



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RİFAMPİSİNİN İN VİTRO AKSOTOMİ MODELİNDE  
NÖROREJENERASYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

EBRU COŞKUN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ZÜBEYİR BAYRAKTAROĞLU

İSTANBUL-2018



Anne ve babama ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Anlayışı ve ilgisiyle rehberlik eden, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, İstanbul Medipol Üniversitesi Uluslararası Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi, tez danışmanım Doç. Dr. Zübeyir Bayraktaroğlu'na,

Tecrübe ve bilgi birikimlerini paylaşarak tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde destek olan hocalarım, Prof.Dr. Lütfü Hanoğlu'na, Prof. Dr. Burak Yuluğ'a ve Dr. Öğr. Ü. Mehmet Ozansoy'a,

Çalışmam esnasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, anlayışı ilgisi ve desteklerinden dolayı Dr. Beyza Ozansoy'a

Tez çalışmamda bana yardımcı olan arkadaşlarım, Gülsena Baydaş, Sadık Bay'a,

Yükseköğrenim hayatım boyunca birlikte olduğum, aynı aileden olmasak da kardeşlerim gibi gördüğüm, sevgi, güven ve destekleriyle beni güçlendiren dostlarım Mevhibe Sarıcaoğlu ve Ece Zeynep Karakulak'a,

Ve her zaman yanımda olan, maddi manevi desteklerini, sevgilerini hiçbir koşulda esirgemeyen, en büyük dayanaklarımdan olan çok sevdiğim annem Muteber Coşkun, babam Veyis Coşkun, canım kardeşlerim Rahman Coşkun ve Rahim Coşkun'a teşekkürlerimi sunarım.

<b>TEZ ONAY FORMU</b> .....	<b>i</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>İTHAF</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1.ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2.ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>4.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>6</b>
4.1.Merkezi Sinir Sistemi.....	6
4.1.1.Kortikal Nöron ve Bölümleri.....	7
4.1.2.Serebral Korteks.....	8
4.2.Merkezi Sinir Sistemi ve Rejenerasyon.....	11
4.3.Aksotomi.....	12
4.3.1.Aksotomi Sonrası Nöronal Yanıt Mekanizmaları.....	13
4.4.Rifampisin.....	14
4.4.1.Farmakolojik Özellikleri.....	14
4.4.2.Rifampisinin Nörodejeneratif Hastalıklara Etkisi.....	17
4.4.2.1.Rifampisin ve Alzheimer Hastalığı.....	17
4.4.2.2.Rifampisin ve Parkinson Hastalığı.....	21
4.4.2.3.Rifampisin ve Nöroinflamasyon.....	24
4.4.2.4.Rifampisin ve Serebral İskemi.....	25
4.4.2.5.Rifampisin ve Menenjit.....	25
<b>5.METOD VE MATERYAL</b> .....	<b>27</b>
5.1.Deney hayvanları .....	27
5.2.Kullanılan malzemeler .....	27
5.3.Hücre izolasyonu öncesi hazırlıklar ve hücre eldesi .....	29

	<b>Sayfa No.</b>
5.3.1.Kültür kabının hazırlanması .....	29
5.3.2.Kültürde kullanılacak besiyerlerinin hazırlanması.....	29
5.3.2.1.Diseksiyon besiyeri .....	29
5.3.2.2.Kültür besiyeri .....	29
5.3.2.3.Hücre Ekimi besiyeri .....	29
5.3.3.Diseksiyon.....	30
5.3.4.Kültür protokolü .....	30
5.3.4.1.Enzim inkübasyonu .....	30
5.3.4.2.Trituasyon .....	30
5.3.4.3.Santrifüj.....	30
5.3.4.4.Hücre Ekimi .....	31
5.4.Rifampisin Eklenmesi .....	31
5.5.Aksotomi Protokolünün Uygulanması .....	31
5.6.Propidium İyodür Boyaması.....	32
<b>6.BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
<b>7.TARTIŞMA .....</b>	<b>38</b>
<b>8.SONUÇ .....</b>	<b>41</b>
<b>9.KAYNAKLAR .....</b>	<b>42</b>
<b>10.ETİK KURUL ONAYI .....</b>	<b>50</b>
<b>11.ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>53</b>

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AH</b>	: Alzheimer Hastalığı
<b>ATF4</b>	: Activating transcription factor 4
<b>A<math>\beta</math></b>	: Amiloid Beta
<b>Bax</b>	: Bcl-2-associated X protein
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lymphoma -2
<b>Bcl-XL</b>	: B-cell lymphoma-extra large
<b>CDR</b>	: Clinical Dementia Rating
<b>COX-2</b>	: Cyclooxygenase-2
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	: eukaryotic Initiation Factor 2 alpha
<b>ERK</b>	: Extracellular signal-Regulated Kinases
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: Interleukin- 1 $\beta$
<b>JNK</b>	: c-Jun N-terminal Kinases
<b>MAPK</b>	: Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MPP+</b>	: 1-Methyl-4-PhenylPyridinium
<b>MPTP</b>	: 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidro-Pyridine
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>mTOR</b>	: mammalian Target of Rapamycin
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PGE2</b>	: Prostaglandin E2
<b>PH</b>	: Parkinson Hastalığı
<b>RIF</b>	: Rifampisin
<b>SADAS-cog</b>	: Standardized Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive section
<b>SMMT</b>	: Standardize Mini Mental Test
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tumor Necrosis Factor-alpha
<b>XIAP</b>	: X-linked inhibitor of Apoptosis Protein
<b><math>\alpha</math>Syn</b>	: Alpha Synuclein

## ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Sayfa No.

Şekil 4.1.2. Serebral Korteksin Laminar Organizasyonu.....	10
Şekil 4.4.1. Rifampisin Kimyasal Yapısı.....	15
Resim 6.1. Ekim yapıldıktan 1 saat sonra nöronların 20x objektifle ışık mikroskop görüntüleri.....	33
Resim 6.2. Ekim yapıldıktan 1 saat sonra nöronların 40x objektifle ışık mikroskop görüntüleri.....	34
Resim 6.3. Ekim yapıldıktan 20 saat sonra nöronların 20x objektifle ışık mikroskop görüntüleri.....	34
Resim 6.4. Ekim yapıldıktan 20 saat sonra nöronların 40x objektifle ışık mikroskop görüntüleri.....	35
Resim 6.5. 1µM lık RİF grubunun aksotomi öncesi ve PI boyama sonrası görüntüleri.....	35
Resim 6.6. 10µM lık RİF grubunun aksotomi öncesi ve PI boyama sonrası görüntüleri.....	36
Resim 6.7. 100µM lık RİF grubunun aksotomi öncesi ve PI boyama sonrası görüntüleri.....	36
Şekil.6.1. Deney gruplarındaki nöronal sağkalım değerleri.....	37

## 1.ÖZET

### RİFAMPİSİNİN İN VİTRO AKSOTOMİ MODELİNDE NÖROREJENERASYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Rifampisin, *Nocardia mediterranei* fermantasyon ürünü olan geniş spektrumlu antibiyotik sınıfı rifamisinlerin yarı sentetik bir türevidir. En yüksek serum konsantrasyonuna ağızdan alındıktan 1-4 saat sonra ulaşır ve plazma yarı ömrü 2-5 saattir. Son zamanlarda üzerinde durulan önemli özelliklerinden birisi anti-oksidan ve nöroprotektif etkinliğidir. Yapılan pek çok çalışma rifampisin mitokondriyal oksidatif stresin bastırılması ve serbest radikal süpürücü etkisi ile nöroproteksiyon sağladığı sonucuna varmıştır. Serbest radikal süpürme kabiliyetinin yanı sıra, rifampisin'in çeşitli pro ve anti apoptotik proteinler aracılığıyla apoptozu engelleyebileceği gösterilmiştir. Pro-apoptotik Bax'ın ekspresyonunu azalttığı ve Bcl-2, Bcl-XL, XIAP, cIAP2, FLIPs gibi anti-apoptotik gen ürünlerinin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Rifampisin etkinliğini vurgulayan çalışmalar ışığında bu projede akson hasarı sonrasında meydana gelen dejeneratif değişikliklere karşın rifampisin nöroprotektif, serbest radikal süpürücü ve antiapoptotik etkilerinin, in vitro aksotomi modelinde nörorejenerasyona etkisinin araştırılması planlandı. Çalışma kapsamında 0-1 günlük yenidoğan farelerden çıkartılan kortikal nöronlar primer hücre kültüründe yaşatıldı. Ardından in vitro hücre kültürlerine 1, 10 ve 100 µM rifampisin eklendi. Laser aksotomi protokolüyle aksonal hasar verildi. Dejenerasyona verilen aksonal yanıt mikroskopik görüntüleme ve propidium iyodür (PI) boyaması ile izlendi. PI boyama sonrasında yapılan analizlerde tüm RİF gruplarında hücresel canlılık aksotomi kontrol grubuyla kıyaslandığında artış gösterdi; ancak, bu etki RİF dozundan bağımsızdı.

**Anahtar Kelimeler:** Aksotomi, Rifampisin, Nörorejenerasyon, Nörodejenerasyon

Bu tez İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2017/11 proje numarası ile desteklenmiştir.



## **2.ABSTRACT**

### **THE EFFECTS OF THE RIFAMPICIN ON THE NEUROREGENERATION IN IN VITRO AXOTOMY MODEL**

Rifampicin is a semisynthetic derivative of the rifamycins, a class of broad-spectrum antibiotics that are fermentation products of *Nocardia mediterranei*. Rifampicin reaches maximal serum concentration in 1–4 h after application and its plasma half-life is 2–5 h. One of the important features that have recently been reported is the antioxidant and neuroprotective activity of rifampicin. Many studies have concluded that rifampicin provides neuroprotection by suppressing mitochondrial oxidative stress and free radical scavenging effect. In addition to the effect of free radical scavenging, rifampicin has been shown to downregulate the expression of pro-apoptotic Bax and upregulate the expression of anti-apoptotic gene products such as Bcl-2, Bcl-XL, XIAP, cIAP2, FLIPs. The effects of neuroprotective, free radical scavenging and antiapoptotic effects on neuroregeneration in in vitro axotomy model were planned to investigate the effects of rifampicin. In our study, we aim to remove cortical neurons from 0-1 day old newborn mice in order to provide a live primary neuronal cell culture. After 1-10 and 100  $\mu$ M rifampicin applied to the in vitro cell cultures, instructed the axonal damage via predefined laser axotomy protocol, and the axonal response to axotomy driven degeneration monitored by microscopic imaging and Propidium iodide staining. After PI staining, cell viability in all RIF groups increased compared to the axotomy control group, but this increase was not continued in a dose dependent manner.

**Keywords:** Axotomy, Rifampicin, Neuroregeneration, Neurodegeneration

This thesis was supported by the Istanbul Medipol University Scientific Research Projects Commission with project number 2017/11.

### 3.GİRİŞ VE AMAÇ

Rifampisin, *Nocardia mediterranei* fermantasyon ürünleri olan geniş spektrumlu antibiyotik sınıfı rifamisinlerin yarı sentetik bir türevidir. En yüksek serum konsantrasyonuna ağızdan alındıktan 1-4 saat sonra ulaşır ve yarı ömrü 2-5 saattir (1). *Mycobacterium tuberculosis* ve diğer mikrobakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (2). Çeşitli nörodejeneratif hastalık modellerinde nöroprotektif etkiler ürettiği bildirilmiştir (3).

Hücrel modelleri kullanarak yapılan araştırmalar, rifampisin'in Alzheimer hastalığı patolojisindeki temel süreçlerden olan nörotoksisiteyi azaltmak için  $\beta$ -amiloidin toplanması ve fibrilleşmesini inhibe ettiğini göstermektedir (4). İn vitro MPP+ toksisitesi ile Parkinson hastalığı oluşturulan bir çalışmada ise rifampisinin toksisite sonrasında dopaminerjik nöronların ve in vivo aksotomi uygulaması sonrasında retinal ganglion hücrelerinin sağkalımını kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (5). Ayrıca rifampisinin, yine Parkinson hastalığının başlıca patofizyolojik ajanlarından  $\alpha$ -sinüklein fibrilasyonunu inhibe ettiğini ve mevcut fibrilleri konsantrasyona bağlı bir tarzda ayrıştırdığı gösterilmiştir (6). Benzer bir çalışmada rifampisin ön-muamelesinin doza bağlı olarak hücre canlılığında artışa ve  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonunda azalmaya yol açtığı gözlenmiştir (7). Rifampisinin, lipopolisakkarit ile aktive edilmiş mikroglialar ile kokültüre edilen kortikal nöronların sağkalımını proinflamatuvar sitokinler üzerinden gösterdiği anti-inflamatuvar etkisi ile arttırdığı gösterilmiştir (8).

Literatürde daha pek çok örneği olan rifampisin kaynaklı nöroproteksiyon, rifampisinin serbest radikal süpürme kabiliyetine bağlanmıştır (9). Rifampisin ile tedavi edilen hayvanlarda bulgular, nigrostriyatal dopaminerjik nöronal yollarda oksidatif strese azalmaya ve nöroprotektif etkiye işaret etmektedir (10). İn vivo menajit modellerinde rifampisin ile tedavi edilen gruplarda serebrospinal sıvıdaki oksidatif stres belirteçlerinin konsantrasyonu ve dentat girustaki apoptotik nöron yoğunluğu azalmıştır. Ayrıca serebrospinal sıvı fagositlerinde reaktif oksijen türevlerinin üretimi rifampisin ile tedavi edilen grupta standart tedavi grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır (11)(3). Serbest radikal süpürme kabiliyetinin yanı sıra, rifampisinin çeşitli pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler aracılığıyla apoptozu

engelleyebileceği gösterilmiştir. Pro-apoptotik Bax'ın ekspresyonunu azalttığı ve Bcl-2, Bcl-XL ve XIAP, cIAP2, FLIPs gibi anti-apoptotik gen ürünlerinin ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir (5)(3).

Tüm bu sonuçlar rifampisin, anti-oksitatif ve anti-apoptotik mekanizmaları içeren nöronal hücre dejenerasyonunun üstesinden gelen potansiyel bir nöroprotektör ajan olarak desteklemektedir.

