneme grubu ile kıyaslandığında daha az sayıda pozitif hücre belirlendi (Şekil 20 d, e). Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.01$).

Serebellar süperior pedünkül bölgesinde NG2 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamada kontrol gruplarında az sayıda pozitif hücreye rastlandı (Şekil 21 a, b). I. deneme grubunda meydana gelen boyanmada, pozitif hücre sayısı kontrollere göre oldukça artmıştı ($P<0.01$) (Şekil 21 c, d). II. deneme grubunda ise kontrollerde boyanan pozitif hücelerden daha fazla fakat I. deneme grubundan daha az sayıda pozitif hücre mevcuttu ($P<0.01$) (Şekil 21 d, e).



Şekil 20. KK'da NG2 immun boyanmaları, **a ve b:** Az sayıda NG2 pozitif hücreler (ok), kontrol grubu, **c ve d:** Kuprizonlu yem verilen demiyelinizasyon grubundaki sayısı artmış NG2 immunopozitif hücreler (ok), I. deneme grubu, **e ve f:** Remiyelinizasyon grubunda NG2 immunopozitif hücreler (ok), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 objektif ve b, d, f x40 objektif

Kornu ammonis bölgesinde NG2 antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda her üç grupta da herhangi bir boyanma elde edilemedi.

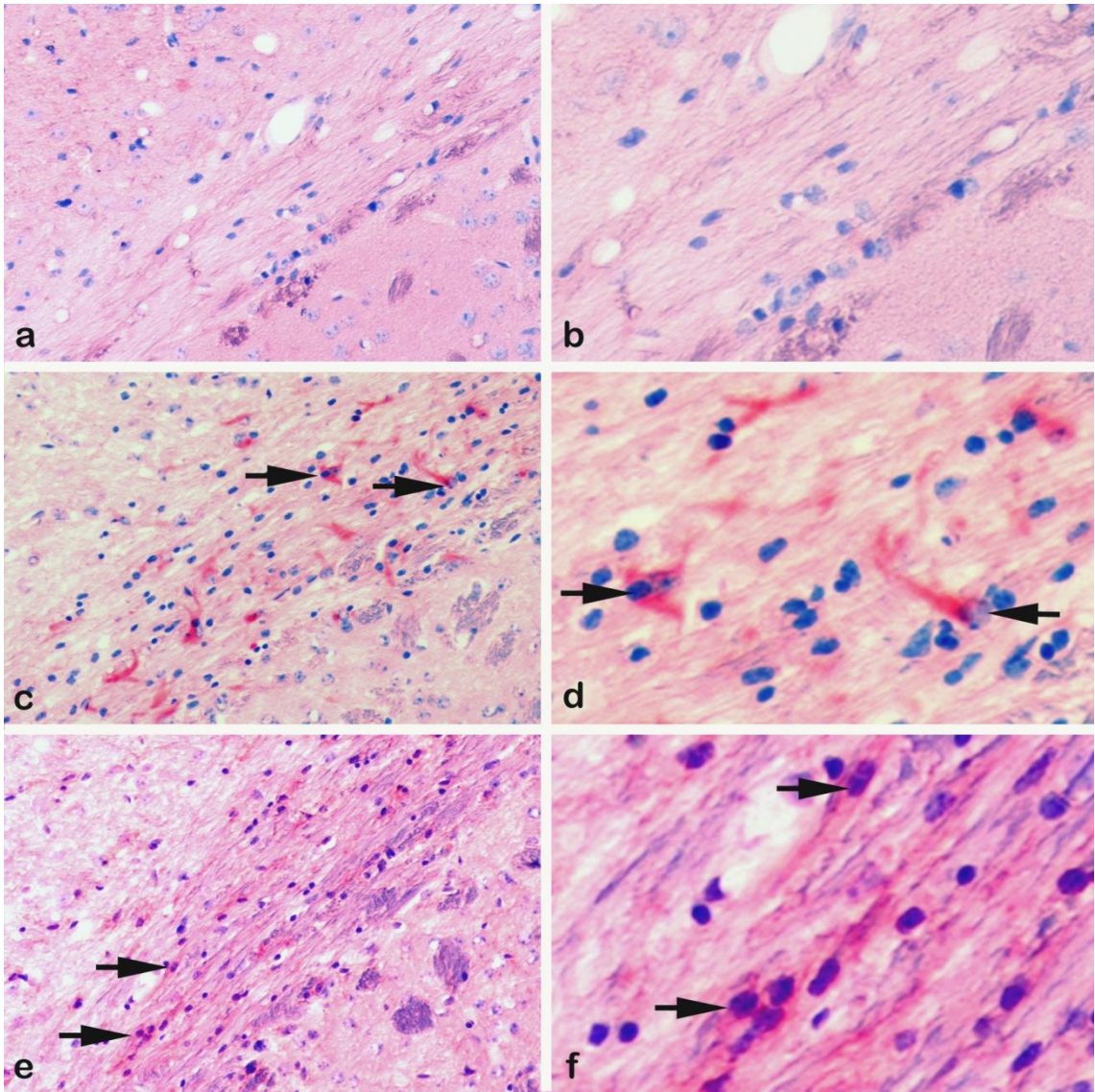


Şekil 21. SSP'de NG2 immün boyanmaları, **a ve b:** Az sayıda NG2 pozitif hücreler (ok), kontrol grubu, **c ve d:** Kuprizonlu yem verilen demiyelinizasyon grubunda demiyelinizasyon alanında sayısı artmış olan NG2 pozitif hücreler (ok), I. deneme grubu, **e ve f:** Remiyelinizasyon oluşturulan gruptaki NG2 pozitif hücreler (ok), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 objektif ve b, d, f x40 objektif

4.4.4. Aromataz

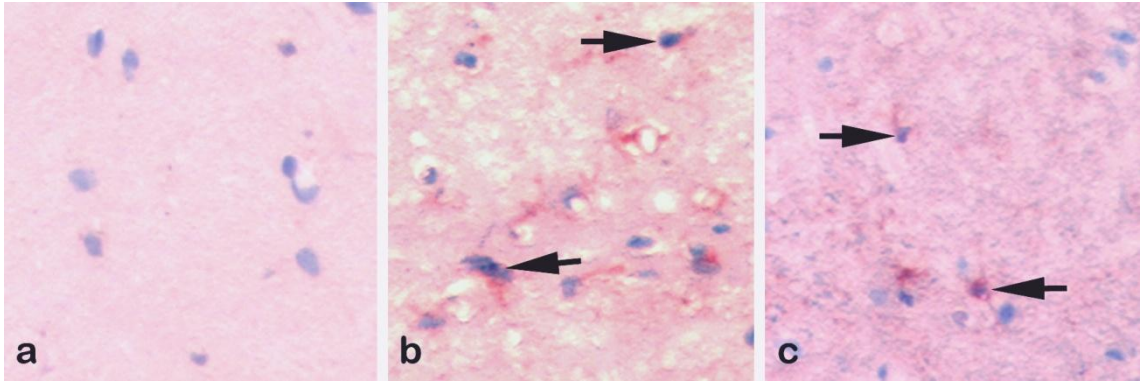
Deneme ve kontrol gruplarındaki farelerin KK, KA ve SSP bölgelerine ait P450arom antikoru ile yapılan immün boyama sonucunda elde edilen bulguların semikalitatif değerleri ve istatistiksel farklılıklarını ortaya koyan sonuçlar Tablo 4'te gösterilmektedir.

Aromataz antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyanmada sitoplazmik ve homojen yapıda bir boyanma elde edildi. Kontrol gruplarında KK bölgesinde herhangi bir boyanmaya rastlanmadı (Şekil 22 a, b). I. deneme grubunda yapılan boyamada KK'da yoğun bir şekilde boyanma gözlenirken, II. deneme grubunda I. deneme grubuyla kıyaslandığında daha az sayıda glial boyanma dikkati çekti ($P<0.01$) (Şekil 22 e, f).



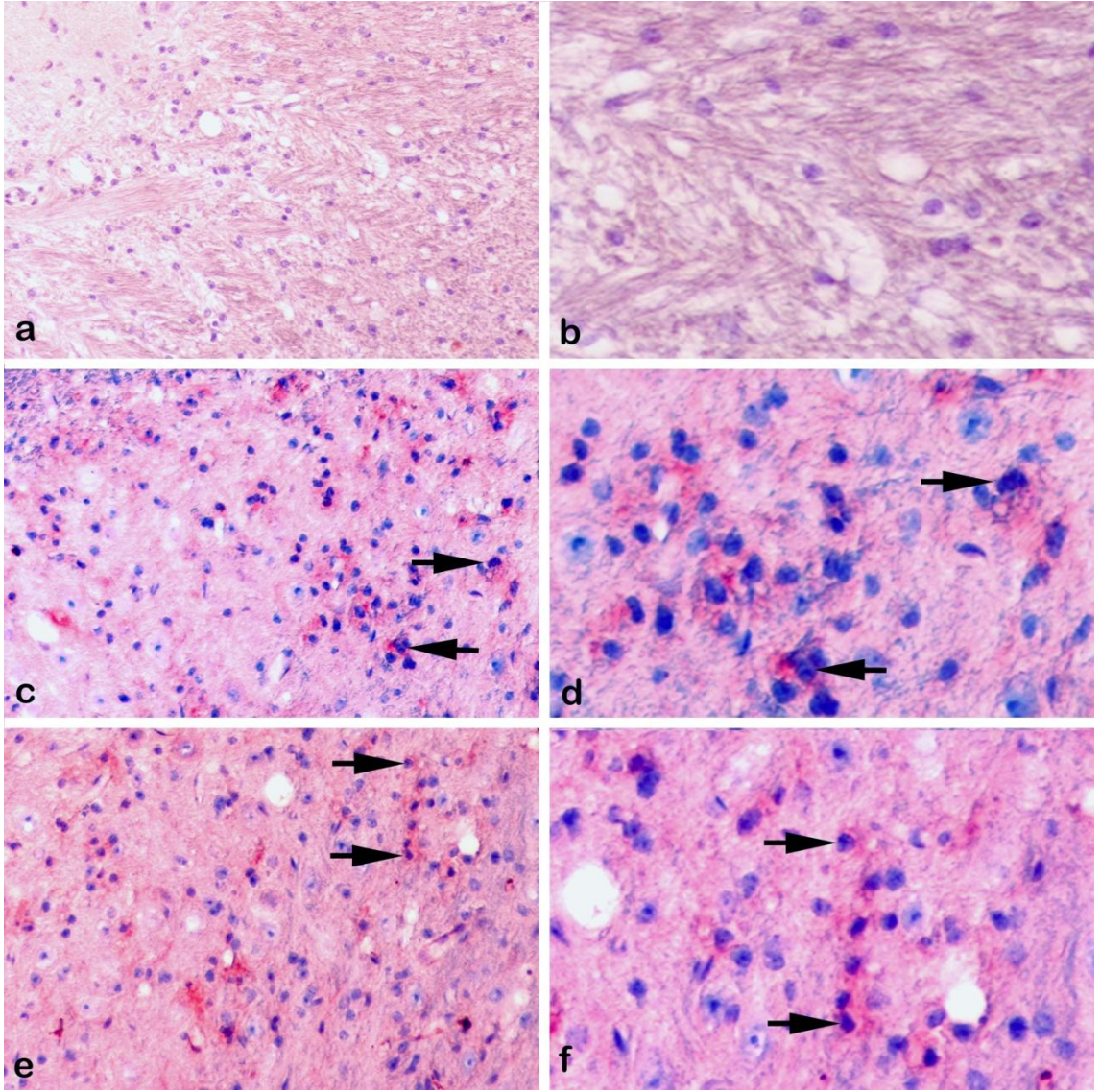
Şekil 22. KK'da P450arom immun boyanmaları, **a ve b:** P450arom negatif alan, kontrol grubu, **c ve d:** P450arom pozitif glia hücreleri (oklar), I. deneme grubu, **e ve f:** Kuprizonlu yem verilmesi kesildikten sonra remiyelinizasyon gerçekleşen KK bölgesindeki P450arom immunopozitif glialar (oklar), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 objektif ve b, d, f x40 objektif