Aksotomi modeli, nöronal yaralanmayı gösterebilmek adına başarılı bir modeldir ve kontrollü, tekrarlanabilir ve büyümeye izin veren bir ortamda hasarlanan aksonların büyüme kapasiteleri üzerindeki dışsal ve içsel faktörlerin etkisini incelemeye olanak tanır. Nöronlar, hücre kültüründe defalarca gözlemlenebildiğinden, tek hücrelerin dinamik yenilenme davranışını analiz edilmesine olanak tanır(12).

Aksotomi sonrası lezyonun hem proksimalinde hem de distalinde hücre içine  $Ca^{+2}$  akışı (13) ve nöral transportun durdurulması (14) ile tetiklenen dejenerasyon söz konusudur. Hasarın ardından  $Ca^{+2}$ 'un bir nevrile akımının artması, aksotominin başarıyla oluşturulmasının bir ön şartıdır ve birçok yıkıcı hücre içi değişiklikten de sorumludur (15). Aksotomi sonrasında bozulan membran bütünlüğü nedeni ile hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi olur (16). Ayrıca aksonal hasar hücre içi  $Ca^{+2}$  depolarından (endoplazmik retikulum ve mitokondri),  $Ca^{+2}$  salınımına yol açar (17). Bunlara ek olarak, aksotomi nedeniyle oluşan depolarizasyon ile voltaj kapılı  $Ca^{+2}$  kanalları aktive olur ve hücre içine giren  $Ca^{+2}$  miktarı daha da artar (18).  $Ca^{+2}$  disregülasyonu, sitoplazmadaki kaspaz dışı bir proteaz olan kalpainin patolojik aktivasyonuna neden olur (19). Kalpain, kaspaz 9, 3 ve 7nin aktivasyonunu tetikler ve hücreyi apoptoza götürür (20).

İntra-aksonal  $Ca^{+2}$  toksik seviyelere yükseldiğinde, kalpainlerin aracılık ettiği ve kaspazlar yoluyla meydana gelen geri dönüşümsüz akson hasarına,  $Ca^{+2}$ -bağımlı fosfolipazların aktivasyonuna, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozulmasına ve serbest radikallerin oluşumuna neden olur (21). Serbest oksijen radikalleri oldukça reaktif moleküllerdir, hasarın ilerlemesine yol açarlar. Antioksidan ajanların, aksotomi ile indüklenen apoptoza karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (22) (5).

Merkezi sinir sistemi aksonlarının yaralanması, aksonal bağlantının kesilmesi yoluyla fonksiyon kaybına yol açabilir. Merkezi sinir sistemi aksonlarının rejenera

olmaması nedeniyle, bu yaralanmaların tedavisi ve fonksiyonel iyileşmenin başlatılması zorlaşır (12).

Hasar sonrası etkin bir sinir koruyucu tedavi henüz mevcut olmasa da patogeneizde önemli ölçüde oksidatif süreç ve apoptotik aktivasyon yer alır (18). Rifampisin'in nöroprotektif mekanizmalarda etkinliğinin vurgulayan yukarıdaki literatür ışığında bu çalışmada akson hasarı sonrasında meydana gelen bu dejeneratif değişikliklere karşı rifampisin'in nöroprotektif, antioksidatif, antiapoptotik etkilerinin in vitro aksotomi modelinde sağkalıma ve nörorejenerasyona etkisinin araştırılması planlandı.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Merkezi Sinir Sistemi

Sinir sistemi, en temelde merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. Sinir hücresi (nöron) ve glial hücreler olmak üzere iki ana grup hücreden oluşur. Glial hücreler nöronların hücre gövdesini, aksonunu, dentritlerini çevreleyerek destek sağlayan hücrelerdir ancak sayıca nöronlardan yaklaşık 10-50 kat daha fazladır. Bilgi süreçlerine doğrudan dahil olmasalar da başka yaşamsal görevleri vardır. Nöron ise sinir sisteminin esas sinyal ünitesi ve fonksiyonel birimidir. Bilgi içeren sinyalleri üretirler ve diğer nöronlara iletirler (23).

Merkezi sinir sisteminde 100 milyardan fazla nöron vardır. Merkezi sinir sistemi karmaşık bir yapıdır, insan genlerinin yaklaşık %40'ının belli bir oranda merkezi sinir sisteminin oluşumunda rol aldığı hesaplanmıştır (24).

Serebral hemisferler insan beyninin en geniş bölümünü oluştururlar. Beyin korteksi, altta yatan beyaz madde ve üç derin yapıdan oluşur: Bazal ganglionlar, amigdala ve hipokampus. Serebral hemisferler bellek, duygu gibi algısal, motor ve bilişsel işlevlerle ilgilidir. Amigdala, sosyal davranış ve duygunun ifadesi, hipokampus bellek ve bazal ganglionlar ise hareketin kontrolü ile ilgilidir.

Serebral korteks bilişsel yeteneklerle ilişkilidir. Serebral hemisferlerin ince dış tabakası olan serebral korteks, gündelik hayatta eylemlerin planlanması ve uygulanmasından sorumludur. Filogenetik olarak insanlar en ayrıntılı serebral kortekse sahiptir. Serebral korteks giruslar ve bu bölgeleri birbirinden ayıran oluklardan (sulcus) oluşan kıvrımlı bir yapıdır ve 2-4 mm kalınlığa sahiptir. Serebral korteksteki nöronların aralarındaki bağlantıların sayısı, korteksin bilgi işleme kapasitesinin önemli belirleyicilerinden biridir.

Serebral korteks üst kranial kemiklerden adını alan dört büyük loba ayrılır: frontal, parietal, temporal ve oksipital. Her lob birçok farklı fonksiyonel alan içerir. Beyin korteksinin iki ek bölgesi, korpus kallosumun dorsal yüzeyini çevreleyen singulat korteks ve frontal, parietal ve temporal lobların büyümesi yüzünden yüzeyde görünmeyen insular korteks (insula)'dir. Anatomik bölümlerin yanı sıra serebral korteks fonksiyonel olarak da farklı bölümlerden oluşur. Serebral korteksin birçok

alanı esas olarak duyuşal bilgilerin işlenmesi veya motor komutlarının verilmesi ile ilgilidir. Buna ek olarak, belirli bir duyuşal modalite veya motor işleve ayrılmış bir alan, bilgiyi işleme konusunda farklı roller taşıyan alt alanlar içerir. Bu alanlar, afferent yolaktaki bilgi işleme derecelerine bağılı olarak primer, sekonder veya tersiyer duyuşal veya motor alanlar olarak bilinir (23).

#### **4.1.1.Kortikal Nöron ve Bölümleri**

Merkezi sinir sisteminde bulunan nöronlar birbirlerinden çok farklı şekil ve büyüklükte olabilirler. Tipik bir nöron morfolojik olarak farklı bölümlerden oluşur, bunlar hücre gövdesi, akson, dentrit ve presinaptik terminaldir. Hücre gövdesi (soma) hücrenin metabolik merkezidir. Hücrenin genlerini depolayan nukleusu ve protein sentezlenen bölgelerdeki nukleusun uzantıları olan endoplazmik retikulumu bulundurur. Hücre gövdesi genelde yaygınca dallanmış dentrit ve uzun tübüler akson olmak üzere iki tip uzantı ortaya çıkarır. Dentritler ağaç gibi dallanırlar ve başka sinir hücrelerinden gelen sinyalleri almak için ana aygıttır. Aksine akson hücre gövdesinin kalınlaşmış bölümü olan akson tepesinden başlar, fibröz yapılıdır ve sinyalleri başka nöronlara taşımak için ana iletim aygıtıdır (23)

Tübüler akson, sona yaklaştığında her biri terminal tomurcuk adı verilen birkaç sinaptik düğümde sonlanan presinaptik terminallere ayrılır. Bu yumrulara sinirler tarafından sentezlenen nörotransmitterlerin bulunduğu veziküller bulunur. İki nöronun iletişim kurduğu nokta bir sinaps olarak adlandırılır. Sinyal ileten sinir hücresine presinaptik hücre adı verilir. Sinyali alan hücre postsinaptik hücredir.

Aksonların, nöronların iletilci birimi, uzunluğu büyük oranda değışkenlik gösterebilir; bazıları vücut içinde 3 m'den fazla uzayabilir. Merkezi sinir sistemindeki aksonların kalınlığı çoğı, hücre gövdesinin çapı ile karşılaştırıldığında çok incedir (23). Özellikle serebral kortekste bulunan dentritlerin, dentritik çıkıntılar adı verilen küçük yumru şeklinde uzantıları vardır (24).

Gelen sinyaller nörona genellikle nöronal dentritlerde bulunan ama hücre gövdesinin üzerinde de yer alan sinapslar aracılığıyla girer. Bir nöronda bu şekildeki girdi liflerinin sinaptik bağlantı sayısı, farklı nöron tipleri için birkaç yüz ile 200.000

arasında değişir. Bunun tersine çıkış sinyali, nöronlardan ayrılan tek bir aksonu kullanır. Daha sonra bu akson sinir sistemini diğer kısımlarına veya vücudun periferine uzanan pek çok dala ayrılır.

Nöronlar hücre gövdelerinden çıkan uzantıların sayısına göre; unipolar, bipolar ve multipolar şeklinde sınıflandırılmaktadır (24).

#### **4.1.2. Serebral Korteks**

Serebral korteks hücre katmanları halinde düzenlenmiş, oldukça kompleks, pek çok nöron ve glial hücre tipi içeren bir yapıdır. Katmanların kalınlığı ve işlevsel organizasyonlarının ayrıntıları korteks boyunca değişir. Serebral korteks temelde bilişsel işlevler, bilinç ve duysal algıdan sorumludur. Neokorteksin en tipik formu, korteksin dış yüzeyinden (pia mater) beyaz maddeye kadar altı tabakadan oluşur (23)(25).

Nöronların çoğu; granüler-stellat, fuziform ve piramidal hücrelerdir. Granüler nöronlar, genelde kısa aksonludur ve bu nedenle beyin korteksi içindeki kısa uzaklıklarda sinirsel bilgi taşırlar. Korteksin duysal alanları ile motor alanları arasındaki asosiyasyon alanları çok büyük yoğunlukta granüler hücre içerirler, bu da bu alanlara gelen bilginin kortekste önemli derecede işlemlendiğini düşündürür (26).

Serebral korteksteki tüm nöronların çoğunluğunu oluşturan piramidal hücreler, belirgin apikal dendrit ve bazal dendritik ağacı ile ayırt edilir. Apikal dendrit nöronun apeksinden çıkar, moleküler tabakaya doğru ilerler. Yatay yönde uzanan bazal dendritler ve somanın alt tabanından çıkan aksondan oluşur (27). Korteksteki neredeyse bütün kortikokortikal ve subkortikal zengin bağlantıları oluştururlar. Bu hücreler eksitatör nörotransmitterlerden olan glutamat içerirler ve kortikal aktiviteyi uyarırlar, kortikal aktiviteyi başlatıcı uyarımın piramidal nöronlar tarafından sağlandığı düşünülür. Ayrıca piramidal nöronlar da kendi içinde nöron alttipleri barındırır (28). Piramidal ve fuziform hücreler, korteksten diğer yapılara uzanan çıkış liflerinin kaynağını oluşturur. Piramidal hücreler fuziformlara nazaran daha büyük ve çok sayıdadırlar (26).

Serebral korteksin katmanlı yapısına daha yakından bakacak olursak,

Katman I, moleküler tabaka olarak adlandırılan asellüler bir tabakadır, birkaç dağınık nöron barındırabilir. Kortekste daha derinlerde bulunan hücrelerin dendritleri ve bu tabaka içinde dolaşan veya bağlantılar oluşturan aksonları da içerisinde bulundurur.

Katman II, eksternal granüler hücre tabakası olarak adlandırılan bu bölüm temel olarak küçük piramidal nöronlardan ve stellat nöronlardan oluşur.

Katman III, katman II gibi eksternal granüler tabaka olarak adlandırılır, ancak tipik olarak daha büyük piramidal nöronlardan oluşur.

Katman I, II ve III temel olarak nöronların yatay bağlantıları aracılığıyla korteksiçi-intrakortikal asosiyasyon işlevlerini üstlenmiştir (26).

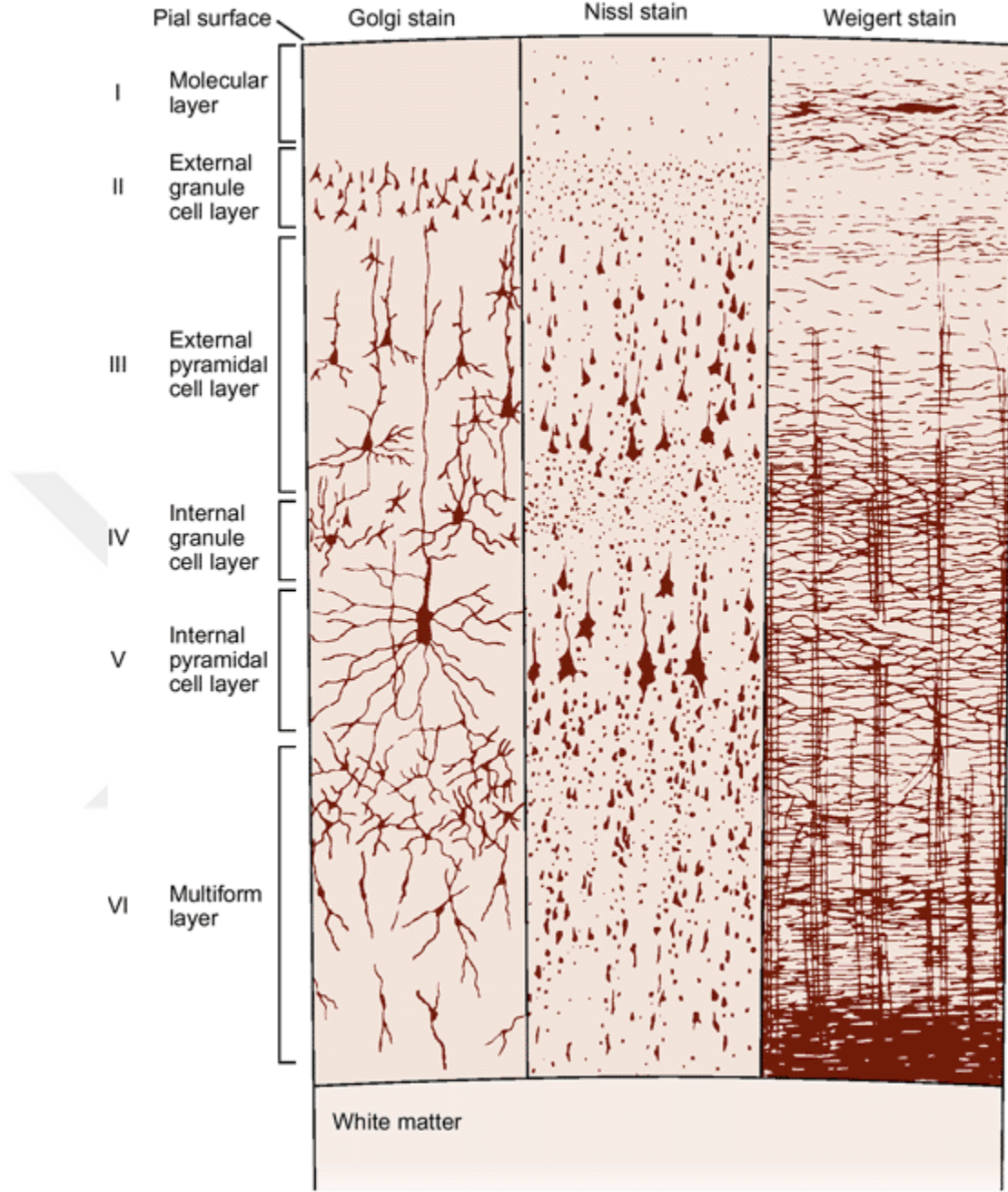
Katman IV, iç granül hücre tabakası olarak adlandırılır, stellat ve piramidal nöronların farklı tiplerini bulundurur (23). Bedenden gelen duysal bilgi 4. katmanda sonlanır (26).