Aromataz antikoruna ile KA bölgesinde yapılan immunohistokimyasal boyamada kontrol grupları hariç (Şekil 23 a) diğer iki grupta da pozitif boyanmalar elde edildi. I. deneme grubunda orta derecede bir boyanmaya rastlanırken (Şekil 23 b), bu oranın II. deneme grubunda azaldığı gözlemlendi (Şekil 23 c). I. ve II. deneme grupları arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.01$).



Şekil 23. KA'da P450arom immün boyanmaları, **a:** P450arom negatif alan, kontrol grubu, **b:** P450arom pozitif glia hücreleri (oklar), I. deneme grubu, **c:** P450arom immunopozitif glia hücreleri (oklar), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x40 objektif

Serebellumda SSP bölgesinde P450arom antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyamada homojen ve sitoplazmik bir boyanma meydana geldi. Kontrol gruplarında bu bölgede de herhangi bir pozitif boyanma şekillenmedi (Şekil 24 a, b). I. deneme grubunda orta derecede bir boyanma elde edildi (Şekil 24 c, d). II. deneme grubunda P450arom immunopozitif glia hücreleri mevcuttu, fakat pozitif boyanan bu hücre sayılarının I. deneme grubuna oranla azaldığı saptandı ($P < 0.01$) (Şekil 24 e, f).

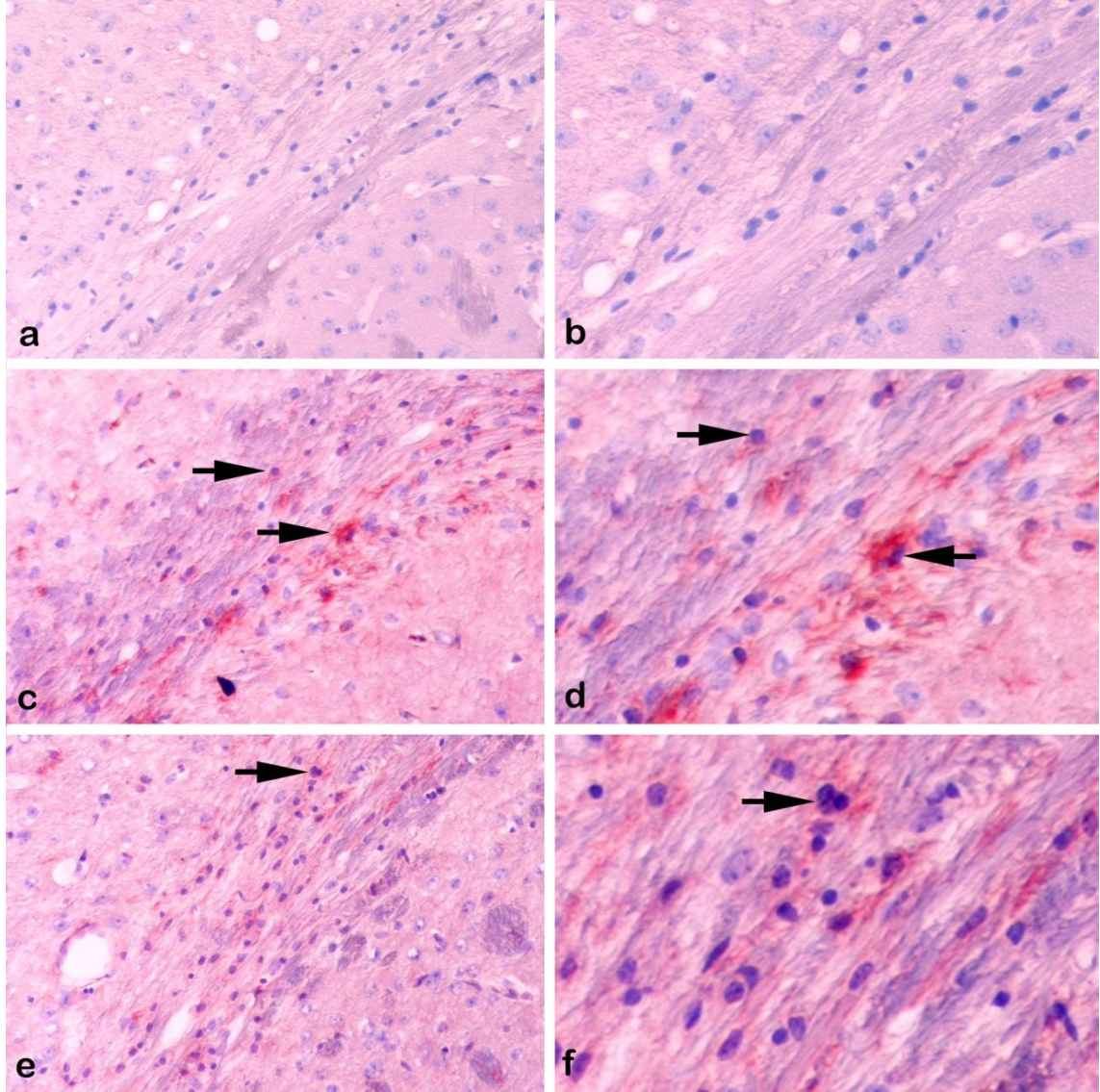


Şekil 24. SSP’de, P450arom immun boyanmaları, **a ve b:** P450arom immunonegatif alan, kontrol grubu, **c ve d:** P450arom pozitif glia hücreleri (oklar), I. deneme grubu, **e ve f:** Kuprizon verilmesi kesildikten sonra remiyelinizasyon gerçekleşen SSP bölgesindeki P450arom pozitif glialar (oklar), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 ve b, d, f x40 objektif

4.4.5. 3 Beta-Hidroksi Steroid Dehidrojenaz

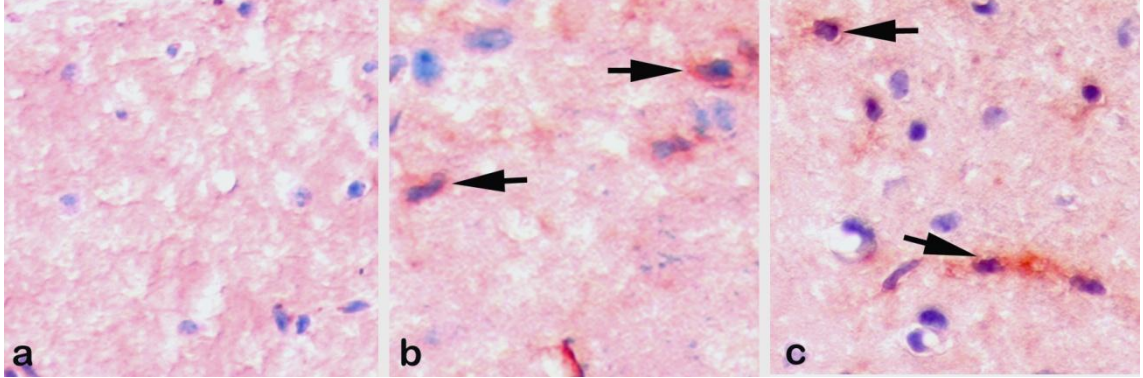
Deneme ve kontrol gruplarındaki farelerin KK, KA ve SSP bölgelerine ait 3 β HSD antikoru ile yapılan boyama sonucundan elde edilen bulguların semikalitatif değerleri ve istatistiksel farklılıklarını ortaya koyan sonuçlar Tablo 4’te gösterilmektedir.

Kontrol hayvanların KK bölgesinde herhangi bir boyanma elde edilemezken, I. deneme grubunda orta şiddette bir boyanmanın meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 24 a-d). Ancak, bu boyanma şiddetinin II. deneme grubu olan remiyelinizasyon grubunda azaldığı dikkati çekti (Şekil 24 e, f). Bu iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.01$).



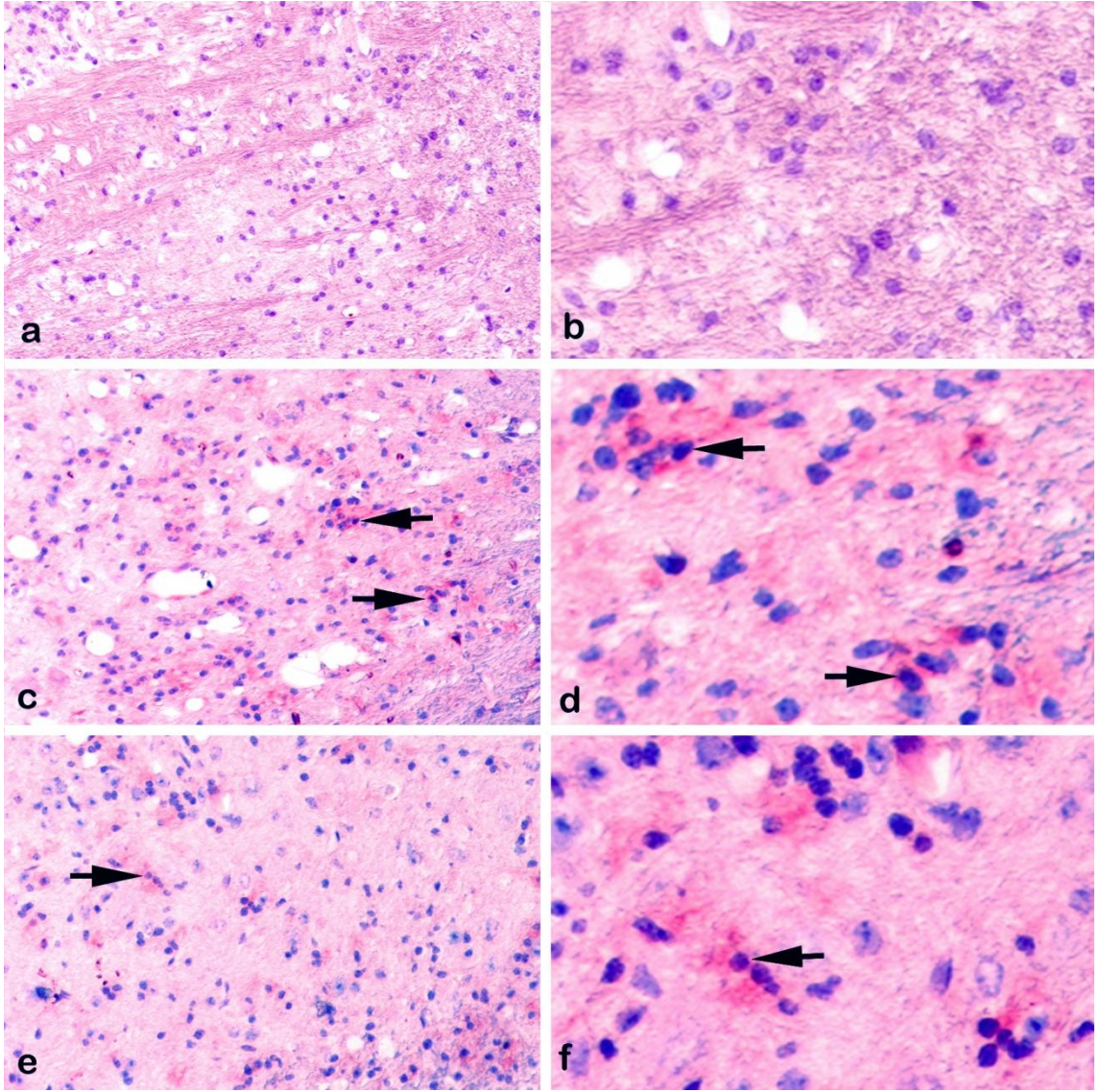
Şekil 25. KK'da 3βHSD immün boyanmaları, **a ve b**: 3βHSD immunonegatif alan, kontrol grubu, **c ve d**: 3βHSD pozitif glia hücreleri (oklar), I. deneme grubu, **e ve f**: Kuprizonlu yem verilmesi kesildikten sonra remiyelinizasyon gerçekleşen KK bölgesindeki 3βHSD pozitif glialar (ok), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 ve b, d, f x40 objektif

Kontrol gruplarında KA bölgesinin SML katmanında 3 β HSD antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamada herhangi bir immunopozitif boyanmaya rastlanmadı (Şekil 26 a). I. deneme grubu olan demiyelinizasyon grubunda orta şiddette bir boyanma elde edilirken, remiyelinizasyon grubunda (II. deneme grubu) ise I. deneme grubundan daha az sayıda hücrenin boyandığı saptandı (P<0.01) (Şekil 26 b, c).



Şekil 26. KA'de, 3 β HSD immun boyanmaları, **a:** 3 β HSD immunonegatif alan, kontrol grubu, **b:** 3 β HSD immunopozitif glia hücreleri (oklar), I.deneme grubu. **c:** 3 β HSD pozitif glia hücreleri (oklar), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x40 objektif

SSP bölgesinde 3 β HSD antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamada kontrol gruplarında herhangi bir immunopozitif boyanmaya rastlanmadı (Şekil 27 a, b). I. deneme grubunda immunopozitif boyanmanın meydana geldiği, II. deneme grubunda ise boyanan hücre sayısının anlamlı derecede azaldığı saptandı (P<0.01) (Şekil 27 c-f).



Şekil 27. SSP'de 3βHSD immun boyanmaları, **a ve b:** 3βHSD immunonegatif alan, kontrol grubu, **c ve d:** 3βHSD immunopozitif glia hücreleri (oklar), I. deneme grubu, **e ve f:** Kuprizonlu yem verilmesi kesildikten sonra remiyelinizasyon gerçekleşen SSP bölgesindeki 3βHSD immunopozitif glialar (ok), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, a, c, e x20 objektif ve b, d, f x40 objektif

5. TARTIŞMA

Kuprizon klinik kimyada kullanılmak için üretilmiş ve bakır ile şelat oluşturan bir maddedir. Erkek C57BL/6 farelerde kuprizon intoksikasyonu, MSS'de oligodendrosit kaybı, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon çalışmak için kullanılan bir modeldir (Taylor ve ark., 2010).

Yapılan çalışmada demiyelinizasyon derecesini belirlemek için LFB ile boyanan kesitlere yapılan skorlamada; I. deneme grubunda KK, KA ve SSP bölgelerinde şiddetli demiyelinizasyonun şekillendiği gözlemlendi. Remiyelinizasyon grubu olan II. deneme grubunda ise miyelin kılıfların tekrar oluşmaya başladığı, ancak her üç bölgede de hafif demiyelinizasyon alanlarının varlığı belirlendi. Çalışmadan elde edilen bu bulgular, daha önce her üç bölgede demiyelinizasyon oluşturularak yapılan çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir (Norkute ve ark., 2009; Peter ve ark., 2009). Miyelin temel protein gibi miyelin proteinleri, çok katmanlı kompakt miyelin kılıfın sitozolik yüzüne yapışmış olarak bulunan bir proteindir (Boggs, 2006; Moscarello ve ark., 2007). Bu protein MSS miyelininin şekillenmesinde şimdiye kadar bulunan tek yapısal proteindir (Boggs, 2006) ve miyelinin yönetici molekülü olarak kabul edilir (Peter ve ark., 2009). Bu çalışmada MBP ile yapılan immunohistokimyasal boyamada demiyelinizasyon grubunda (I. deneme grubu), kontrol grubu ve II. deneme grubu ile karşılaştırıldığında KK, KA ve SSP bölgelerinde, daha önce bildirilen çalışmalarda olduğu gibi (Ludwin ve Sternberger, 1984; Peter ve ark., 2009; Skripuletz ve ark., 2009) MBP pozitif alanların oldukça az olduğu tespit edildi. Taylor ve ark., (2010) sekiz haftalık erkek C57BL/6 farelere 5 hafta süre ile % 0.2 oranında kuprizonlu yem vererek KK bölgesinde demiyelinizasyon oluşturmuşlardır. Norkute ve ark., (2009) yaptıkları çalışmada 8 haftalık erkek C57BL/6 farelere 3-7 haftalık periyotlar halinde % 0.2 oranında kuprizon içeren pelet yem vererek beynin KA bölgesinin SLM katmanında değişik derecelerde demiyelinizasyon meydana getirmişlerdir. Yine, Skripuletz ve ark., (2009) 8 haftalık C57BL/6 ırkı farelere % 0.2 oranında kuprizon içeren pelet yemi 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14 ve 20 haftalık sürelerle *ad libitum* olarak vererek, SSP bölgesinde haftalara göre değişen derecelerde demiyelinizasyon oluşturmuşlardır. Yapılan çalışmada MSS'nin her üç bölgesinde şekillenen demiyelinizasyon, yapılan bu çalışmalar ile uyum sağlamaktadır. C57BL/6 farelere % 0.2 oranında kuprizonlu yem verilerek yapılan birçok çalışmada,

KK, KA ve SSP bölgelerinde üçüncü ve dördüncü haftalardan itibaren demiyelinizasyonun şekillenebildiği (Matsusima ve Morell 2001; Koutsoudaki ve ark., 2009; Skripuletz ve ark., 2009; Taylor ve ark., 2010), ancak 5. ve 6. haftalarda lezyonun maksimum seviyelere çıktığı gözlenmiştir (Norkute ve ark., 2009; Peter ve ark., 2009; Taylor ve ark., 2010).

Farelerde kuprizon ile şekillendirilen demiyelinizasyonun haftalara göre şiddetini belirleyen bazı faktörler vardır. Bunlardan bir tanesi kuprizonun dozudur. C57BL/6 ırkı fareler % 0.2 oranında kuprizonlu yemi karaciğer toksitesini oluşmadan ve önemli derecede kilo kaybı şekillenmeksizin tolere edebilmektedir (Hiremath ve ark., 1998). Bir diğer faktör ise hayvanın yaşıdır. Bazı çalışmalarda genç hayvanlarda demiyelinizasyonun 4. haftadan itibaren şekillendiği bildirilirken, daha yaşlı hayvanlarda 8. haftaya kadar şekillenmediği gözlenmiştir (Blackmore, 1973; Ludwin, 1978; Cammer ve Zhang, 1993). Sunulan çalışmada 8. Haftadan önce demiyelinizasyon şiddetine bakılmamıştır. Fakat 8. haftada şiddetli demiyelinizasyon gözlenmiştir. Şiddetli demiyelinizasyonun farelerin 3 aylık yaşta olmasından kaynaklanıyor olabilir. % 0.2 oranında kuprizonlu yem ile beslenen farelerin doğum ağırlıkları ve büyüme oranlarının farklı oluşu, demiyelinizasyonun derecesini ve farelerin hayatta kalma oranını da etkileyebilmektedir (Matsusima ve Morell, 2001). Yapılan bu çalışmada, 8 haftalık süre zarfında şiddetli demiyelinizasyon şekillenmiş olmasına karşın ölüm olgularına rastlanmamıştır.