Dahili piramidal hücre tabakası olan Katman V, tipik olarak katman III'dekilere göre daha büyük piramit şeklinde hücreler içerir. Bu büyük hücre gövdeli piramidal nöronlar daha çok korteksi terk eden uzun aksonlara sahiptir.

Katman VI, oldukça heterojen bir nöron tabakasıdır ve bu nedenle polimorfik veya çok katmanlı tabaka da denir. Korteksin derin sınırını oluşturan beyaz maddeye karışır ve aksonları kortekse veya korteksten dışarı taşır.

Beyinden çıkan sinyaller daha çok katman V ve VI'dan kaynaklanır ve bunların beyin sapı ve omuriliğe uzanan uzun aksonlu olanları katman V'den, talamusa gidenlerin çoğu ise katman VI'dan köken alır (26).





**Şekil 4.1.2.** Serebral Korteksin Laminar Organizasyonu. Serebral korteks tabakalar halinde düzenlenmiştir. Korteksin nasıl görüneceği boyamak için kullanılan yöntemeye bağlıdır. Golgi boyası nöronal hücre cisimcikleri ve dendritik uzantıları, Nissl yöntemi, hücre gövdelerini ve proksimal dendritlerini, Weigert boyası ise miyelinli uzantıları boyayarak aksonal dağılım modelini ortaya çıkarır (23).

Her ne kadar serebral korteks tabakası nöronal hücre gövdelerinin varlığı veya yokluğu ile tanımlanmasına rağmen, her katman diğer başka katmanlardan ilave

elementler de içerir. Böylece, Katman I ve III, katman V ve VI'da hücre gövdeleri bulunan nöronların apikal dendritlerini içerirken, katman V ve VI, katman III ve IV'de hücre gövdeleri bulunan nöronların bazal dendritlerini içerir. Bir kortikal nörona gelen sinyallerin profili, hücre gövdesinin yerinden ziyade dendritlerin dağılımına bağlıdır. Laminar organizasyon tüm kortikal bölgelerde aynı dağılımı göstermeyebilir (23).

#### **4.2.Merkezi Sinir Sistemi ve Rejenerasyon**

Sinirbilimciler yapılan pek çok çalışma sonucunda olgun MSS nöronlarının rejenerasyon kapasitesinin çok az olduğu veya hiç olmadığı sonucuna varmışlardır. Olgun merkezi sinir sistemi, hasar gördükten sonra iyileşmeye dirençli bir dokudur (29). Gelişimsel olarak içsel onarım kapasitesinin yitirilmesinin ve yaralanma nedeniyle oluşan inhibitör çevresel ortamın yaralanma sonrası MSS'deki rejenerasyon eksikliğinin ana sorumluları olduğu düşünülmektedir (30). Olgun MSS nöronlarının aksine kültürde embriyonik 18 günlük kortikal nöronlar, nöritlerinin %50'sini, hipokampal nöronlar ise neredeyse tamamını hasar sonrası rejenerasyon edebilir. Aksotomi neredeyse her zaman hasar sonrası birkaç saatte büyüme konisinin oluşumunu sağlayarak rejenerasyona neden olur (16). Ayrıca Merkezi sinir sisteminde rejenerasyonla ilişkili ve aksonun yeniden büyümesi ve iyileşmesi için gerekli olan genlerin yukarı düzenlenmesi ve ifadesi periferik sinir sistemine kıyasla daha azdır. Ekspresyon düzeylerindeki bu azlığın merkezi sinir sisteminde rejenerasyonun sınırlı olmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (31) (29).

Hasarlı aksonal bölgede meydana gelen anormal sinaptogenesis ve kortikal gelişim sonrasında promoter bölgelere ulaşımın azalması sonucunda da aksonal büyüme ve rejenerasyon kısıtlanmaktadır (32). Reaktif astrositler ve microglia da aksonal rejenerasyon için olumsuz bir ortam oluşturur. Ayrıca ekstrenal bir faktör olarak miyelin kaynaklı inhibe edici faktörler aksonal rejenerasyonu engelleyebilir. MSS'de nörorejenerasyon, glial hücrelerin inhibitör etkileri ve miyelin ile ilişkili inhibitörlerin, astrositlerin, mikrogliaların, oligodendrositlerin ve bunların öncüllerinin göçüyle oluşan inhibitör hücre dışı büyüme ortamı nedeni ile sınırlanmaktadır. MSS'de özellikle travmaya maruz kalmış bu ortam, miyelinin ve nöronların onarımını olumsuz etkiler (33). Son zamanlarda ortaya koyulan bulgular, hasarlanan olgun MSS nöronlarının, inhibitör ortam yerine uygun ortam sağlandığında yeniden akson uzatabileceklerine ve muhtemelen başlangıçtaki hedefleri ile tekrar

sinaptik bağlantı kurabileceklerine işaret etmektedir (34)(31). Ancak bu inhibe edici moleküllerin genetik silinmesi veya farmakolojik inhibisyonu aksonda uzun mesafeli rejenerasyon yerine sadece sınırlı filizlenmeye sebep olduğundan rejenerasyonun önündeki tek engel olarak bu eksternal inhibe edici faktörlerden bahsedilemez (35).

mTOR hücre büyümesi, protein translasyonu gibi pek çok diğer süreçleri kontrol etmek için çeşitli sinyalleri birleştiren bir sinyal yolağıdır. Ayrıca aksonal büyüme için gerekli olan protein sentezinin mTOR aktivitesi ile kontrol edilebileceği öne sürülmüştür (36). Olgun MSS aksotomilerinin ardından oluşan stres yanıtı, zaten gelişimle birlikte azalan mTOR aktivitesini daha da azaltarak rejenerasyon için gerekli proteinlerin sentezini başlatma yeteneğini oldukça kısıtlar. Hala gelişimsel veya hasar sonrası mTOR aktivitesini düzenleyen mekanizmalar açıklığa kavuşturulamamıştır. Translasyon mekanizmalarına ek olarak proteinlerin posttranslasyonel olarak daha çok hücre döngüsünde çalışılan, post mitotik nöronlarda üretilen, anafaz destekleyici kompleksin (anaphase-promoting complex) aksonal büyüme için gerekli olan prerejeneratif moleküllerin degradasyonuna neden olarak rejenerasyonu etkileyebileceği öne sürülmüştür (35).

Tüm bu içsel ve dışsal inhibitör etkiler nedeniyle herhangi bir hasar sonrası aksonal rejenerasyon oldukça sınırlıdır hatta spontan olarak gerçekleşmez. Bu nedenle omurilik yaralanması, travmatik beyin hasarı, inme ve aksonal bağlantının kesildiği pek çok durumdan sonra bireylerde işlevsel kayıplar geri dönmez (31).

MSS'nin yaralanmasını takiben, rejenerasyon aksınları ve sinir terminalleri, fonksiyonel iyileşme sağlamak için hedefleri doğrultusunda konformatif özelliklerini tekrar kazanmaları gerekmektedir (34).

### **4.3.Aksotomi**

Aksotomi, nöronal yaralanmayı gösterebilmek adına başarılı bir modeldir, büyüme için izin veren bir ortamda yaralı aksınların büyüme kapasiteleri üzerindeki dışsal ve içsel faktörlerin etkisini incelemeye olanak tanır. Nöronlar, hücre kültüründe defalarca gözlemlenebildiğinden, tek hücrelerin dinamik yenilenme davranışını analiz etmeye izin verir (12).

#### 4.3.1. Aksotomi Sonrası Nöronal Yanıt Mekanizmaları

Akson dejenerasyonu, akson morfolojisinde başlatılan metabolik, inflamatuvar, mekanik, kalıtsal, toksik ve iskemik / hipoksik hasarları içeren birçok yaralanmada nöronda oluşan zamansal nöropatik değişikliğin bir sonucudur. Mekanik bir travma modeli olan aksotomi sonrası membran  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPaz aktivitesi azalır ve intraaksonal  $\text{Na}^+$  artışı,  $\text{K}^+$  kaybı ve aksolemmal depolarizasyon oluşur. Bu intraaksonal koşullar altında, nöron hücre içindeki  $\text{Na}^+$  miktarını azaltabilmek için  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{+2}$  değiştiricisini tersine çevirir. Bu da aşırı aksonal  $\text{Ca}^{+2}$  girişi ve birikimi ile sonuçlanır. Aksonal  $\text{Ca}^{+2}$  birikimi,  $\text{Ca}^{+2}$  ile uyarılan süreçler aracılığı ile dejenerasyonu başlatır.  $\text{Ca}^{+2}$  akımının, kendi kendini yok eden bir sekonder biyokimyasal değişim basamağını tetiklediği varsayılmaktadır:  $\text{Ca}^{+2}$  bağımlı fosfolipazların ve proteazların aktivasyonu, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozulması ve serbest radikallerin oluşumuna yol açar (13).

Apoptoz MSS patolojik durumlarında görülen hücre ölümünün ana sebebidir. Kalpain sitoplazmada bulunan bir proenzimdir ve hücre içi serbest  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu normal aralıktaki olduğu sürece inaktif haldedir (22). Kalpainlerin tüm fizyolojik fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, geçici kalpain aktivasyonu, hücre sinyalleri, sinaptik plastisite ve protein döngüsü gibi temel fonksiyonlarla ilişkilidirler. Hücre içi serbest kalsiyum, kalpain aktivasyonunun birincil düzenleyicisidir, ancak kalpainler ayrıca belirli bir inhibitör protein olan kalpastatin ile etkileşim yoluyla düzenlenir (37).

Hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonundaki artış, kalpainin aktivasyonunu tetikler. Patolojik durumlarda, hücre içi serbest  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunda artış, kalpainin her iki alt ünitesinin N-terminal propeptid proteinlerinin otolizinin tetiklendiği konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve kesilmiş alt ünitelerin ayrılması enzim aktivasyonuna neden olur. Aktive kalpain daha sonra substrat proteinlerini parçalar (38).

Kalpain substratları çok çeşitli proteinlerdir. A-fodrin ve nörofilamentler gibi hücre iskelet proteinleri, iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri, adhezyon molekülleri, enzimlerin ve miyelinin protein bileşenlerini içerir. Nükleoskeletal

protein lamin A ve B gibi birkaç kalpain substratı da çekirdeğin içinde bulunur. Kalpain substratı olan bu proteinler normal hücrel fonksiyon ve hayatta kalma için gerekli olan nöronal yapısal bütünlüğün muhafaza edilmesine katılır ve bunların parçalanması apoptozise yol açar.İlginç şekilde, kalpastatin kalpain için bir substrat olabilir (19).

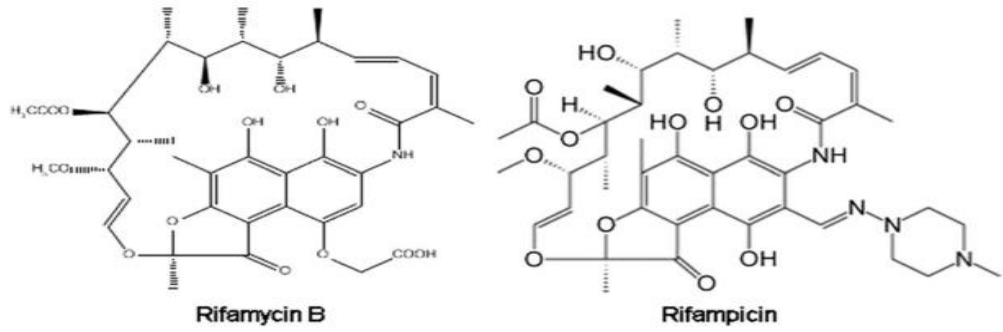
Aktif kalpain, Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik üyesi olan Bid'i kesebilir. Kesilmiş Bid (t-bid)'in mitokondriyal geçirgenlik porları ile etkileşimi mitokondriyal membran potansiyel kaybına neden olur (39). Bunu da Bax ve/veya Bak'ın oligomerizasyonu ve mitokondriyal dış membran içine sokulmasını indüklemesi yoluyla gerçekleştirir. İntermembranal boşluktan sitokrom c de dahil olmak üzere birkaç protein salınır (40). Sitokrom c, bağlayıcı protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ile etkileşerek apoptozom kompleksinin heptamerik omurgasını oluşturur (41). Sitokrom c, monomerik Apaf-1'e bağlanır ve konformasyonel değişikliğe ve oligomerizasyona yol açar. Prokaspaz-9, apoptozomu oluşturan heptamerik Apaf-1 komplekslerine yönlendirilir. Bu yönlendirme, kaspaz-9'un aktivasyonuna ve kaspaz-9 aracılı bölünme yoluyla, yürütücü kaspazlar- 3 ve -7'nin aktivasyonuna yol açar (42). Bu da ölüme neden olan alt tabakaları parçalamakta ve genomik DNA'yı parçalara bölen ve apoptotik nükleer morfolojiye neden olan endonükleazları aktive etmektedir (22).