Çalışmada kuprizonlu yem sonucu şekillenen demiyelinizasyonun mekanizması aydınlatılmamakla beraber, kuprizon toksikasyonunun MSS’de bakır eksikliğinin yanı sıra oligodendrosit hasarına da yol açtığı şeklinde açıklanan bir mekanizma üzerinde durulmaktadır. Oligodendrositlerin niçin daha duyarlı olduğu konusu hala netlik kazanmamıştır. Buna karşın, MSS’de oligodendrositlerin diğer glia hücre tiplerine göre metabolik enerji üretiminin aksamasına daha fazla duyarlı olduğu bilinmektedir. Kuprizon toksikasyonunda bakır gerektiren sitokrom C aktivitesinin aksaması nedeni ile oligodendrositlerin mitokondrilerinde oksidatif fosforilasyon azalmaktadır, buna bağlı olarak şekillenen enerji azalması, miyelinin metabolik olarak sentezlenememesine ve oligodendrositlerin fonksiyon yetersizliğine yol açmaktadır. Oligodendrositlerde şekillenen bu hasar, spesifik genlerin ve miyelin sentezinin azalmasına yol açar.

Mitokondrilerin hasar görmesi en sonunda da oligodendrositlerin apoptoza uğraması ile sonuçlanır (Matsusima ve Morell, 2001).

Kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyondan sonra, normal yeme geçildiğinde kendiliğinden remiyelinizasyonun şekillendiği bildirilmiştir (Matsusima ve Morell, 2001; Koutsoudaki ve ark., 2009; Skripuletz ve ark., 2009). Yapılan çalışmada, remiyelinizasyon grubunda (II deneme grubu) 8 hafta süreyle kuprizon yedirilen farelerin bu süre sonunda 4 hafta süreyle normal yemle beslemenin MSS'nin KK, KA ve SSP bölgelerinde remiyelinizasyon için yeterli bir süre olabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalar ile uyum içerisindedir (Matsusima ve Morell, 2001; Koutsoudaki ve ark., 2009; Skripuletz ve ark., 2009). Meydana gelen remiyelinizasyonun mekanizmasında, demiyelinizasyon bölgesinde sayısı artan mikrogliaların ve astrositlerin payı olabilir. Daha önceleri yapılan çalışmalar, kuprizon ile MSS'de oluşturulan demiyelinizasyon bölgesindeki mikrogliaların miyelin artıklarını fagosite etmek üzere toplandıklarını öngörmüşlerdir (Blackmore, 1973; Smith, 1999). Matsusima ve Morell, (2001) bu öngörüğü desteklemekle birlikte, demiyelinizasyon bölgesinde toplanan bu mikrogliaların remiyelinizasyon oluşmasında stratejik rol oynayabileceğini düşünmektedir. Kuprizonlu yem ile oluşturulan demiyelinizasyon sürecinde, üçüncü haftadan itibaren mikrogliaların bölgede çoğalması ile eş zamanlı olarak, astrosit ve OPC'nin de çoğalmaya başladıkları belirlenmiştir (Hiremath ve ark., 1998; Morell ve ark., 1998; Mason ve ark., 2000). Bu durum, remiyelinizasyon oluşması ile mikroglia sayısının artması arasındaki fonksiyonel ilişkinin hücreden hücreye sinyal yolu ile olabileceğini akla getirmektedir. Kuprizonlu yem ile yapılan demiyelinizasyon çalışmalarının birçoğunda glial hücrelerden salınan IGF-1 ve bazı sitokinlerin demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon olaylarında etkili olduğu görüşü kabul görmeye başlamıştır (Mason ve ark., 2000; Matsusima ve Morell, 2001). Demiyelinizasyon bölgesindeki mikroglia ve astrositlere immunohistokimyasal olarak IGF-1 belirteci ile ikili boyama yapıldığında, her iki hücre tipinde de IGF-1 salınımının olduğu gösterilmiştir (Komoly ve ark., 1992; Matsusima ve Morell, 2001). Komoly ve ark., (1992) IGF-1 seviyesi yükselmeden önce IL-1 seviyelerinin artışı dikkat çekici olduğunu kaydetmişlerdir. Matsusima ve Morell, (2001) mikroglialardan IL-1 salınımının, mikroglialardan ve astrositlerden IGF-1 salınımının, tetiklemiş olabileceğini düşünmüşler ve yükselen IGF-1 seviyelerinin oligodendrosit prekürsör

hücrelerinin demiyelinizasyon alanına göçünü ve olgun oligodendrositlere farklılaşmasını uyardığını ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmada, MSS'nin her üç bölgesinde şekillenen demiyelinizasyon alanında, OPC hücrelerini belirlemek amacı ile NG2 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, demiyelinizasyon grubunda (grup I) daha önce yapılan çalışmalarla (Mason ve ark., 2000; Matsushima ve Morell, 2001; Peter ve ark., 2009; Taylor ve ark., 2010) paralellik gösteren belirgin bir artış saptanmıştır. Çalışmada I. deneme grubundaki GFAP ile belirlenen astrosit sayısındaki artış sonucunda sayısı artan astrositlerden IGF-1 salınımının da artmış olabileceği yorumu yapılabilir. Yine IGF-I artışına bağlı olarak I. deneme grubundaki NG2 immunopozitif hücre sayısında artış meydana gelmiş olabilir. II. deneme grubunda ise NG2 pozitif hücre sayılarının demiyelinizasyon ile beraber azalmaya başladığı tespit edildi ($P<0.01$). Elde edilen bu bulgular daha önce kuprizonlu yem ile C57BL/6 farelerde yapılan çalışmaların sonuçları ile uyum içindedir (Mason ve ark., 2000; Matsushima ve Morell, 2001; Taylor ve ark., 2010).

Astrositlerin demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon aşamalarında birtakım rollerinin olduğu öngörülmüştür (Komoly ve ark., 1992). Bu çalışmada demiyelinizasyon ve remiyelinizasyonda astrosit dağılımını belirlemek amacı ile GFAP antikoru ile immunohistokimyasal boyama yapıldı. Kontrol gruplarında KK, KA ve SSP bölgelerinde az sayıda astrosit gözlenirken, demiyelinizasyon grubu olan I. deneme grubunda her üç bölgede de belirgin bir astrositozis ve astrogliozis tespit edildi. II. deneme grubu olan remiyelinizasyon grubunda ise kontrollerden daha fazla fakat I. deneme grubundan daha az sayıda pozitif hücre saptandı. Her üç gruptaki bu pozitif hücre sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Demiyelinizasyon şekillenen bölgede çoğalan bu astrositlerin kontrol hayvanlardaki normal astrositlerden daha hipertrofik ve daha uzun çıkıntılarının olduğu dikkati çekti. Norkute ve ark., (2009) yaptıkları çalışmada, 8 haftalık C57BL/6 farelere % 0.2 oranında kuprizonlu yem yedirmek sureti ile KA'nin SLM bölgesinde demiyelinizasyon oluşturmuşlar ve yaptıkları analizler sonucunda demiyelinizasyon bölgesinde astrosit sayısında büyük bir artış olduğunu belirlemişlerdir. Bu artış, en şiddetli demiyelinizasyonun olduğu 7. haftada en üst seviyeye ulaşmıştır. Yapılan başka bir çalışmada (Skripuletz ve ark., 2009), % 0.2 oranında kuprizonlu yem, 8 haftalık C57BL/6 farelere yedirilmiş ve SSP bölgesinde demiyelinizasyonun şiddetli olduğu dönemde astrosit sayısında çok belirgin

bir artış belirlemişlerdir. Taylor ve ark., (2010) da aynı fare ırkına yine % 0.2 oranında kuprizonlu yem yedirmek sureti ile KK bölgesinde oluşturdukları demiyelinizasyonda benzer bulgular elde etmişlerdir. Kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyonda, bölgede aktifleşen ve sayısı artan astrositlerden bazı büyüme faktörlerinin salındığını ve bu maddelerin remiyelinizasyon oluşmasında etkili olduklarını öngören çalışmalar vardır (Komoly ve ark., 1992; Peter ve ark., 2009). Bu büyüme faktörlerinden bir tanesi IGF-1'dir. IGF-1 insülin gen familyasının bir ürünüdür (Daughaday ve Rotwein, 1989). IGF-1'in, OPC için iyi bir mitojen olduğu ve beyindeki salınımlarının astrositler tarafından yapıldığı bildirilmiştir (Komoly ve ark., 1992; Zeger ve ark., 2007; Peter ve ark., 2009). Kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyonda lezyonlu bölgelerdeki sayısı artmış ve hipertrofik astrositlerden salınan IGF-1, yakın bölgedeki oligodendroglialar üzerindeki IGF-1 reseptörlerinde parakrin etki göstererek, oligodendroglial fonksiyonu uyararak sureti ile miyelin rejenerasyonunu ilerletebileceği ileri sürülmektedir (Komoly ve ark., 1992; Peter ve ark., 2009). Yapılan bu çalışmada demiyelinizasyon bölgesinde aktifleşen astrositlerden IGF-1 salınımına bakılmamakla birlikte, diğer çalışmalarla uyumlu olan demiyelinizasyon esnasında oluşan astrositozis ve sonrasında meydana gelen demiyelinizasyon olaylarına bu bilgiler ışığında benzer yorumu getirmek mümkündür. Astrositlerin demiyelinizasyon bölgesinde çoğalmasının miyelinizasyon üzerine olumlu etkileri dışında, demiyelinizasyon bölgesinde çoğalan astrositlerin TNF- α veya IL-1 gibi zararlı olabilecek sitokinleri de salgıladıkları bildirilmiştir. Bu durumun oligodendrosit hasarı oluşturup, demiyelinizasyonu ilerletebileceği düşünülmektedir (Kipp ve ark., 2007).