#### **4.4. Rifampisin**

##### **4.4.1.Farmokolojik Özellikleri**

Rifampisin, *Nocardia mediterranei*'nin doğal metabolitleri olan rifamisinlerin kimyasal modifikasyonunun kapsamlı bir programının bir parçası olarak Dow-Lepetit Araştırma Laboratuvarlarında (Milan, İtalya) geliştirildi. Başlangıçta *Streptomyces* cinsine ait olduğu düşünülen ancak daha sonra *Nocardia mediterranei* nin fermantasyon kültürlerinden elde edildiği görüldü. Sonrasında bu antibiyotikğin 5 farklı maddeden oluştuğu bulundu, rifamisin A-E olarak yeniden adlandırıldı. Rifamisin B, kompleksin saf kristal biçiminde izole edildiği tek ürün, karışımın küçük bir bileşenidir. Rifamisinlerin geliştirilmesinde önemli bir adım, *N. mediterranei*'nin %0,2 sodyum dietilbarbitüratı içeren bir ortamda neredeyse yalnızca rifamisin B'yi

ürettiğinin keşfedilmesi idi. Rifamisin B, rifamisin kompleksinin en az aktif bileşeniydi ancak teröpatik olarak bekleneni veremedi, hayvanlarda enfeksiyonlarda aşırı derecede düşük toksisite ve orta düzeyde teröpatik aktivite gösterdi. Rifamisin B, tüberküloz tedavisinde sporadik olarak klinikte kullanılmış olsa da iyi gastrointestinal sistem emilimine sahip bir oral eşdeğeri aranmaya devam etti.



Şekil 4.4.1. Rifampisinin kimyasal yapısı

Rifamisin B ile ilgili çalışmalarda, bu maddenin sulu bir oksijenli solüsyonda kendiliğinden "aktivasyon" altına girdiği gözlemlendi. Aktivasyon süreci, rifamisin B'nin bir molekül glikolik asit kaybetme sürecinde rifamisin S'ye hidrolize edildiğine karar verilerek açıklığa kavuşturuldu. Rifamisin S'nin hafif redüksiyonu ile rifamisin SV elde edildi. Rifamisin SV, mycobacterium tuberculosis de dahil olmak üzere gram pozitif bakterilere karşı aşırı derecede etkilidir ve bazı gram negatif bakterilere karşı orta düzeyde aktiftir. Ancak Rifamisin B ile benzer bir sorunla karşılaşıldı. Gastrointestinal sistemde kısmen absorbe olduğundan, oral uygulama, kanda saptanabilir seviyelere yol açmıyordu. Parenteral yolla uygulandığında, rifamisin SV safra içinde yüksek konsantrasyonlara ulaşarak karaciğer tarafından oldukça çabuk atıldı. Bu nedenle kemoterapötik özelliklerde rifamisin SV üzerinde, daha iyi oral absorpsiyon; kandaki antibakteriyel seviyelerin uzaması ve mikrobakteriyel enfeksiyonlara ve gram negatif bakterilere bağlı enfeksiyonlara karşı daha fazla etkinlik iyileştirmelerini içeren yeni bir strateji planlandı.

1965 yılında, bu strateji sonucunda çeşitli deneysel enfeksiyonlarda, 3-formilrifamisin SV'nin, rifampisin veya rifampin olarak adlandırılan N-amino-N'-

metilpiperazin (şekil 4.4.1) ile hidrasyonunun oral uygulama için en aktif ve en az toksik olduğu form olduğu bulundu. Bu nedenle, klinik çalışmalar için rifampisin seçildi. Kimyasal olarak rifampisin, 3-formil rifamisin SV'nin, tetrahidrofuranda 1-amino-4-metilpiperazin ile reaksiyona sokulmasıyla elde edildi (43, 44)(45).

Özetle, rifampisin, *Nocardia mediterranei* fermantasyon ürünleri olan geniş spektrumlu antibiyotik sınıfı rifamisinlerin yarı sentetik bir türevidir (1). *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* ve diğer mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılır (2). Pek çok nörodejeneratif hastalık modelinde nöroprotektif etkiler ürettiği bildirilmiştir (3).

Rifampisinlerin ortak yapısı bir alifatik ansa zincirinin kapsadığı bir naftalohidrokinon ya da naftokinon kromofordur. Bu lipofilik ansa zinciri esas olarak ilacın kan-beyin / retina bariyerleri boyunca taşınmasından sorumludur (5). Ayrıca bütün rifampisin türevlerinde ortak bir yapı olan naftohidrokinon halkasını serbest radikal süpürme yeteneğinden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (4). Başka bir çalışmada spesifik olarak naftohidrokinon halkasının C-1 pozisyonunda bulunan hidroksil grup ve antioksidan süpürücü etkisi gösterilmiştir (9).

Rifampisin *Escherichia coli*, *pseudomonas*, indol pozitif ve indol negatif gibi gram negatif bakterilere ek olarak pek çok gram pozitif bakterinin üremesini inhibe eder (1).

Rifampisin, mikroorganizmalarda DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimini stabil bir ilaç enzim kompleksi oluşturarak inhibe eder. Böylece RNA sentezini zincir oluşumunun başlangıç aşamasını baskılar. Ökaryotlar hücrelerden elde edilen RNA polimerazlar rifampisine bağlanmazlar. Bu sayede rifampin ökaryotik hücrelerde RNA sentezini engellemez. Memeli mitokondrisindeki RNA sentezini, viral DNA bağımlı RNA polimerazlar ve revers transkriptazları ise ancak çok yüksek konsantrasyonlarda inhibe edebilirler.

Rifampisin oral kullanımdan sonra 2-4 saatte doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Gastrointestinal sistemden emilmesinin ardından hızlıca safraya atılır ve enterohepatik döngüye girer. İlaç yavaş bir şekilde deasetilasyona uğrar ve 6 saat sonra safra içerisindeki tüm antibiyotik antimikrobiyal aktiviteyi tamamen taşıyan deasetile

forma dönüşür. Ve buradan tüm vücuda dağılır. Pek çok oranda ve serebrospinal sıvı dahil olmak üzere vücut sıvılarında etkin konsantrasyonlarda bulunur (46).

#### **4.4.2.Rifampisin Nörodejeneratif Hastalıklara Etkisi**

Rifampisin pek çok nörodejeneratif hastalık modelinde çalışılmış olup anti-oksitatif, anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özellikler gösterdiği literatürde belirtilmiştir.

##### **4.4.2.1.Rifampisin ve Alzheimer Hastalığı**

Rifampisin Alzheimer hastalığında protektif etkisi bildirilen bir ilaçtır (47). Ancak altında yatan mekanizma tamamıyla bilinmemektedir. Mekanizmayı açıklığa kavuşturmak için pek çok çalışma yapılmıştır.

Tomiyama ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rifampisin, Alzheimer hastalığının baş sorumlularından olan sentetik amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ )'nin fibril formasyonunu ve toplanmasını önlediği ve feokromasitoma PC12 hücrelerini  $A\beta$ 'nin tetiklediği toksisiteden koruduğu görülmüştür (4). Aynı çalışmada  $A\beta$  toksisitesinin serbest radikaller üzerinden etki gösterdiği belirtilerek farklı rifampisin türevleri denendiğinde benzer etki görülmüştür. Bunun sonucunda da bütün rifampisin türevlerinde ortak bir yapı olan naftohidrokinon halkasını (naftokinon) serbest radikal süpürme yeteneğinden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. Diğer bir çalışmada rifampisin  $A\beta$  birikimi ve toksisitesini inhibe etme yeteneğinin esas sorumlusu olarak naftohidrokinon halkasının C-1 pozisyonunda bulunan hidroksil grubu aynı zamanda antioksidan süpürücü etkisinden sorumlu tutulmuştur ve rifampisin inhibitör etkisi doğal serbest radikal süpürücülerle (alfa-tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), ve  $\beta$ -karoten (provitamin A)) karşılaştırılmıştır (9). Bu doğal vitaminlerin de  $A\beta$  birikimi ve toksisitesine karşı inhibitör etkisinin olduğu ancak bu etkinin rifampisinle karşılaştırıldığında oldukça zayıf kaldığı görülmüştür. Vitaminlerin rifampisin ile aynı inhibitör etkiyi meydana getirebilmeleri için ancak 10-100 kat fazla konsantrasyonlarda kullanılması gerekmektedir. Aynı ekibin yaptığı bir başka çalışmada ise rifampisin  $A\beta$  fibrillerine bağlanarak hücre yüzeyindeki  $A\beta$ -RAGE etkileşimini inhibe ettiği böylece  $A\beta$  konformasyonunu değiştirerek toksisiteyi engellediği görülmüş ve rifampisin amiloid toksisitesini amiloid hücre etkileşimini



inhibe eden amilod bağlanması ve peptid birikimini inhibe eden serbest radikal süpürücü etkisi olmak üzere iki farklı mekanizma ile inhibe ettiğini öne sürülmüştür (48). Başka bir in vitro çalışmada ise amiloidoz meydana getirmek için fibril oluşturma yeteneğine sahip ve amiloid fibrillerinin oluşmasını tetikleyen bir enzim olan hen egg-white lysozyme modeli kullanılmıştır (49). Rifampisin, doz bağımlı şekilde bu modelde de amiloid fibrilogenezi inhibe etmiştir.

Ayrıca farelerle yapılan bir in vivo çalışmada rifampisinin kan beyin bariyerindeki LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1) ve P-GP (P-glycoprotein) reseptörlerinin upregulasyonu yoluyla A $\beta$  nın beyinden temizlenmesini arttırdığı gösterilmiştir (50). Ayrıca bu upregulasyonların A $\beta$  temizlenmesini tetiklediği brain efflux indexi kullanarak gösterilmiştir. Ancak yazarlar rifampisinin AH daki tek protektif etkisinin bu yolla gerçekleşmeyeceğini ve ek mekanizmalar da olabileceğini öne sürmüştür.

P-GP reseptörlerinin A $\beta$  temizlenmesindeki rolü üzerine yapılan bir in vivo başka bir çalışmada, P-GP reseptörünün A $\beta$ 'nin beyinden dışarı taşınmasında çok önemli bir rolü olduğu, P-GP reseptör miktarı ile A $\beta$ 'nin hücre içi birikimi arasında negatif ilişki olduğu öne sürülmüştür (51). Ayrıca rifampisin P-GP upregulasyonu yoluyla A $\beta$ 'nin taşınmasını sağlayarak, hücre içi birikimini azalttığı (%16), kognitif fonksiyonları iyileştirdiği, A $\beta$ 'nin indüklediği nörotoksisiteden nöronları koruduğu gösterilmiştir. Aynı ekibin devam niteliğinde yaptıkları çalışmada ise rifampisinin doz bağımlı olarak P-GP ekspresyonunu kontrol gruplarına kıyasla 4-6 kat arttırdığı ve Ayrıca P-GP 'n ürünü olduğu MDR1 geninin mRNA seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (52).

Demans modeli oluşturulmuş sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise rifampisinin hafıza bozukluklarını ve lokomotor aktiviteyi iyileştirdiği görülmüş ve hafıza bozukluklarındaki iyileşmede, rifampisinin antikolinesteraz, anti oksidatif, anti inflamatuvar ve amiloid karşıtı özelliklerinin etken olabileceği öne sürülmüştür (53). Rifampisinin, nükleer reseptör olan pregnan X reseptörlerinin agonisti olduğu ve bu reseptörler üzerinden oksidatif stres, nötrofilik infiltrasyon, amiloid birikimi ve asetilkolinesteraz aktivitesini önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir (47). Bu çalışma önceki çalışmalardan farklı olarak, rifampisin'in anti-oksidatif, anti-inflamatuvar ve

amiloid düşürücü etkilerinin yanı sıra anti-kolinesteraz aktivitesi ile kolinerjik nörotransmisyonu artırabileceğini de göstermiştir. Ayrıca pregnane X reseptörü, P-GP reseptörünün önemli bir transkripsiyon regülatörüdür. Kan beyin bariyerinde P-GP reseptörünün restorasyonu, A $\beta$  'nın beyinden elimine edilmesini arttıracak, PXR'nin ise bu yolla protektif etkiler üretebileceği düşünülmüştür (54). Daha ileri farmakolojik çalışmalarda rifampisin hücre içine girdiğinde ligand olarak nükleer reseptör pregnan X'e bağlanabileceği ve PXR ile bir kompleks oluşturup hedef genlere bağlanarak transkripsiyonu aktive ettiği öne sürülmüştür (46). Temel ilaç metabolizmasında rol alan bir enzim ve PXR'nin hedef genlerinden olan sitokrom P4503A4'ün rifampisin kaynaklı ekspresyonundaki histon modifikasyonlarını inceleyen başka bir çalışmada ise rifampisin tedavisi, PXR'nin histon modifikasyonlarını sağlayan kofaktörler ile etkileşimini ve nükleer birikimini arttırmıştır (55). Buradan da histon metilasyonu ve asetilasyonundaki değişikliklerin, PXR aktivasyonu yoluyla rifampisin ile CYP3A4 indüksiyonunda rol oynadığını sonucuna varılmıştır. CYP3A4, ağırlıklı olarak karaciğer ve ince bağırsakta eksprese edilir ve bu, terapötik ilaçların %50' sinden fazlasının oksidasyonundan sorumlu bir enzim olarak eksojen kimyasalların oksidatif biyotransformasyonunda önemli bir rol oynar. PXR ligandları, PXR'nin ligand-bağlama alanına (LBD) doğrudan bağlanır ve PXR'nin çekirdeğe translokasyonunu sağlar. Rifampisin insanda CYP3A4'ün çok güçlü bir indükleyicisidir. Farelerde yüksek doz rifampisin etkilerini araştıran bir çalışmada ise yüksek doz rifampisin PXR'nin nükleer birikimini arttırdığı, indirekt aktivasyonunu sağladığı ve CYP3A4'ün de dahil olduğu PXR hedef genlerinin ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür (56). PXR'nin fonksiyonu farklı kinazlar tarafından fosforilasyonla modüle edilir. İn vitro yapılan başka bir çalışmada CYP3A4'ün PXR aracılı indüksiyonunda c-Jun-N-Terminal kinazların ve diğer muhtemel kinazların fonksiyonu araştırılmıştır (57). JNK inhibitörü ile muamele edildiğinde CYP3A4'ün PXR aracılı indüksiyonunun yanı sıra gen ekspresyonu ve enzim aktivitesinin de azaldığı görülmüştür. siRNA ile JNK susturulduğunda ise aktivatörü kabul edilen rifampisin kaynaklı CYP3A4 indüksiyonu zayıflamıştır. Ayrıca JNK inhibitörü rifampisin kaynaklı JNK aktivasyonunu da azaltmıştır. RİF ile muamele önceki çalışmalarla benzer şekilde PXR nükleer seviyelerini ve CYP3A4 promotörüne bağlanmasını arttırırken, JNK inhibitörüyle bu etkiler zayıflamıştır. Tüm

sonuçlar göz önüne alındığında alışmacılar, JNK'nın PXR aracılı CYP3A4 indüksiyonunun mekanik regülatörü olabileceğini öne sürmektedir. Başka bir çalışmada ise miRNA-18a-5p gibi davranan moleküller hücelere eklendiğinde PXR'nin mRNA ve protein düzeylerini azalttığı, PXR negatif regülatörü olduğu görülmüştür. Ayrıca bu azalma CYP3A4 gibi PXR hedef genlerinde de olmuştur (58). Ortama miRNA gibi davranan moleküllerin eklenmesi söz konusu olmadan sadece rifampisin ile muamele edildiğinde ise endojen miRNA-18a-5p ekspresyonu azalmış, PXR zerindeki baskı azaltılmıştır. miR-18a-5p'nin baskılanması hücre invazyonunun inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir ve apoptozu teşvik etmiştir. Rifampisinden de PXR agonisti olarak söz edilmektedir.