Östradiol, sinir dokuda androjen prekürsörlerinden lokal olarak sentezlenir. Androjenleri östrojene çeviren enzim P450arom'dur. Dokudaki P450arom varlığı bölgede östrojen sentezi hakkında bilgi verir. Merkezi sinir sistemin'de normal koşullar altında nöronlardan P450arom salınımı sınırlıdır (Garcia-Segura ve ark., 1999). Bununla birlikte *in vitro* çalışmalarda, stres durumlarında astrositlerden de salınımları gerçekleşebilmektedir. Aynı zamanda *in vivo* olarak değişik tipteki beyin hasarından sonra da reaktif astrositlerden P450arom salınımı meydana gelmektedir. Aromatazin reaktif astrositlerden salınımı, nöron koruyucu bir etki yapmaktadır. Çünkü bu enzimin farmakolojik olarak baskılandığı durumlarda nöronlar normal koşullarda etkilenmedikleri orta şiddetteki nörodejeneratif uyarımlardan bile

etkilenebilmektedirler. Bu bilgiler ışığında, P450aromun beyin hasarı sonrası reaktif astrositlerden salınımı ve buna bağlı olarak bölgedeki lokal östrojen artışının nörodejeneratif hasarı azalttığı ifade edilmektedir (Azcoitia ve ark., 2003). Bunun dışında östrojen verilmesinin *in vivo* oligodendrosit ölümünü engellenmesi yanında (Garcia-Segura ve ark., 1999; Gerstner ve ark., 2007), MSS'de glial aktivasyonu ve yangıyı da engelleyebildiği daha önce yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Matejuk ve ark., 2001; Vegeto ve ark., 2003; Barreto ve ark., 2007). Diğer bazı çalışmalarda da östrojenin nöronal rejenerasyonu ilerlettiği (Jones, 1994; Jones ve ark., 1997) ve nöronal ölümü engellediği (Behl ve ark., 1997a; 1997b) bildirilmiştir. Östrojenin veya onun prekürsörü olan testosteronun nöronal yaşam süresini, apoptozu engelleyen moleküllerin salınımını (Garcia-Segura ve ark., 1999), nöronal ve dendritik büyümeyi, aksonal ve sinaptik rejenerasyonu arttırabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Jones ve ark., 1994; Jones, 1997). Garcia-Segura ve ark., (1999) yaptıkları bir çalışmada, farelerde hem periton içerisine kainik asit vererek, hem de paslanmaz çelik bir kanül yardımı ile beynin değişik bölgelerinde hasar oluşturmak suretiyle beyindeki glia hücrelerinden P450arom salınımını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada oluşan beyin hasarından sonra beynin korteks, KK, striatum, KA, talamus ve hipotalamus gibi birçok bölgesinde P450arom sunan astrositler gözlemişlerdir. Bu durum oluşan bir beyin hasarından sonra beynin birçok bölgesinde astrositlerde hasar sonrası P450arom salınımının olabildiğini göstermiştir. Bu bulguların yanı sıra kontrol gruplarında beynin herhangi bir bölgesinde glia hücresinde P450arom salınımı elde edilemezken, kontrol hayvanların nöronlarında bu salınımının sınırlı olduğunu belirtilmişlerdir. Sunulan bu çalışma yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak, östrojenin kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyon ve sonrasında şekillenen remiyelinizasyon esnasındaki rolünü ortaya koymaya yönelik bir çalışma olmuştur. Çalışmada KK, KA ve SSP bölgelerinde oluşan demiyelinizasyondan sonra glia hücrelerinden P450arom salınımı gözlenmiş ve bu artış remiyelinizasyonun şekillenmeye başlaması ile azalma eğilimine geçmiştir. Kontrol gruplarında ise beynin bu bölgelerindeki glia hücrelerinden P450arom salınımı olmamıştır. Çalışma, bu yönü ile beyin hasarından sonra glia hücrelerinden P450arom salınımının olduğunu ifade eden literatür bilgileri ile uyum göstermektedir. Astrositlerden bu salınımı başlatan moleküler sinyal, muhtemelen dejenerasyona uğrayan nöronlardan, reaktif astrositlerden veya mikrogliyalardan başlatılmaktadır. Beyin

hasarı oluştuktan sonra, astrositler tarafından şekillendirilen östrojen, hasar gören nöronlar için bir trofik faktör olabilir ve hasarlı beyin dokusunun yeniden yapılandırılmasında kullanılabilir. Östrojenin bu etkileri, östrojenin büyüme faktörlerinin sinyal yollarını aktive etmesi sonucu olabilir (McMillan ve ark., 1996; Toran-Allerand ve ark., 1992; Sohrabji ve ark., 1994).

Taylor ve ark., (2010) yaptıkları çalışmada, C57BL/6 farelere kuprizonlu yem yedirerek demiyelinizasyon oluşturmuşlar ve östrojenin demiyelinizasyon üzerine etkisini incelemek amacı ile bir gruba kuprizon ile birlikte deri altı implant şeklinde östrojen uygulamışlardır. Deri altı implant şeklinde östrojen verilen grupta implant uygulanmayan gruba kıyasla olgun oligodendrosit kaybı, mikroglia birikimi, IGF-1 ve TNF α salınımının azaldığını belirlemişler. Dışarıdan östrojen verilmesinin, oligodendrosit apoptozunu önlemek yanında, IGF-1 salınımını da azaltarak mikroglia ve astrosit aktivasyonunu baskılayabileceği ve bunun sonucunda da bu hücrelerden salınan TNF α gibi zararlı maddelerin azalması ile demiyelinizasyonun kısmen önlenebildiği kanısına varmışlardır. Peter ve ark., (2009) ise yine C57BL/6 farelerde demiyelinizasyon oluşumu üzerine dışarıdan östrojen ile birlikte progesteron verilmesinin östrojenin tek başına yaptığı etkiden daha fazla yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Taylor ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmanın aksine, Peter ve ark., (2009) östrojen ve progesteronun birlikte verilmesinin astrositlerin sayısını arttırdığını ve glia hücrelerinden IGF-1'in salınımının uyarılması sayesinde demiyelinizasyonun büyük oranda engellenebildiğini vurgulamışlardır. Bu iki çalışma sunulan çalışma ile paralel görünse de, bu çalışmanın esas kuramı, kuprizonun oluşturduğu demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra kendiliğinden oluşan demiyelinizasyon esnasında MSS'de P450arom, dolayısıyla östrojen üreten hücrelerdeki değişimleri incelemektir. Diğer bir deyişle, demiyelinize MSS'de miyelinizasyonun nasıl şekillendiğini ve östrojenin buradaki rolünü anlamaya yöneliktir. Kuprizon ile oluşan demiyelinizasyon ve bu esnada ortaya çıkan glial aktivasyon yönünden bu çalışma, önceki çalışmalar (Peter ve ark.,2009; Taylor ve ark., 2010) ile uyum sağlamaktadır. Yapılan çalışmada demiyelinizasyonu başlatan etkinin bölgede hasara yanıt olarak glia hücrelerinden sentezlenen östrojen ve progesteron olduğu güçlü bir varsayımdır.

Kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyonda, östrojenin glialardan salınan çeşitli büyüme faktörlerinin salınımını uyardığı ve bu maddelerin hem lezyonlu bölgeye OPC göçünü sağlayarak hem de oligodendrosit apoptozunu engelleyerek remiyelinizasyonu hızlandırdığı güçlü bir hipotez olmaya başlamıştır (Garcia-Segura ve ark., 1999; Kipp ve ark., 2007, Peter ve ark., 2009; Taylor ve ark., 2010). Sonuç olarak östrojenin remiyelinizasyon üzerine etkisi için iki mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan bir tanesi demiyelinizasyon bölgesindeki glia hücrelerinden P450arom'un salınımının artması, lokal olarak östrojen üretimini arttırmaktadır ve artan östrojen bölgedeki glial populasyon üzerine etki ederek, bu hücrelerden bazı büyüme faktörlerinin salınımını uyarabilmektedir. Bu büyüme faktörlerinden bazıları demiyelinizasyonu tetiklerken, bazıları da OPC göçünü uyararak remiyelinizasyonu başlatabilecek sinyal basamaklarına olumlu etkiler yapabilmektedir (Peter ve ark., 2009; Taylor ve ark., 2010). Diğer bir mekanizma ise, bölgede sentezi artan östrojenin, daha önce miyelinizasyon etkisi incelenen progesteron (Koenig ve ark., 1995; Chan ve ark., 1998) sentezini arttırarak (Sinchak ve ark., 2003). remiyelinizasyonu sağladığı şeklinde açıklanmaktadır.

Yapılan bu çalışmada, kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyon ve sonrasında kendiliğinden şekillenen remiyelinizasyonda bir nörosteroid olan ve miyelinizasyonu arttırıcı etkileri olduğu bildirilen (Koenig ve ark., 1995; Ghomari ve ark., 2003) progesteronun rolünü araştırmak amacı ile progesteron sentezinden sorumlu olan 3 β HSD enziminin glia hücrelerindeki salınımı incelendi. C57BL/6 erkek kontrol farelerin MSS'de glial hücrelerden 3 β HSD salınımı gerçekleşmezken, kuprizon yem yedirilen farelerin MSS'nin KK, KA ve SSP bölgelerinde oluşan demiyelinizasyon sonrasında, bu bölgelerindeki glial hücrelerden 3 β HSD enzim salınımının arttığı belirlendi. Kuprizon ile MSS'de oluşturulan demiyelinizasyondan sonra 3 β HSD salınımına ilişkin daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Merkezi sinir sistemin'de kuprizon ile KK bölgesinde oluşturulan demiyelinizasyon esnasında progesteron verilerek demiyelinizasyonun belirli derecelerde gerilediğini söyleyen başka bir çalışma mevcuttur (Peter ve ark., 2009). Bu çalışma ile Peter ve arkadaşlarının (2009) çalışmasının amaçları benzerlik gösterse de, sunulan bu çalışmada dışarıdan progesteron verilmemiş ve MSS'de şekillenen demiyelinizasyon gibi bir beyin hasarından MSS'nin kendisinin progesteron sentezini arttırabildiği ve

demiyelinizasyonun gerilemesi için dengeleyici etkenlerini devreye sokabildiği düşünülmüştür. Yapılan bu çalışmada, MSS’de kuprizon ile oluşturulan lezyona yanıt olarak hücrel etkileşim yolu ile lokal progesteron sentezinin arttığı düşünülmektedir. Kuprizonun etkisi kalktıktan sonraki dönemde ise hızlı bir şekilde demiyelinizasyonun meydana geldiği gözlenmiştir. Kuprizon ile demiyelinizasyon esnasında tek başına progesteron verilmesinin demiyelinizasyonu bir noktaya kadar geriletmediğini belirtmişlerdir. Fakat demiyelinizasyonun şiddetinin büyük ölçüde önlenmesi progesteron ile östrojenin birlikte verilmesi sayesinde olmuştur. Ayrıca progesteron ve östrojenin birlikte verilmesinin, etkilenen bölgedeki genç ve olgun oligodendrosit sayısını, astrogliozisi ve IGF-1’in uyarımını arttırdığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak astrositlerden salınan IGF-1’in oligodendrosit ölümünü engelleyerek ve çevreden lezyonlu bölgeye OPC göçünü tetiklemesi sonucunda demiyelinizasyonun büyük ölçüde engellendiğini öngörmüşlerdir.

Sunulan çalışmadan elde edilen veriler ışığında, C57BL/6 farelerde kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyondan sonra normal şartlar altında glial hücrelerden salınımı az olan ya da olmayan ve MSS’de lokal östrojen ve progesteron sentezini katalize eden P450arom ve 3 β HSD gibi steroidojenik enzimlerin salınımlarının arttığını söylemek mümkündür.

Çalışma sonunda P450arom salınımlarının artması ile lokal olarak östrojen seviyesinin arttığı düşünülmüştür. Seviyesi artan östrojen, glial hücrelerden bazı hücrel sinyaller yolu ile büyüme faktörlerinin artışına yol açmak sureti ile hem genç OPC’lerin uyarılması, hem de oligodendrosit apoptozunun önlenmesi şeklindeki görüşlere katkı yapmaktadır. Bununla birlikte östrojen lokal olarak progesteron sentezini arttırabilmekte ve östrojenin diğer etkilerine ek olarak demiyelinizasyona progesteronun katkısı ile birleştiğinde sonucun daha etkili olabildiği düşünülmektedir.

Merkezi sinir sistemin’de çeşitli nedenlerle meydana gelen demiyelinizasyonun karmaşık mekanizması hala bilinmeyenlerle dolu olup, mevcut bilgiler dahilinde bu konuda daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde hem insanlarda hem de hayvanlarda demiyelinizasyon ile seyreden hastalıklar önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu konuda geliştirilecek daha kapsamlı araştırmalar şu an deneme aşamasında olan tedavi yöntemlerini kısa sürede sonuç alınan saha çalışmalarına dönüştürebilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde demiyelinizasyonla seyreden birçok hastalığın patogenezi çok net değildir ve bunun yanında tedavisi pek mümkün olmamaktadır. Son yıllarda özellikle bir MS modeli olan kuprizon ile oluşturulan demiyelinizasyon üzerinde umut veren çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

İnsanların önemli hastalıklardan biri olan MS ve köpeklerdeki KGH demiyelinizasyon ile seyreden yaygın hastalıklardan başlıcalarıdır. Gerek MS’de gerekse KGH’da demiyelinizasyonun şekillendiği iyi bilinmesine rağmen, demiyelinizasyonun mekanizması hala sırlarla doludur ve araştırma konusudur. Fakat son yıllarda demiyelinizasyon ile seyreden hastalıklarda, beynin kendi ürettiği ve ‘nörosteroidler’ olarak adlandırılan hormonların bu hastalıklar üzerinde olumlu etkiler yaratabileceğini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Östrojen ve progesteron gibi beyinde de sentezlenebilen nörosteroidlerin MSS ve periferel sinir sistemi üzerindeki koruyucu etkileri gün geçtikçe netlik kazanmaya başlamaktadır. Yine son yıllarda yapılan birçok araştırma ile bu nörosteroidlerin demiyelinizasyon ve iyileşme sürecinde işe karıştığı ortaya konmuştur.

Bu çalışma ile demiyelinizasyon ile seyreden hastalıklarda beynin kendi kompanzasyon mekanizmasını devreye sokup progesteron ve östrojen gibi hormonları kendi glial hücrelerinden sentezleyebildiği düşünülmektedir. Birkaç çalışma dışında bu konuda geniş araştırmalar henüz yapılmamıştır ve günümüzde çaresiz gibi görünen ve demiyelinizasyon ile seyreden hastalıkların patogenezi, teşhisi ve tedavisi için bu konuda daha çok araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aktas O, Waiczies S, Zipp F. Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets. *J Neuroimmunol.* 2007;184:17-26.
- Anonim: [Www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html](http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html), 2012
- Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ, Stiles CD. bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science.* 2004;306:2111–2115.
- Arnold S, Beyer C. Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target. *J Neurochem.* 2009;110:1–11.
- Ashley LP, Stewart HH, Xiaoqin W. A modified technique for high-resolution staining of myelin. *J Neurosci Meth.* 2006;153:135-146.
- Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B. *Temel Histoloji.* 1. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi. 1998;161-162.
- Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Garcia-Segura LM. Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann NY Acad Sci.* 2003;1007:298-305.
- Bakker DA, Ludwig SK. Blood–brain barrier permeability during cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci.* 1987;78:125–137.
- Banik NL, Mauldin LB, Hogan EL. Activity of 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphohydrolase in human cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.* 1979;5:539-541.
- Barkovich AJ. Concepts of myelin and myelination in neuroradiology. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000; 21:1099–1109.
- Barnard RO, Best PV, Erdohazi M. Neuropathology of Menkes' disease. *Dev Med Child Neurol.* 1978;20:586–97.
- Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 2004;55:458-468.
- Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *Eur J Neurosci.* 2007;25:3039-3046.

- Baulieu EE, Robel P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:4089-4091.
- Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*. 1998; 23:963-987.
- Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001;81:871-927.
- Bebo BF Jr, Fyfe-Johnson A, Adlard K, Beam AG, Vandembark AA, Offner H. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol*. 2001;166:2080-2089.
- Behl C, Lezoualch F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology*. 1997a;138:101-106.
- Behl C, Skutella T, Lezoualch F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*. 1997b;51:535-541.
- Benetti F, Ventura M, Salmini B, Ceola S, Carbonera D, Mammi S, Zitolo A, D'Angelo P, Urso E, Maffia M, Salvato B, Spisni E. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *Neurotoxicology*. 2010;31:509-517.
- Benjamins JA. Molecular structure of the myelin membrane; Multiple sclerosis: immunology, pathology, and pathophysiology. New York (Herndon RM., eds) Demos Medical Publishing. 2003:31-50.
- Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer, Reindl. Antimyelin Antibodies as a Predictor of Clinically Definite Multiple Sclerosis after a First Demyelinating Event. *N Engl J Med*. 2003;349:139-145.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*. 2000;405:187-191.
- Bernardi F, Lanzone A, Cento RM, Spada RS, Pezzani I, Genazzani AD, Luisi S, Luisi M, Petraglia F, Genazzani AR. Allopregnanolone and dehydroepiandrosterone response to corticotropin releasing factor in patients suffering from Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur J Endocrinol*. 2000;142:466-471.
- Bicikova M, Tallová J, Hill M, Krausova Z, Hampl R. Serum concentrations of some neuroactive steroids in women suffering from mixed anxiety-depressive disorder. *Neurochem Res*. 2000;25:1623-1627.

- Biggio G, Follesa P, Sanna E, Purdy RH, Concas A. GABAA-receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. *Int Rev Neurobiol.* 2001;46:207-241.
- Binder MD, Cate HS, Prieto AL, Kemper D, Butzkueven H, Gresle MM, Cipriani T, Jokubaitis VG, Carmeliet P, Kilpatrick TJ. Gas6 deficiency increases oligodendrocyte loss and microglial activation in response to cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci.* 2008;28:5195-5206.
- Blakemore WF. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol.* 1972;1:413-426.
- Blakemore WF, Summers BA, Appel MG. Evidence of oligodendrocyte infection and degeneration in canine distemper encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 1989;77:550-553.
- Blakemore WF. Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *J Neurol Sci.* 1973;20:63-72.
- Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:1945-1961.
- Brady ST, Witt AS, Kirkpatrick LL, Waegh SM, Readhead C, Tu PH, Virginia M, Lee Y. Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *J Neurosci.* 1999;19:7278-7288.
- Brambilla F, Biggio G, Pisu MG, Bellodi L, Perna G, Bogdanovich-Djukic V, Purdy RH, Serra M. Neurosteroid secretion in panic disorder. *Psychiatry Res.* 2003;118:107-116.
- Braun PE, Bambrick LL, Edwards AM, Bernier L. 2',3'-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase has characteristics of cytoskeletal proteins. A hypothesis for its function. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;605:55-65.
- Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, Mattson MP. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology.* 2000;141:3646-3656.
- Bulun SE, Simpson ER. Aromatase expression in women's cancers. *Adv Exp Med Biol.* 2008;630:112-132.
- Cammer W, Zhang H, Tansey FA. Effects of carbonic anhydrase II (CAII) deficiency on CNS structure and function in the myelin-deficient CAII-deficient double mutant mouse. *J Neurosci Res.* 1995;40:451-457.

- Cammer W, Zhang H. Atypical localization of the oligodendrocytic isoform (PI) of glutathione-S-transferase in astrocytes during cuprizone intoxication. *J Neurosci Res.* 1993;36:183-190.
- Cammer W. The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurol Sci.* 1999;168:116–120.
- Carlton WW. Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1966; 8:512–521.
- Carlton WW. Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone. *Exp Mol Pathol.* 1969;10:274-287.
- Carlton WW. Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci.* 1967;6:11–19.
- Carreau S, Silandre D, Bois C, Bouraima H, Galeraud-Denis I, Delalande C. Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45:5-10.
- Cenci di Bello I, Dawson MRL, Lewine JM Reynolds R. Generation of oligodendroglial progenitors in acute inflammatory demyelinating lesions of the rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation. *J Neurocytol.* 1999; 28:365–381.
- Chan JR, Phillips LJ, Glaser M. Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10459-10464.
- Dangond F. Repair and neuroprotective strategies in multiple sclerosis. *Curr Clin Neurol.* 2005;11:193-207.
- Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 1989;10:68-91.
- De Angelis DA, Braun PE. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase binds to actin-based cytoskeletal elements in an isoprenylation-independent manner. *J Neurochem.* 1996;67:943-951.
- De Nicola AF, Labombarda F, Deniselle MC, Gonzalez SL, Garay L, Meyer M, Gargiulo G, Guennoun R, Schumacher M. Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30:173-187.
- De Nicola AF, Labombarda F, Gonzalez SL, Gonzalez Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M. Steroid effects on glial cells: detrimental or protective for spinal cord injury? *Ann N Acad Sci.* 2003;1007:317–328.

- Do-Rego JL, Mensah-Nyagan GA, Beaujean D, Vaudry D, Sieghart W, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. Gamma-Aminobutyric acid, acting through gamma -aminobutyric acid type A receptors, inhibits the biosynthesis of neurosteroids in the frog hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13925-13930.
- Drew PD, Chavis JA. Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *J Neuroimmunol.* 2000;111:77-85.
- Edgar JM, Garbern J. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res.* 2004;76:593-598.
- Edwards AM, Ross NW, Ulmer JB, Braun PE. Interaction of myelin basic protein and proteolipid protein. *J Neurosci Res.* 1989;22:97-102.
- Flatmark T, Kryvi H, Tangeras A. Induction of megamitochondria by cuprizone (biscyclohexanone oxaldihydrazone). Evidence for an inhibition of the mitochondrial division process. *Eur J Cell Biol.* 1980;23:141-148.
- Franklin RJ, Kotter MR. The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances, *J Neurol.* 2008;255:19-25.
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem.* 1998;71(6):2231-8.
- Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Steroids and glial cell function. *Glia.* 2006 Nov 1;54:485-498.
- Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol.* 1999;40:574-584.
- Geller TJ, Pan Y, Martin DS. Early neuroradiologic evidence of degeneration in Menkes' disease. *Pediatr Neurol.* 1997;17:255-258.
- Gensert JM, Goldman JE. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron.* 1997;19:197-203.
- Gerstner B, Sifringer M, Dzierko M, Schüller A, Lee J, Simons S, Obladen M, Volpe JJ, Rosenberg PA, Felderhoff-Mueser U. Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol.* 2007;61:562-573.
- Ghoumari AM, Ibanez C, El-Etr M, Leclerc P, Eychenne B, O'Malley BW, Baulieu EE, Schumacher M. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J Neurochem.* 2003;86:848-859.