Umeda ve arkadaşlarının çeşitli transgenik fareler kullanarak yaptığı bir çalışmada, rifampisin A $\beta$  ve tau karştı etkileri incelenmiştir. Bir ay kullanılan rifampisin, A $\beta$  oligomer birikimini, tau hiperfosforilasyonunu, sinaps kaybını ve mikroglyal aktivasyonu doz bağımlı olarak azalttığı, hafızayı geliştirdiği görülmüştür (59). Bunlara ek olarak da rifampisin hipokampüste kaspaz-3 aktivasyonunu ve mitokondriden sitokrom c salınımını azaltarak antiapoptotik etkiler sağladığı görülmüştür. Ve otofaji lizozomal fonksiyonu restorasyonunu uyardığı düşünülmektedir.

İlaçla düzenli olarak tedavi edilen lepralı hastalarda daha az oranda demans görüldüğünün yayınlanmasından sonra Namba ve arkadaşları nöropatolojik işaretilere bakmak için postmortem beyin analizlerini içeren bir deney tasarımı yaparak yıllardır rifampisinle tedavi edilen ve demans öyküsü bulunmayan 16 lepralı hasta ile 140 demans öyküsü bulunmayan yaşlı bireyin temporal lob, hipokampüs, parahippokampal bölge ve oksipitotemporal bölgedeki nörofibriler yumru (NFT) ve senil plak miktarını karşılaştırdılar, NFT miktarında herhangi bir beyin bölgesinde farklılığa rastalanmasa bile lepralı yaşlı grubu yaşları uygun kontrollerle karşılaştırdıklarında incelenen bütün beyin bölgelerinde olağandışı Şekilde senil plak yokluğu görmüşlerdir (60). Ancak antilepra ilaçlarının (dapson, rifampisin, klofazimin, minomisin veya ofloksasin) benzer koruyucu etkisi 196 lepralı yaşlı hastayı demans skalaları üzerinden değerlendiren başka bir çalışmada görülmemiştir (61). Aynı çalışmanın devamında antilepra ilaçların in vitro olarak A $\beta$  toksisitesi üzerine etkileri incelenmiş; ilaçlar kombine veya ayrı ayrı denenmiş, 4 gün sonrasında

kültürlerdeki hücre canlılığı ölçülmüş ve A $\beta$  toksisitesine karşı koruyucu ya da toksik bir etkiye işaret eden anlamlı bir bulguya rastlanmamıştır.

Hafiften ortaya kadar farklı derecelerde AH'na sahip hastalarda yapılan randomize kontrollü bir çalışmada rifampisin ve deokisiklinin SADAS-cog kognitif fonksiyonlardaki progresif gerilemeyi azalttığı görülmüştür. Altta yatan olası mekanizma olarak da amiloid birikimi karşıtı etkileri ve anti-inflamatuar etkisi gösterilmiştir (62).

Doksisiklin ve rifampisinin AH progresyonunu durduduğu veya yavaşlatabileceği hipotezi üzerine kurulan bir başka klinik çalışmada 406 hasta 12 ay boyunca ilaçların tek tek, beraber olduğu ve plasebo kontrol gruplarına ayrılıp ilaç tedavisi uygulanmış, SADAS-cog ve CDR, günlük yaşam aktivitesi skorlarına göre ilaçların plasebo grubuna göre AH grubunda kognisyon ve fonksiyonda anlamlı bir yararlı etkisi görülmemiştir (63).

İzuka ve arkadaşlarının FDG-PET kullanarak yaptıkları retrospektif çalışmada, rifampisinin demans öncesi aşamada günlük 450 mg 12 ay veya daha fazla süre kullanıldığında koruyucu etki sağlayabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca rifampisin tedavisinin, demans öncesi aşamada (posterior singulat korteksteki) metabolik bozuklukları ve kognitif bozuklukları iyileştirdiği (SMMT) veya stabilize ettiği uzun süreli takipte de bu değişikliklerin korunduğu gösterilmiştir. Bunun yanında, uygun doz ve tedavi süresinin posterior singulat korteksteki FDG alımını iyileştirdiği ve bunun SMMT skorlarına yansıdığı görülmüştür (64).

Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, rifampisinin nörodejeneratif hastalıklara karşı önleyici ilaçlar için oral kullanım, düşük olumsuz etki, hücre içi ve dışı nörotoksik oligomerlerin azaltılmasında iyi etkinlik gibi gerekli özelliklere sahip olduğu, bu sayede rifampisin Alzheimer hastalığının ve diğer nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi için ümit verici, kullanıma hazır bir ilaç olabileceği öne sürülmektedir (47, 64).

#### **4.4.2.2. Rifampisin ve Parkinson Hastalığı**

Rifampisinin protektif etkiler gösterdiği öne sürülen bir nörodejeneratif hastalık grubu ise Parkinson hastalığıdır. PC12 hücrelerinde rotenon ile indüklenen

dejenerasyon in vitro stabil bir Parkinson deneysel modeli olarak kabul edilir (65). Bu model kullanılarak yapılan bir çalışmada rifampisin ön muamelesinin PC12 hücrelerini rotenon ile indüklenen apoptoza karşı, önemli posttranskripsiyonel modifikasyonlardan biri olan,  $\alpha$ -sinükleini daha çözünebilir ve daha az toksik hale getirerek  $\alpha$ -sinüklein SUMOlasyonunu indükleyerek koruduğu gösterilmiştir (66). Çalışmada rifampisin uygulanan grupta kontrol gruplarına kıyasla 1,5 kat daha fazla SUMOlasyon proteini (SUMO1, SUMO2/3) ve SUMOlasyon ile ilişkili UBS-9 enziminde upregülasyon görülmüştür ve bu bulgulara dayanarak rifampisinin nörotoksositeye karşı koruyucu olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür. Bir çalışmada ise rifampisin PC12 hücrelerinde rotenon ile indüklenen dejenerasyona karşı meydana getirdiği koruyucu hücresel yanıtları ortaya çıkaran mekanizmalar kapsamlı proteomiks verileri ile incelenmiş, rifampisin uygulanan PC12 hücrelerinde sitoproteksiyon ve hücre sağkalımında önemli bir rol oynayan bir şaperon proteini olan GRP78' in upregüle ve aktive olduğu görülmüştür (65). GRP78, katlanmamış protein yanıtını (UPR- unfolded protein response) karakterize eder. UPR, endoplazmik retikulum stresinde yanlış katlanmış proteinlerin birikimine yanıt olarak oluşturulan hücresel bir savunma sistemidir. UPR, GRP78'in ekspresyonunu indükler. RNA yolu ile GRP78 susturulduğunda rifampisin protektif etkisinin zayıfladığı görülmüştür, rifampisin rotenon ile indüklenen hücre hasarına karşı nöronları korumak için GRP78'i indüklediği sonucuna varılmıştır.

Bir diğer in vitro çalışmada ise, Parkinson hastalığını modellemek üzere insan nöroblastoma hücre hattına rotenon uygulanmış ve dopaminerjik nöron dejenerasyonuna benzer şekilde apoptoz tetiklenmiştir (67). Bu hücre hatlarına rotenon öncesi rifampisin uygulaması yapıldığında, hücre canlılığının arttığı, CREB ve Akt fosforilasyonunun arttığı, GSK-3 $\beta$  aktivitesinin ise baskılandığı görülmüştür. Rifampisin ön muamelesinin rotenoneun indüklediği apoptoza karşı nöroprotektif etki gösterdiği, bunu da PI3K/Akt/GSK-3B/CREB sinyalizasyonu üzerinden sağladığı sonucuna varılmıştır.

Başka bir çalışmada ise rifampisin doz bağımlı şekilde  $\alpha$ -sinüklein fibrilasyonunu inhibe ettiği var olan fibrilleri ayrıştırdığı, monomerik ve çözünebilir oligomerik formlarını stabilize ettiği ve ayrıca anaerobik koşullarda rifampisin inhibitör etkisinin zayıfladığı görülmüştür. Bu inhibisyonun çoğunluğundan oksidatif

ürünlerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (6). Rifampisin daha uzun süre inkübe edildiğinde daha güçlü inhibitör etki yaptığı öne sürülmüştür.

PH'da substantia nigradaki dopaminerjik nöronların apotozuna neden olan mekanizmalara ilişkin önemli bilgiler, nörotoksin MPTP kullanılarak elde edilmiştir. İnsanlarda, insan olmayan primatlarda (maymunlar gibi) ve kemirgenler (sıçanlar ve fareler gibi) bu ajan ile muamele edilmesi, ciddi ve geri dönüşümsüz bir PH benzeri sendrom başlatmaktadır. MPTP ile indüklenen nörotoksisite çok kullanılan bir in vivo Parkinson modelidir. MPP+ ise, MPTP'nin aktif metabolitidir ve in vivo MPTP, astroglial hücreler tarafından MPP+'ya metabolize edilir ve ardından dopamin taşıyıcısı tarafından dopaminerjik nöronlara alınır. MPP+, nörotoksik etkilerini, hidrojen zincirinin kompleks I aktivitesinin inhibisyonu ve ayrıca lipid peroksidasyonu indüksiyonu ile gösterir ve serbest radikal üretimine neden olur. MPP+ ile indüklenen hücre ölümü aynı zamanda apoptotik kaskat elemanlarının aktivasyonu ile ilişkilidir (5, 10).

Başka bir çalışmada ise PC12 hücrelerinde rifampisin ön-muamelesinin  $\alpha$ -sinüklein oligomer ve/veya agregatlarının ekspresyonunu arttıran, apoptotik ve nekrotik yolları aktive eden MPP+ toksik yeteneklerini nasıl etkileyeceği incelenmiş, rifampisin doz bağımlı şekilde hücrelerin apotozunu baskılayarak sağkalımını arttırmış, alfa sinüklein ekspresyonunu azaltmıştır ve nöroprotektif etkili bir ajan olabileceği yönündeki sonuçlara katkı sağlamıştır (7).

Kılıç ve arkadaşları rifampisin antioksidatif ve antiapoptotik etkilerini incelemek için oluşturdukları çalışmada in vitro dopaminerjik nöronlarda MPP+ ile indüklenen hücre ölümüne rifampisin etkisini araştırmış, rifampisin ön-muamelesinin MPP+ toksisitesinde doz bağımlı olarak nöronal sağkalımı arttırdığı görülmüştür (5). Ayrıca rifampisin'in pro-apoptotik Bax'ın ekspresyonunu azalttığı ve Bcl-2, Bcl-XL ve XIAP, cIAP2, FLIPs gibi anti-apoptotik gen ürünlerinin ekspresyonunu arttırdığı, bu proteinler aracılığıyla apotozu engelleyebileceği, apoptotik yolların aktivasyonunu ve oksidatif stresi içeren hücre ölümünü parametrelerinde nörodejenerasyonu önleyebildiğini öne sürülmüştür. Ayrıca literatürde Bcl-2 geninin hayatta kalma ile ilişkili olarak, serbest oksijen radikallerine

karşı protektif bir etki sağladığı ve aşırı ekspresyonunun nöronları aksotominin indüklediği hücre ölümüne karşı koruyabileceği öne sürülmüştür (22).

Farelerde MPTP ile indüklenen nöronal hasara karşı rifampisin, oksidatif stresi azaltmış, lipid peroksidasyonunu ve serbest radikal üretimini önemli ölçüde inhibe etmiş, MPTP ile indüklenen nörotoksositeyi azaltmıştır (10).

Ayrıca Parkinson hastalarının nigrostriatal motor sisteminde Sigma-1 reseptör alt tipi ( $\sigma 1R$ ) yoğunluğu azalmaktadır.  $\sigma 1R$  susturulduğunda  $\alpha$ -sinüklein birikimini ve fosforilasyonu artarak dopaminerjik nöron kaybı ve motor koordinasyon bozukluğuna neden olmuştur (68). Bu fareler intraperitoneal enjeksiyon yoluyla rifampisin ile tedavi edildiğinde  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerinin artışı ve dopaminerjik nöron kaybının azaldığı ve motor koordinasyonun geliştiği gösterilmiştir.