- Girdler SS, Straneva PA, Light KC, Pedersen CA, Morrow AL. Allopregnanolone levels and reactivity to mental stress in premenstrual dysphoric disorder. *Biol Psychiatry*. 2001;49:788-797.
- Gonzalez Deniselle MC, Lopez-Costa JJ, Saavedra JP, Pietranera L, Gonzalez SL, Garay L, R. Guennoun, Schumacher M, De Nicola A.F. Progesterone neuroprotection in the wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol Dis*. 2002;11:457-468.
- Goss JR, Finch CE, Morgan DG. Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiol Aging*. 1991;12(2):165-70.
- Gravel M, Peterson J, Yong VW, Kottis V, Trapp B, Braun PE. Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci*. 1996;7:453-466.
- Guennoun R, Fiddes RJ, Gouézou M, Lombès M, Baulieu EE. A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase (3beta-HSD), is expressed in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995;30:287-300.
- Higgins RJ, Krakowka SG, Metzler AE, Koestner A. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. *Acta Neuropathol*. 1982;58:1-8.
- Hinman JD, Chen CD, Oh SY, Hollander W, Abraham CR. AgeDependentAccumulation of Ubiquitinated 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in Myelin Lipid Rafts. *Glia*. 2007;56:118-133.
- Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*. 1998;92:38-49.
- Hoppel CL, Tandler B. Biochemical effects of cuprizone on mouse liver and heart mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 1973;22:2311-2318.
- Horvat S, Beyer C, Arnold S. Effect of hypoxia on the transcription pattern of subunit isoforms and the kinetics of cytochrome c oxidase in cortical astrocytes and cerebellar neurons. *J Neurochem*. 2006;99:937-951.
- Imitola J, Snyder EY, Khoury SJ. Genetic programs and responses of neural stem/progenitor cells during demyelination: potential insights into repair mechanisms in multiple sclerosis. *Physiol Genomics*. 2003;14:171-197.

- Johann S, Kampmann E, Denecke B, Arnold S, Kipp M, Mey J, Beyer C. Expression of enzymes involved in the prostanoid metabolism by cortical astrocytes after LPS-induced inflammation. *J Mol Neurosci*. 2008;34:177-185.
- Jones KJ, Durica TE, Jacob SK. Gonadal steroid preservation of central synaptic input to hamster facial motoneurons following peripheral axotomy. *J Neurocytol*. 1997;26:257-266.
- Jones KJ. Androgenic enhancement of motor neuron regeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;743:141-161.
- Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*. 1989;125:2083-2091.
- Kabakci N, Yarim M, Karahan S, Guvenc T, Yagci BB, Gurcan IS. Immunohistochemical investigation of cerebellum in dogs infected with canine distemper virus. *Acta Vet Hung*. 2004;52:327-337.
- Kaler SG, Buist NR, Holmes CS, Goldstein DS, Miller RC, Gahl WA. Early copper therapy in classic Menkes disease patients with a novel splicing mutation. *Ann Neurol*. 1995;38:921-928.
- Kasama-Yoshida H, Tohyama Y, Kurihara T, Sakuma M, Kojima H, Tamai Y. A comparative study of 2',3'-cyclic-nucleotide 3' phosphodiesterase in vertebrates:cDNA cloning and amino acid sequences for chicken and bullfrog enzymes. *J Neurochem*. 1997;69:1335-1342.
- Keegan M, König F, Mc Clelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, Parisi J, Lucchinetti CF. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet*. 2005;366:579-582.
- Khisti RT, Penland SN, VanDoren MJ, Grobin AC, Morrow AL. GABAergic neurosteroid modulation of ethanol actions. *World J Biol Psychiatry*. 2002;3:87-95.
- Kida E, Palmieriello S, Golabek AA, Walus M, Wierzba-Bobrowicz T, Rabe A, Albertini G, Wisniewski KE. Carbonic anhydrase II in the developing and adult human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65:664-667.
- Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*. 2009;118:723-736.
- Kipp M, Karakaya S, Johann S, Kampmann E, Mey J, Beyer C. Oestrogen and progesterone reduce lipopolysaccharide-induced expression of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-18 in midbrain astrocytes. *J Neuroendocrinol*. 2007;19:819-822.

- Knapp PE. Proteolipid protein: is it more than just a structural component of myelin? *Dev Neurosci*. 1996;18:297–308.
- Kodama H, Murata Y, Kobayashi M. Clinical manifestations and treatment of Menkes disease and its variants. *Pediatr Int*. 1999;41:423–429.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressousches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*. 1995;9;268(5216):1500-1503.
- Komoly S, Hudson LD, Webster HD, Bondy CA. Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:1894-1898.
- Komoly S, Jeyasingham MD, Pratt OE, Lantos PL. Decrease in oligodendrocyte carbonic anhydrase activity preceding myelin degeneration in cuprizone induced demyelination. *J Neurol Sci*. 1987;79:141-148.
- Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V, Moharregg-Khiabani D, Hildebrandt H, Trebst C, Stangel M. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neurosci Lett*. 2009;451:83-88.
- Kursula P. Structural properties of proteins specific to the myelin sheath. *Amino Acids*. 2008; 34:175–185.
- Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Curr Opin Neurol*. 2008;21:242–247.
- Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol*. 1999;160:333–347.
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett WJ. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci*. 2001;24:39-47.
- Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp B, Peterson A, Roder J. Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature*. 1994;369:747–750.
- Ligon KL, Fancy SP, Franklin RJ, Rowitch DH. Olig gene function in CNS development and disease. *Glia*. 2006;54:1-10.
- Lin KY, Lai SC. Induction of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in demyelination of BALB/c mice caused by *angiostromylus cantonensis*. *J Comp Path*. 2009;141:248-253.

- Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol.* 1988;130:443-454.
- Ludwin SK, Sternberger NH. An immunohistochemical study of myelin proteins during remyelination in the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 1984;63:240-248.
- Ludwin SK. Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse. An ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest.* 1978;39:597-612.
- Madsen E, Gitlin JD. Copper and iron disorders of the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:317-337.
- Marin-Husstege M, Muggironi M, Raban D, Skoff RP, Casaccia-Bonnel P. Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones. *Dev Neurosci.* 2004;26:245-254.
- Mason JL, Jones JJ, Taniike M, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK. Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. *J Neurosci Res.* 2000;61:251-262.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci.* 2001;21:7046-7052.
- Matejuk A, Adlard K, Zamora A, Silverman M, Vandenbark AA, Offner H. 17 beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 2001;65:529-542.
- Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain pathol.* 2001;11:107-116.
- McMillan PJ, Singer CA, Dorsa DM. The effects of ovariectomy and estrogen replacement on trkA and choline acetyltransferase mRNA expression in the basal forebrain of the adult female Sprague-Dawley rat. *J Neurosci.* 1996;16:1860-1865.
- Mellon SH, Deschepper CF. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res.* 1993;629:283-292.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001;37(1-3):3-12.
- Mellon SH, Griffin LD. Synthesis, regulation, and function of neurosteroids. *Endocr Res.* 2002;28(4):463

- Mendelson CR, Kamat A. Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;106:62-70.
- Messori L, Casini A, Gabbiani C, Sorace L, Muniz-Miranda M, Zatta P. Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Trans*. 2007;21:2112-2114.
- Micevych P, Sinchak K. Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;290:44-50.
- Micevych P, Soma KK, Sinchak K. Neuroprogesterone: key to estrogen positive feedback? *Brain Res Rev*. 2008;57:470-480.
- Miller JD, Bright JJ, Sriram S, Rodriguez M. Successful treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a monoclonal natural autoantibody. *J Neuroimmunol*. 1997;75:204-209.
- Monteleone P, Luisi M, Colurcio B, Casarosa E, Monteleone P, Ioime R, Genazzani AR, Maj M. Plasma levels of neuroactive steroids are increased in untreated women with anorexia nervosa or bulimia nervosa. *Psychosom Med*. 2001;63:62-68.
- Moreau F, Mitre H, Benhaim A, Bois C, Bertherat J, Carreau S, Reznik Y. Aromatase expression in the normal human adult adrenal and in adrenocortical tumors: biochemical, immunohistochemical, and molecular studies. *Eur J Endocrinol*. 2009;160:93-99.
- Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK. Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci*. 1998;12:220-227.
- Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD. The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem Res*. 2007;32:251-256.
- Muniz-Miranda M, Pagliai M, Cardini G, Messori L, Bruni B, Casini A, Di Vaira M and Schettino V. A multi-technique approach to predicting the molecular structure of cuprizone in the gas phase and in the crystalline state. 2008; 10:416-422.
- Mutinelli F, Vandeveld M, Griot C, Richard A. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathol*. 1989;77:333-335.
- Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. *Netter Temel Histoloji*. 1. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri. 2009;117.
- Naftolin F. Sex steroids and the brain. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24:533-534.