#### **4.4.2.3. Rifampisin ve Nöroinflamasyon**

Rotenonun mikrogliya aktivasyonunu ve PH'daki pro-inflamatuar faktörlerin oluşumunu indüklediğini gösterilmiştir. Rifampisin ön-muamelesi rotenon ile oluşturulan hücre toksisitesini, IL-1 $\beta$  gen ekspresyonunu, olgunlaşmasını ve hücre içi serbest radikal miktarını azaltıp, mitokondrial membran potansiyel kaybını tersine çevirdiği gösterilmiştir (69). Aynı ekibin yaptığı devam niteliğinde bir çalışmada ise rotenon öncesi uygulanan rifampisinin mikrogliyal hücre aktivasyonunu, mikrogliyal hücrelerden IL-1 $\beta$ , IL6 gibi pro-inflamatuar sitokin salınımını, mikrogliya kaynaklı nörotoksositeyi ve hücre içi serbest radikal miktarını azalttığı ve mitokondrial potansiyel kaybını tersine çevirdiği görülmüştür (70). Lizozomal fonksiyonların modülasyonu ile mitokondriyal otofajiyi arttırdığı böylelikle serbest radikal üretimini azalttığı öne sürülmüştür.

Rifampisinin başka bir in vitro çalışmada lipopolisakkarit ile uyarılan mikrogliyal hücrelerdeki aktivasyona rifampisinin etkisi incelenmiş, proinflamatuar mediatörlerin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörü NF- $\kappa B$ 'nin inhibe olmasını sağladığı, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini azalttığı, sağkalımı anlamlı şekilde arttırdığı görülmüştür (8). Ayrıca rifampisinin potansiyel nöroprotektif ve anti-inflamatuar ajan olabileceğini fikri ortaya atılmıştır.

#### **4.4.2.4. Rifampisin ve Serebral İskemi**

Yuluğ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelerde kalıcı serebral iskemi uygulanmasından hemen önce ve geçici serebral iskemi prosedüründen 30 dk. sonra intraperitoneal olarak uygulanan rifampisin beyin hasarını etkili bir şekilde azalttığı, hayatta kalan nöron sayısını arttırdığı görülmüştür (2). Rifampisin hem apoptotik hem nekroz benzeri yaralanmaları önlediği savunulmuştur.

Başka bir çalışmada ise 2 saatlik geçici serebral iskemide verilen yüksek doz kortikosteroidlerin, bölgesel serebral kan akışını arttırdığı, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini sağladığı, serebral enfarktüs boyutunun ise azalmasına neden olduğu gözlenmiş ve glikokortikoid reseptör antagonisti kullanıldığında ise bu etkilerin ortadan kalktığı görülmüştür. Rifampisin glikokortikoid reseptör üzerindeki agonist aktivitesi yoluyla benzer etkiler ortaya çıkarabileceği öne sürülmüştür (71).

#### **4.4.2.5. Rifampisin ve Menenjit**

Serbest radikaller, bakteriyel menenjit fizyopatolojisinde anahtar araçlar olarak kabul edilir. İn vivo menenjit modellerinde rifampisin ile tedavi edilen gruplarda serebrospinal sıvıdaki oksidatif stres belirteçlerinin konsantrasyonunu ve dentat girustaki apoptotik nöron yoğunluğu azaltmıştır (11). Ayrıca aynı çalışmada rifampisin ile tedavi edilen gruplarda serebrospinal sıvı fagositlerindeki serbest radikal üretimi rifampisin ile tedavi edilen grupta standart şekilde tedavi edilen gruba kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. İntraserebral *S.pneumoniae* ile enfekte edilen farelerde tek doz rifampisin alımının bile proinflatuar bakteri bileşenlerinin salınımını anlamlı derecede azalttığı ve 3 günlük tedavi programının sonucunda mortaliteyi %49'dan %26'ya düşürdüğü görülmüştür (72). Rifampisin bakteriyel menenjitte erken mortaliteyi azaltmak için umut verici olduğunun altı çizilmiştir.

Tüberküloz menenjit hastasının anlatıldığı bir vaka raporunda ise hastaya tanı sonrası 12 ay boyunca rifampisin de olduğu bir grup antitüberküloz ilaç terapisi uygulanmış ve tedavi sonucunda MRI görüntülenmesinde anormal gelişmelerin tam olarak düzeldiği görülmüştür (73). Başka bir çalışmada ise tüberküloz menenjit hastalarında yapılan randomize kontrollü faz 2 çalışmasında iki haftalık yoğunlaştırılmış rifampisin ve moxiloxacin tedavisi hastalarda sağkalımı arttırmıştır (74).



Akut bakterial menenjitli çocuklarda yapılan randomize kontrollü bir çalışmada ise standart bakteriyolitik antibiyotiklerin neden olduğu nöronal hasar ve morbiditeye karşı bakteriyolitik antibiyotiklerden 30 dk. önce tek doz alınan nonbakteriyolitik antibiyotik rifampisin serebrospinal sıvıdaki inflamatuvar belirteçleri, nöronal hasarı, morbidite ve nörolojik bozuklukları anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür (75).

Hasar sonrası etkin bir sinir koruyucu tedavi henüz mevcut olmasa da patogenezinde önemli ölçüde oksidatif süreç ve apoptotik aktivasyon yer alır (18). Rifampisin nöroprotektif mekanizmalarda etkinliğinin vurgulayan yukarıdaki literatür ışığında bu çalışmada akson hasarı sonrasında meydana gelen bu dejeneratif değişikliklere karşı rifampisin nöroprotektif, antioksidatif, antiapoptotik etkilerinin in vitro aksotomi modelinde sağkalıma ve nörorejenerasyona etkisinin araştırılması planlandı.

## 5. METOD VE MATERYAL

Yenidoğan balb-c farelerden izole edilen kortikal nöronlara farklı dozlarda rifampisin uygulaması ardından aksotomi yapıldı. Sonrasında analizler ve kontrol gruplarıyla karşılaştırmalar yapılarak rifampisin rejenerasyona etkisi araştırıldı.

### 5.1.Deney hayvanları

Çalışmamızda yenidoğan (0-1 günlük) Balb-c ırkı albino fareler kullanıldı. Fareler, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Araştırmaları Merkezi (MEDİTAM) 'nden temin edildi. Çalışma için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (38828770-604.01.01-E.35858) alındı.

### 5.2.Kullanılan Malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
L-15 Medium (Leibovitz) Without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	SIGMA	L5520
NEUROBASAL-A MEDIUM 1X LIFE TECH	GIBCO	10888022
HIBERNATE A 500ml LIFE TECH-	GIBCO	A1247501
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	BIOMATIK	A2442
B-27® Serum-Free Supplement, liquid 50X	LIFE TECH-GIBCO	17504044

Papain from papaya latex lyophilized powder, $\geq 10$ units/mg protein	SIGMA	P4762 -100mg
GlutaMAX™-I Supplement 100X	INVITROGEN GIBCO ThermoFisher	35050061
Triton-X-100	SIGMA	T8787-100ml
PBS Tablets, 100 tablets	Thermo Fisher	18912014
P4417 -100 TB Phosphate buffered saline	SIGMA	A360250
Antibiotic Antimycotic Solution (100 $\times$ ), Stabilized, with 10,000 units penicillin, 10 mg streptomycin and 25 $\mu$ g amphotericin B per mL, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture	BIOSERA	XC-A110/100
Poly-L-lysine hydrobromide mol wt 70,000-150,000, lyophilized powder, $\gamma$ -irradiated, BioXtra, suitable for cell culture	SIGMA	P6282
35 mm cam tabanlı petri	WPI	FD35-100
Centrifuge Tube 15ml	NEST	60102

35 mm plastik tabanlı petri	ThermoFisher Scientific	153066
Hanks' Balanced Salt solution	SIGMA	H9269
Hanks' Balanced Salt solution	GIBCO	14175
Pasteur pipettes length: 150 mm / tip mm:1.3 to 1.4 ext. / 0.8 to 1.0 int.	Marienfeld-Superior	3233049
Propidium iodide solution	SIGMA	P4864

### **5.3.Hücre İzolasyonu Öncesi Hazırlıklar ve Hücre eldesi**

#### **5.3.1. Kültür Kabının Hazırlanması**

Hücre ekimi için kullanılacak 35 mm'lik cam tabanlı petri diseksiyondan önce kültür kaplarının yüzeylerinin hidrofilik yapıya gelmesini sağlamak amacıyla poli-lisin (PLL) ile kaplandı. 750 µl %10'luk PLL, (75µl pll+675 µl sterile distile su) 35 mm'lik steril petriye dağıtıldı. Petri 1 saat oda sıcaklığında kabin içerisinde bekletildi. Bir saatin sonunda ise petri üçer defa distile su ile yıkanarak, PLL'den tamamen arındırıldı.

#### **5.3.2.Kültürde Kullanılacak Besiyerlerinin Hazırlanması**

##### **5.3.2.1.Diseksiyon Besiyeri**

Diseksiyon besiyeri, Hibernate A mediumu kullanılarak hazırlandı. Besiyeri içerisinde %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %2 B27 olacak şekilde hazırlandı. Diseksiyon işlemine kadar soğuması, hafif donması için -20°C'de de bekletildi.

##### **5.3.2.2. Kültür Besiyeri**

Kültür yapılacağı gün, Leibovitz Mediumu kullanılarak hazırlandı. Kültür besiyeri %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %2 B27 olacak şekilde hazırlandı. Kültür besiyeri 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kapağı yarım açık şekilde birkaç dakika bekletildikten sonra +4°C de kullanım zamanına kadar muhafaza edildi.

##### **5.3.2.3. Hücre Ekimi Besiyeri**

Kültür yapılacağı gün, Neurobasal A kullanılarak hazırlandı. Hücre ekimi besiyeri %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %2 B27 olacak şekilde hazırlandı. Besiyeri

37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kapağı yarım açık şekilde kullanım zamanına kadar muhafaza edildi.

### **5.3.3. Diseksiyon**

Yenidoğan fareler sakrifiye edildikten sonra kafası, kontaminasyon riskine karşı %70'lik etanol ile dezenfekte edildi ve soğuk diseksiyon besiyeri dolu bir silikon tabanlı petri içine hızlıca transfer edildi. Korteks diseksiyonu, mikrocerrahide kullanılan stereo mikroskop altında yapıldı. Kafatası orta hattan yapılan bir kesi ile iki yana ayrılarak beyin dokusu ortaya çıkarıldı. Serebrumdan ayrılması için serebelluma ve bulbus olfactorius bölgesine enine birer kesi yapıldı, ardından korteks tabakası sırayla her iki hemisfer için nazikçe kaldırılarak alındı ve korteks üzerindeki meninks tabakası ince uçlu forseps yardımı ile dokuya zarar vermeden sıyrılarak temizlendi.

### **5.3.4. Kültür Protokolü**

#### **5.3.4.1. Enzim İnkübasyonu**

20 µl DNase ve 20 µl papain enzimlerinin, 960 µl kültür besiyeri ile solüsyonu hazırlandı. İyice pipetaj yapılarak solüsyon homojen hale getirildi. Ardından çıkarılan korteks dokusu bu solüsyonun bulunduğu tüpe aktarıldı ve 45 dk oda sıcaklığında ajdatörde inkübe edildi.

#### **5.3.4.2. Tritürasyon**

Bu aşamada enzimle inkübasyon sonunda doku, önce çapı 2 mm ile başlayan ve giderek daralan pipet uçları (ucu kesik 1000 µl'lik pipet ucu, sonra ucu kesik 200 µl'lik pipet ucu, sonra ucu kesik 10 µl'lik pipet ucu) ile pipetaj ve son olarak pastör pipeti ile pipetaj yapıldı. Sonrasında supernatant temiz bir falcon tüpe alındı. Altta kalan hücrelerin üzerine 1 ml kültür besiyeri eklendikten sonra 10 tekrarlı pastör pipeti tritürasyonu yapıldı. Bir dakika bekletildi, supernatant alınıp bir önceki aşamada ayrılan hücrelere eklendi. Son kez kültür besiyeri kalan kısma eklendi ve 10 kez pastör pipeti tritürasyonu yapıldı. Supernatant diğer hücrelere eklendi. Bu işlemlerin ardından doku mekanik olarak parçalandı, hücreler ayrıştırıldı.

#### **5.3.4.3. Santrifüj**

Hücre süspansiyonu 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 3 dakika 800 RPM'de çöktürüldü. Supernatant atıldı. Kalan hücrelerin üzerine 5 ml %20 FBS'li kültür

besiyeri eklendi ve 10 dakika bekletildi. Hücreler ikinci kez 800 RPM'de 3 dk santrifuj edildi. Santrifuj sonunda supernatant uzaklaştırıldı.

#### **5.3.4.4. Hücre Ekimi**

Çöken hücrelerin üzerine 1 ml hücre ekimi besiyeri eklendi. Daha sonra hematositometre yardımı ile hücre sayımı yapıldı. Her petride eşit sayıda olacak şekilde önceden P11 ile kaplanmış olan 35 mm çaplı cam tabanlı petrilere ekim besiyeri ile birlikte toplam 500 µl hacimde olacak şekilde ekildi. Hücreler petriye ekildikten sonra petri tabanına yapışmaları için 2saat boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) tutuldu. İki saatin sonunda petri başına 1000 µl kültür besiyeri olacak şekilde besiyeri eklendi.

#### **5.4. Rifampisin Eklenmesi**

Primer Nöron kültürü tamamlandıktan sonra hücreler 5 farklı gruba ayrıldı. Daha önce yapılan çalışmalardan edinilen bilgilerle birinci gruba 1 µM, ikinci gruba 10 µM ve üçüncü gruba ise 100 µM 37°C PBS de çözdürülen (76)(5) rifampisin solüsyonları primer kortikal nöron kültürünün yapılmasından 23 saat 45 dakika sonra nöronların besiyerine eklendi. Dördüncü gruba rifampisin uygulanmadan kontrol grup olarak aksotomi uygulaması yapıldı. Beşinci gruba ise herhangi bir işlem yapılmadı, sağlıklı kontrol grubu olarak kullanıldı. Ekleme işleminden hemen sonra ise lazer mikrodiseksiyon mikroskobu ile aksotomi yapıldı.

#### **5.5. Aksotomi Protokolünün Uygulanması**

Kortikal nöronlara aksotomi yapmak için PALM CombiSystem (MicroDissection and MicroTweezers System) kullanıldı. Aksotomi esnasında petriyer sisteme ait olan 37°C/%5 CO<sub>2</sub>'li inkübatör kısmında tutuldu.