- Nicolas LB, Pinoteau W, Papot S, Routier S, Guillaumet G, Mortaud S. Aggressive behavior induced by the steroid sulfatase inhibitor COUMATE and by DHEAS in CEAJH mice. *Brain Res.* 2001;922:216-222.
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat.* 2005;207:687-693.
- Norkute A, Hieble A, Braun A, Johann S, Clarner T, Baumgartner W, Beyer C, Kipp M. Cuprizone treatment induces demyelination and astrocytosis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res.* 2009;87:1343-1355.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis: *N Engl J Med.* 2000;343:938-952.
- Oder W, Grimm G, Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deecke L. Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: a prospective study of 45 cases. *J Neurol.* 1991;238:281-287.
- Ogata T, Nakamura Y, Tsuji K, Shibata T, Kataoka K. Steroid hormones protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience.* 1993;55:445-449.
- Okeda R, Gei S, Chen I, Okaniwa M, Shinomiya M, Matsubara O. Menkes' kinky hair disease: morphological and immunohistochemical comparison of two autopsied patients. *Acta Neuropathol.* 1991;81:450-457.
- Ong WY, Levine JM. A light and electron microscopic study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan-positive oligodendrocyte precursor cells in the normal and kainate-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience.* 1999;92:83-95.
- Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Una AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res.* 2007;32:279-292.
- Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *Faseb J.* 1992;6:2311-2322.
- Perfüzyon Tekniğinin Uygulanması. <http://www.apnhistopathology.unimelb.edu.au/pdf>. 2008.
- Peter A, Markus K, Akvile N, Sonja J, Tim C, Alena B, Zoltan B, Samuel K, Cordian B. 17 β -estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia.* 2009;57:807-814.
- Peterson RS, Lee DW, Fernando G, Schlinger BA. Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. *J Comp Neurol.* 2004;475:261-269.
- Pott F, Gingele S, Clarner T, Dang J, Baumgartner W, Beyer C, Kipp M. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Res.* 2009;1305:137-149.

- Raine CS, Cannella B, Hauser LS, Genain CP. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: A Case for Antigen-Specific Antibody Mediation. *Ann Neurol.* 1999;46:144–160.
- Raine CS. On the development of CNS lesions in natural canine distemper encephalomyelitis. *J Neurol Sci.* 1976;30:13–28.
- Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;46:261–281.
- Redwine JM, Armstrong RC. *In vivo* proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGFaR during early remyelination. *J Neurobiol.* 1998;37:413–428.
- Robert F, Guennoun R, Désarnaud F, Do-Thi A, Benmessahel Y, Baulieu EE, Schumacher M. Synthesis of progesterone in Schwann cells: regulation by sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 2001;13:916–924.
- Rodriguez M, Lennon VA. Immunoglobulins Promote Remyelination in the Central Nervous System. *Ann Neurol.* 1990;27:12–17.
- Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol.* 1997;31:1–11.
- Roy A, Hooper C. Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by Opening the Blood-Brain Barrier. *J Virol.* 2007;81:7993–7998.
- Saldanha CJ, Duncan KA, Walters JB. A Neuroprotective actions of brain aromatase. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30:106–118.
- SAS, 2009. SAS Statistical Software. SAS Campus drive. Cary NC. USA. 27513.
- Schnaar RL, Collins BE, Wright LP, Kiso M, Tropak MB, Roder JC, Crocker PR. Myelin-associated glycoprotein binding to gangliosides: structural specificity and functional implications. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;845:92–105.
- Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, Robel P, De Nicola AF, Baulieu EE. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol.* 2000;29:307–326.
- Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Desarnaud F, Lacor P, Benavides J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves, *Brain Res Rev.* 2001;37:343–359.

- Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghomari A, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Ibanez C, Labombarda F, Coirini H, Baulieu EE, De Nicola AF. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res.* 2004;14 Suppl A:18-33.
- 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;121:2221-8.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. Aromatase a brief overview. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:93-127.
- Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P, Lu JK, Micevych P. Estrogen induces de novo progesterone synthesis in astrocytes. *Dev Neurosci.* 2003;25:343-348.
- Skoff R. Morphology of Oligodendrocytes and Myelin; Multiple Sclerosis: Immunology, Pathology, and Pathophysiology. New York (Herndon RM., eds) Demos Medical Publishing. 2003;7-23.
- Skipuletz T, Bussmann JH, Gudi V, Koutsoudaki PN, Pul R, Moharregg-Khiabani D, Lindner M, Stangel M. Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain Pathol.* 2009;20:301-312.
- Skipuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol.* 2008;172:1053-1061.
- Smith ME. Phagocytosis of myelin in demyelinating disease: a review. *Neurochem Res.* 1999;24:261-268.
- Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J Neurosci.* 1994;14:459-471.
- Stangel M, Hartung HP. Remyelinating strategies for the treatment in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 2002;68:361-376.
- Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci.* 2001;24:386-391.
- Stidworthy MF, Genoud S, Suter U, Mantei N, Franklin JMR. Quantifying the Early Stages of Remyelination Following Cuprizone-induced Demyelination. *Brain Pathol.* 2003;13:329-339.
- Stocco C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids.* 2008;73:473-87.

- Strous RD, Spivak B, Yoran-Hegesh R, Maayan R, Averbuch E, Kotler M, Mester R, Weizman A. Analysis of neurosteroid levels in attention deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2001;4:259-264.
- Summers BA, Appel MJ. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994;20:525-534.
- Suzuki K, Kikkawa T. Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone). *Am J Pathol*. 1969;54:307-325.
- Takao T, Flint N, Lee L, Ying X, Merrill J, Chandross KJ. 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J Neurochem*. 2004;89:660-673.
- Taniike M, Mohri I, Eguchi, Beuckmann CT, Suzuki K, Urade Y. Perineuronal Oligodendrocytes Protect against Neuronal Apoptosis through the Production of Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in a Genetic Demyelinating Model. *J Neurosci*. 2002;22:4885-4896.
- Tardy M, Fages C, Le Prince G, Rolland B, Nunez J. Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. *Adv Exp Med Biol*. 1990;265:41-52.
- Taylor LC, Gilmore W, Jenny P, Ting Y, Matsushima GK. Cuprizone induces similar demyelination in male and female C57BL/6 mice and results in disruption of the estrous cycle. *J Neurosci Res*. 2010;88:391-402.
- Toda K, Simpson ER, Mendelson CR, Shizuta Y, Kilgore MW. Expression of the gene encoding aromatase cytochrome P450 (CYP19) in fetal tissues. *Mol Endocrinol*. 1994;8:210-217.
- Toran-Allerand CD, Miranda RC, Bentham WD, Sohrabji F, Brown TJ, Hochberg RB, MacLusky NJ. Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:4668-4672.
- 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.
- Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol*. 1999;12:295-302.
- Trapp BD. Distribution of the myelin-associated glycoprotein and P0 protein during myelin compaction in quaking mouse peripheral nerve. *J Cell Biol*. 1998;107:675-685.

- Triton x100 Solusyonunun Hazırlanması. http://www.utsouthwestern.edu/Yulab/Protocols/Cell_Stainin.pdf 2010.
- Tsutsui K, Ukena K, Takase M, Kohchi C, Lea RW. Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. *Comp Biochem Phys C*. 1999;124:121-129.
- Tsutsui K. Biosynthesis, mode of action and functional significance of neurosteroids in the developing Purkinje cell. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;102:187-194.
- Ukena K, Usui M, Kohchi C, Tsutsui K. Cytochrome P450 sidechain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology*. 1998; 139:137–147.
- Van Broekhoven F, Verkes RJ. Neurosteroids in depression: a review. *Psychopharmacol Ser*. 2003;165:97-110.
- Vandeveld M, Higgins RJ, Kristensen B, Kristensen F, Steck AJ, Kihm U. Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathologic, and immunohistological studies. *Acta Neuropathol*. 1982;56:285-293.
- Vandeveld M, Zurbriggen A, Higgins RJ, Palmer D. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol*. 1985;67:211–218.
- Vandeveld M, Zurbriggen A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol*. 2005;109:56-68.
- Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, Maggi A. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*. 2006;147:2263-2272.
- Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P, Maggi A. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:9614-9619.
- Venturini G. Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *J Neurochem*. 1973;21:1147–1151.
- Wakabayashi T, Asano M, Kurono C. Some aspects of mitochondria having a “septum”. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1974;23:247–254.
- Watanabe M, Hadzic T, Nishiyama A. Transient upregulation of Nkx2.2 expression in oligodendrocyte lineage cells during remyelination. *Glia*. 2004;46:311–322.
- Weimbs T, Stoffel W. Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: positions of free, disulfide bonded, and fatty acid thioesterlinked cysteine residues: implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry*. 1992;31:12289–12296.

- Wilkins A, Chandran S, Compston A. A Role for Oligodendrocyte-Derived IGF-1 in Trophic Support of Cortical Neurons. *Glia*. 2001;36:48–57.
- Williams A, Piaton G, Lubetzki C. Astrocytes friends or foes in multiple sclerosis? *Glia*. 2007;13:1300-1312.
- Winchell KH, Sternberger NH, Webster HD. Myelin-associated glycoprotein localized immunocytochemically in periaxonal regions of oligodendroglia during hexachlorophene intoxication. *Brain Res*. 1982;239:679-684.
- Wolswijk G. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. 1998;18:601-609.
- Wood DD, Vella GJ, Moscarello MA. Interaction between human myelin basic protein and lipophilin. *Neurochem Res*. 1984;9:1523–1531.
- Yanase T, Suzuki S, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H. Aromatase in bone: roles of Vitamin D3 and androgens. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;86:393-397.
- Yarim GF, Karahan S, Yarim M. Cerebellum progesterone concentration decreased in canine distemper virus infection. *Res Vet Sci*. 2007;82:173-180
- Yarim M, Gulbahar MY, Guvenc T, Karahan S, Harada N, Kabak YB, Karayigit MO. Aromatase expression in the cerebellum of the dog infected with canine distemper virus. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2010;123:301-306.
- Yarim M, Kabakci N. Distribution of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the cerebellum in canine distemper virus infection. *J Comp Path*. 2002;127:290-296.
- Zatta P, Raso M, Zambenedetti P, Wittkowski W, Messori L, Piccioli F, Mauri PL, Beltramini M. Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:1502–1513.
- Zeger M, Popken G, Zhang J, Xuan S, Lu QR, Schwab MH, Nave KA, Rowitch D, D'Ercole AJ, Ye P. Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia*. 2007;55:400-411.
- Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res*. 2007;39:85-95.
- Zucconi GG, Cipriani S, Scattoni R, Balgkouranidou I, Hawkins DP, Ragnarsdottir KV. Copper deficiency elicits glial and neuronal response typical of neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007;33:212–225.

Zurbriggen A, Schmid I, Graber HU, Vandeveld M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathol.* 1998;95:71–77.

Zurbriggen A, Vandeveld M, Dumas M, Griot C, Bollo E. Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection in vitro. *Acta Neuropathol.* 1987;74:366-373.

Zurbriggen A, Vandeveld M, Dumas M. Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro. *Lab Invest.* 1986;54:424-431.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mehmet Önder KARAYİĞİT

Doğum Yeri: OSMANİYE

Doğum Tarihi: 26.09.1977

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Yüksek Lisans (Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2004)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006-2012

e-posta: onderk@omu.edu.tr