Lazer aksotomi protokolüyle aksonal hasar gerçekleştirildi (77). Aksotomi işlemi ultraviyole lazer kullanarak 20x kuru objektif altında gerçekleştirildi. Hücreler kültüre edildikten 24 saat sonra gerçekleştirilen aksotomi hücre gövdesinden en az bir hücre gövdesi çapı uzaklıktan uygulandı. Nöron gövdesi çapı ve akson uzunlukları ise yazılım ile ölçüldü. Palm CombiSystemin navigasyon özelliği kullanılarak kesilen nöronların yerleri kayıt altına alındı.

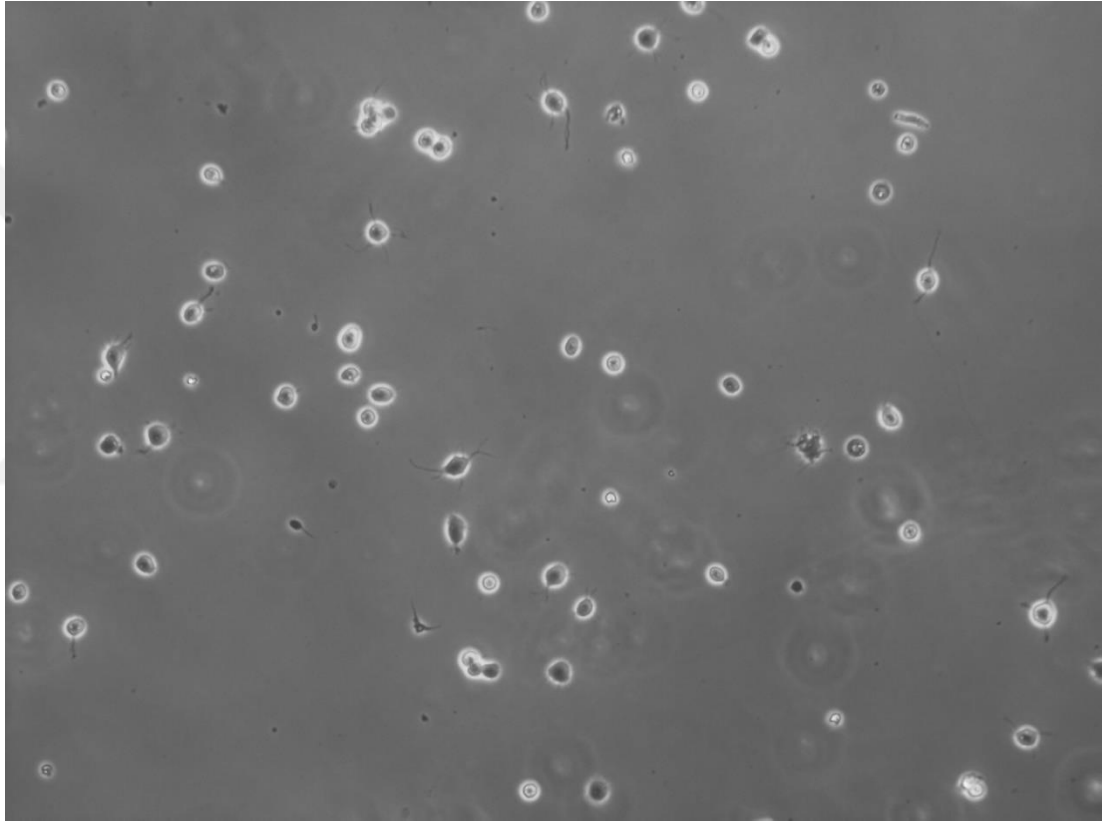
## 5.6. Propidium İyodür Boyaması

Propidium iyodür (PI) membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyarken membran bütünlüğü korunan canlı hücreler bu boyama sırasında boyanmadan kalırlar. Aksotomi protokolü uygulandıktan 24 saat sonra her bir petri medyumunun içerisine 1,5 µl PI solüsyonu eklendi. On dakika inkübasyon süresi sonunda PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopu ile tespit edilir hale geldi. Böylelikle nöronların aksotomi sonrası sağkalım oranı belirlendi.



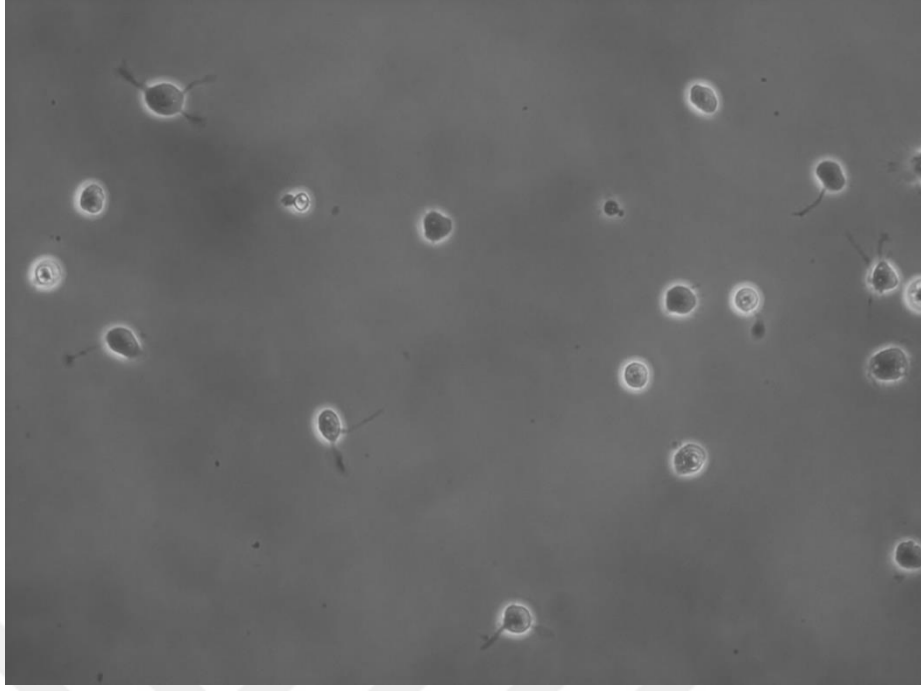
## 6.BULGULAR

Yenidoğan balb-c farelerden izole edilen kortikal nöronlar sırasıyla 1, 10 ve 100  $\mu$ M rifampisin dozları ile 15 dk inkübe edildikten sonra laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile aksotomi yapıldı. Sonrasında yapılan PI boyaması ile rifampisin ve kontrol gruplarıyla karşılaştırmalar yapılarak rifampisinin nörodejeneratif süreçlere karşı nöronal sağkalıma dolayısı ile nörorejenerasyona olan etkisi araştırıldı.

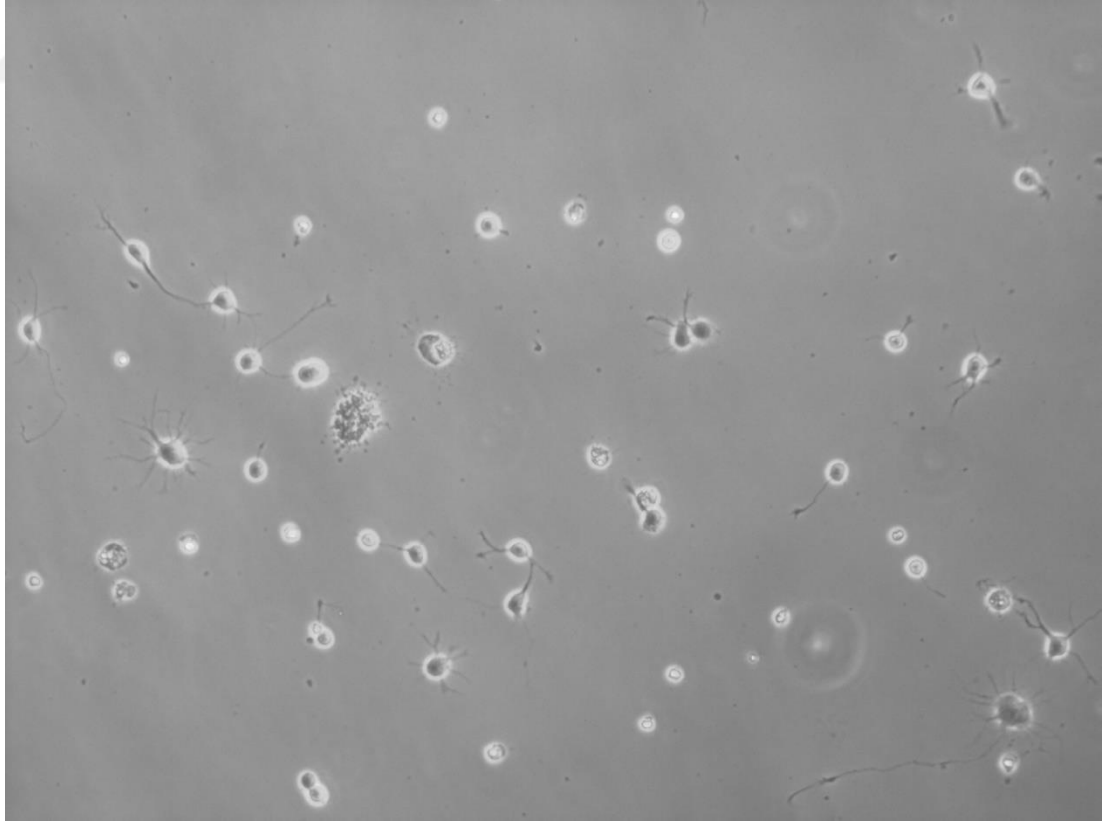


**Resim 6.1.** Ekim yapıldıktan 1 saat sonra nöronların 20x objektifle ışık mikroskop görüntüleri

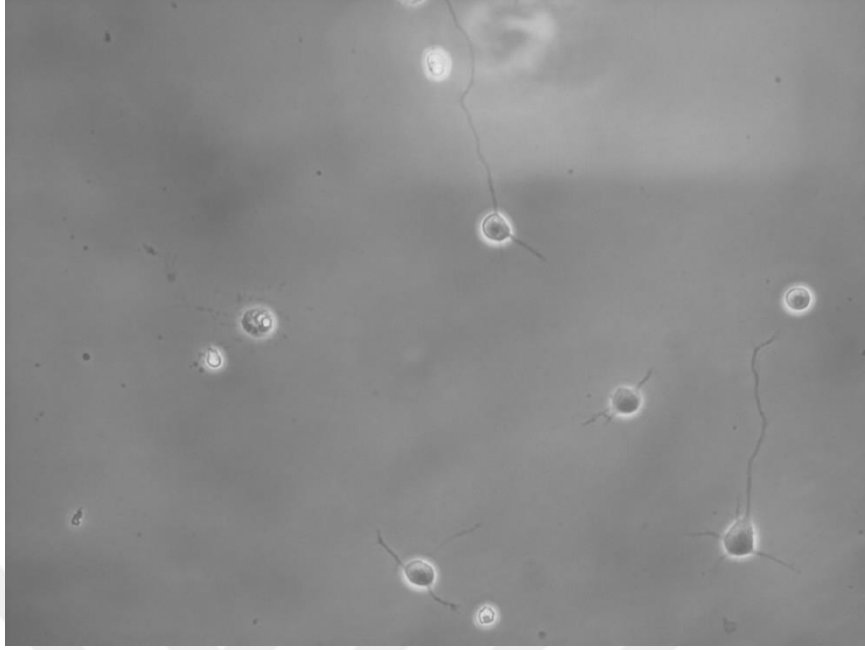




**Resim 6.2.** Ekim yapıldıktan 1 saat sonra nöronların 40x objektifle ışık mikroskop görüntüleri



**Resim 6.3.** Ekim yapıldıktan 20 saat sonra nöronların 20x objektifle ışık mikroskop görüntüleri



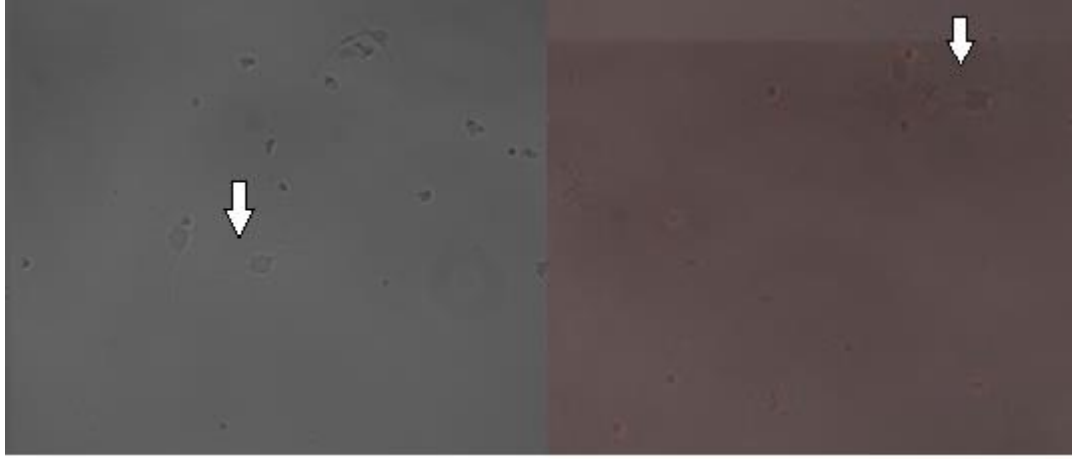
**Resim 6.4.** Ekim yapıldıktan 20 saat sonra nöronların 40x objektifle ışık mikroskop görüntüleri

PI boyama sonrasında yapılan analizlerde deney gruplarıyla eş alanlar karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubunda %73,6, aksotomi kontrol grubunda ise %36,6 oranında hücresel sağkalım görüldü.



**Resim 6.5.** 1µM RİF grubunun aksotomi öncesi ve PI boyama sonrası görüntüleri.

1µM RİF grubunda Sağkalım %51,7 görüldü. Sağkalım oranında aksotomi kontrol grubuna göre artış saptandı.



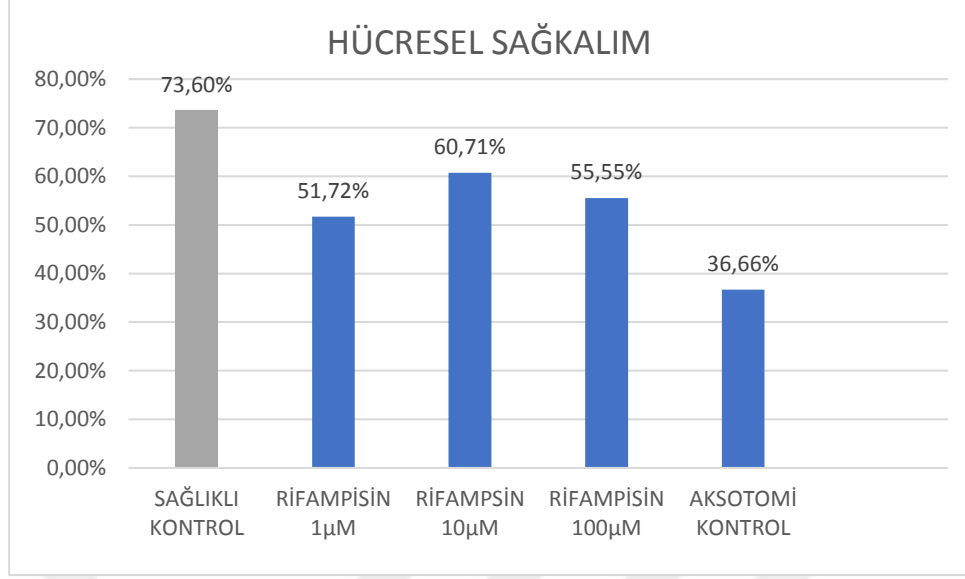
**Resim 6.6.** 10µM RİF grubunun aksotomi öncesi ve PI boyama sonrası görüntüleri.

10µM RİF grubunda sağkalım %60,7 görüldü. Sağkalım oranında aksotomi kontrol grubuna göre artış saptandı.



**Resim 6.7.** 100µM RİF grubunun aksotomi öncesi ve PI boyama sonrası görüntüleri.

100µM RİF grubunda ise sağkalım %55,5 görüldü. Sağkalım oranında aksotomi kontrol grubuna göre artış saptandı.



**Şekil.6.1.** Deney gruplarındaki hücresel sağkalım değerleri

PI boyama sonrasında yapılan analizlerde, sağlıklı kontrol grubunda %73,6 görülen hücresel sağkalım, tüm RİF gruplarında aksotomi kontrol grubuyla kıyaslandığında yükseldi ancak doza bağımlı bir artış gözlenmedi.

## 7-TARTIŞMA

Rifampisin, in vivo, in vitro çeşitli nörodejeneratif hastalık modellerinde nöroprotektif, anti-apoptotik, anti-oksidatif, anti-inflamatuar etkiler ürettiği bildirilen esasen Mycobacterium tuberculosis, M. leprae ve diğer mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. AH, PH, menejit, serebral iskemi, nöroinflamasyon rifampisinin protektif etkiler ürettiği bilinen nörodejeneratif durumlardır (3).

RIF'in mitokondriyal oksidatif stresin bastırılması, serbest radikal süpürücü etkisi, A $\beta$  ve  $\alpha$ Syn karşıtı etkileri, anti-inflamatuar etkileri, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltarak ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak protektif, anti-apoptotik, rejeneratif etkiler gösterdiği pek çok çalışma ile gösterilmiştir (3,5). Aksotomi ise, kontrollü, büyümeye izin veren bir ortamda hasarlı aksonların büyüme kapasiteleri üzerindeki dışsal ve içsel faktörlerin etkisini incelemeye olanak tanıyan özel bir aksonal hasar modelidir (12).

MSS nöronlarında, aksonal yaralanma patogeneğinde önemli ölçüde oksidatif süreç ve apoptotik aktivasyon yer alır. MSS'de aksonal hasar sonrası dejenerasyonu tetikleyici olayların; hücre dışı ve hücre içi depolardan sitoplazmaya Ca<sup>+2</sup> akışının artması, aksonal transportun durdurulması, serbest radikallerin oluşması, kaspaz aktivasyonu olduğu düşünülmektedir. Sonuçta nöronda dejeneratif süreçler ve dolayısı ile proaktif bir ölüm programı tetiklenmektedir (13, 77, 78).

Rifampisinin nöroprotektif mekanizmalarda etkinliğinin vurgulayan literatür ışığında bu çalışmada akson hasarı sonrasında meydana gelen bu dejeneratif değişikliklere karşı rifampisin nöroprotektif, anti-oksidatif, anti-apoptotik etkilerinin in vitro aksotomi modelinde sağkalıma ve nörorejenerasyona etkisinin araştırılması planlandı. Bu bağlamda yenidoğan balb-c farelerden izole edilen kortikal nöronlara aksotomi öncesi, literatürle uyumlu şekilde 1, 10 ve 100  $\mu$ M olacak şekilde üç ayrı doz rifampisin ile muamele edildi. Sonrasında yapılan PI boyaması ile rifampisin ve kontrol gruplarıyla karşılaştırmalar yapılarak rifampisinin nörodejeneratif süreçlere karşı hücre sel sağkalıma olan etkisi araştırıldı.

Yapılan analizler sonucunda; sağlıklı kontrol grubunda %73,60 hücre sel sağkalım söz konusu iken pek çok apoptotik, oksidatif gen ürünlerinin ifadesi gibi dejeneratif süreçlerin tetiklendiği aksotomi kontrol grubunda ise %36,66 oranında sağkalım görüldü. Sağkalım 1µM RİF grubunda %51,72; 10µM RİF grubunda %60,71; 100µM RİF grubunda ise %55,55 görüldü.

Benzer şekilde Kılıç ve arkadaşları, rifampisin anti-oksidatif ve anti-apoptotik etkilerini incelemek için oluşturdukları çalışmada in vitro dopaminejik nöron kültürlerine 1, 10 ve 100 µM rifampisin dozlarında ön muamelesinin doz bağımlı nöronal sağkalımı arttırdığını ve nörodejenerasyonu inhibe ettiğini göstermiştir (5). Tomiyama ve arkadaşları, 10 ve 100 µM dozlarında rifampisin ön-muamelesinin Alzheimer hastalığının başlıca belirteçlerinden olan sentetik amiloid-β'nin fibril formasyonunu ve toplanmasını önlediği, hücreleri Aβ'nin tetiklediği toksisiteden serbest radikal süpürücü etkisi ile anlamlı şekilde koruduğunu göstermiştir. Ancak 1 µM rifampisin ön-muamelesinin anlamlı bir etkisi görülmemiştir (4). Bir sekonder kültür çalışmasında ise 100 µM RİF önmuamelesinin hücreleri rotenon ile indüklenen apoptoza karşı koruduğu görülmüştür (67). Başka bir çalışmada ise PC12 hücrelerinde MPP+ toksisitesine karşın 100 µM rifampisin hücrelerin apoptozunu baskılayarak sağkalımını arttırmış, α-sinüklein ekspresyonunu azaltmış ve nöroprotektif etkili bir ajan olabileceği yönündeki sonuçlara katkı sağlamıştır (7).

Çalışma sonuçlarında benzer şekilde RİF deney gruplarında patolojik modele karşın görülen bu yüksek sağkalım, RİF önmuamelesinin dejeneratif süreçlerin tetiklendiği aksonal yaralanma modelinde de MSS nöronları hasar sonrası pek çok içsel ve dışsal inhibitör etkilere maruz kalmasına rağmen (32), oksidatif stresi bastırabilme yeteneği, serbest radikal süpürücü etkisi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek sağladığı düşünülmektedir (3,5). Çalışmamızın sonuçlarından yola çıkılarak RİF'in apoptotik yolların aktivasyonunu ve oksidatif stresi içeren hücre ölümünü ve nörodejenerasyonu önleyebildiği düşünüldü.

RİF'in çok çeşitli nörodejeneratif modellerde kullanılan nörodejenerasyon karşıtı, oksidatif, apoptotik, protektif, rejeneratif etkileri, daha önce kullanılmamış bir model olan kortikal nöronlardaki aksonal yaralanma modelinde gösterildi.



## 8-SONUÇ

Sonuçlar rifampisini, kortikal nöronlarda aksotomi sonrası anti-oksitatif ve anti-apoptotik mekanizmaları içeren nöronal hücre dejenerasyonunun üstesinden gelen potansiyel bir nöroprotektör ajan olarak desteklemektedir. RİF, MSS hasarları sonrası kullanılabilir terapötik yaklaşımlardan birisi olarak süreçte kendine yer edinebilir ancak, sonuçları daha iyi yorumlayabilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.





## 9- KAYNAKLAR

- 1 Acocella G. Clinical Pharmacokinetics Of Rifampicin. *Clin Pharmacokinet.* (3); 108–127, 1978.
- 2 Yulug B, Kilic Ü, Kilic E, Bähr M. Rifampicin Attenuates Brain Damage In Focal Ischemia. *Brain Res.* (996); 76–80, 2004.
- 3 Yulug B, Hanoglu L, Kilic E, Schabitz WR. RIFAMPICIN: An Antibiotic With Brain Protective Function. *Brain Res Bull.* (107); 37–42, 2014.
- 4 Tomiyama T, Asano S, Suwa Y, Morita T, Kataoka K, Mori H, Endo N. Rifampicin Prevents The Aggregation And Neurotoxicity Of Amyloid B Protein In Vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* (204); 76–83, 1994.
- 5 Kilic Ü, Kilic E, Lingor P, Yulug B, Bähr M. Rifampicin Inhibits Neurodegeneration In The Optic Nerve Transection Model In Vivo And After 1-methyl-4-phenylpyridinium Intoxication In Vitro. *Acta Neuropathol.* (108); 65–68, 2004.
- 6 Li, J.; Zhu, M.; Rajamani, S.; Uversky, VN.; Fink A. Rifampicin Inhibits Alfa-Synuclein Fibrillation And Disaggregates Fibrils. *Chem Biol.* (11); 1513–1521, 2004.
- 7 Xu J, Wei C, Xu C, Bennett MC, Zhang G, Li F, Tao E. Rifampicin Protects PC12 Cells Against MPP+-induced Apoptosis And Inhibits The Expression Of An A-Synuclein Multimer. *Brain Res.* (1139); 220–225, 2007.
- 8 Bi W, Zhu L, Wang C, Liang Y, Liu J, Shi Q, Tao E. Rifampicin Inhibits Microglial Inflammation And Improves Neuron Survival Against Inflammation. *Brain Res.* (1395); 12–20, 2011.
- 9 Tomiyama T, Shoji A, Kataoka J, Suwa Y, Asano S, Kaneko H, Endo N. Inhibition Of Amyloid B Protein Aggregation And Neurotoxicity By Rifampicin. *J Biol Chem.* (271); 6839–6844, 1996.
- 10 Oida Y, Kitaichi K, Nakayama H, Ito Y, Fujimoto Y, Shimazawa M, Nagai H, Hara H. Rifampicin Attenuates The MPTP-induced Neurotoxicity In Mouse Brain. *Brain Res.* (1082); 196–204, 2006.
- 11 Böttcher T, Gerber J, Wellmer A, Smirnov A V, Fakhrijanali F, Mix E, Pilz J, Zettl UK, Nau R. Rifampin Reduces Production Of Reactive Oxygen Species Of Cerebrospinal Fluid Phagocytes And Hippocampal Neuronal Apoptosis In

- Experimental Streptococcus Pneumoniae Meningitis. *J Infect Dis.* (181); 2095–8, 2000.
- 12 Gomis-Rüth S, Stuess M, Wierenga CJ, Meyn L, Bradke F. Single-cell Axotomy Of Cultured Hippocampal Neurons Integrated In Neuronal Circuits. *Nat Protoc.* (9); 1028–1037, 2014.
  - 13 Lopachin RM, Lehning EJ. Mechanism Of Calcium Entry During Axon Injury And Degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol.* (143); 233–244, 1997.
  - 14 Coleman M. Axon Degeneration Mechanisms: Commonality Amid Diversity. *Nat Rev Neurosci.* (6); 889–898, 2005.
  - 15 Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium And Cell Death Mechanisms: A Perspective From The Cell Death Community. *Cell Calcium.* (50); 211–221, 2011.
  - 16 Bradke F, Fawcett JW, Spira ME. Assembly Of A New Growth Cone After Axotomy : The Precursor To Axon Regeneration. *Nat Publ Gr.* (13); 183–193, 2012.
  - 17 Lingor P, Koch JC, Tönges L, Bähr M. Axonal Degeneration As A Therapeutic Target In The CNS. *Cell Tissue Res.* (349); 289–311, 2012.
  - 18 Mandolesi G, Madeddu Fe, Bozzi Y, Maffei L, Ratto G mMchele. Acute Physiological Response Of Mammalian Central Neurons To Axotomy: Ionic Regulation And Electrical Activity. *FASEB J.* (18); 1934–1936, 2004.
  - 19 Momeni HR. Role Of Calpain In Apoptosis. *Cell J.* (13); 65–72, 2011.
  - 20 Neumar RW, Xu YA, Gada H, Guttmann RP, Siman R. Cross-talk Between Calpain And Caspase Proteolytic Systems During Neuronal Apoptosis. *J Biol Chem.* (278); 14162–14167, 2003.
  - 21 David P. Stirling, PhD and Peter K. Stys M. Mechanisms Of Axonal Injury: Internodal Nanocomplexes And Calcium Deregulation. *Trends Mol Med.* (16); 160–170, 2011.
  - 22 Castagne V, Clarke PGH. Axotomy-Induced Retinal Ganglion Cell Death In Development: Its Timecourse And Its Diminution By Antioxidants. *Proc R Soc B Biol Sci.* (263); 1193–1197, 1996.
  - 23 Kandel, E, Schwartz, JH, Jessell, TM. Principles Of Neural Science. New York : McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000.

- 24 Barret, KE, Barman, SM., Boitana S. BH. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. 23. Baskı. (Hakkı G (ed.)). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri., 2011.
- 25 Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD. Neuronal Subtype Specification In The Cerebral Cortex. *Nat Rev Neurosci.* (8); 427–437, 2007.
- 26 Guyton A, Hall J. Tıbbi Fizyoloji. 11. Baskı. (Çavuşoğlu H and Yeğen B (eds.)). Nobel Tıp Kitabevleri, 2006.
- 27 Lynch JC. System Neurobiology. *In: Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications.* 4th ed. Haines DE (ed.). Elsevier Health Sciences, pp 442–445, 2012.
- 28 Elston GN. Specialization of the Neocortical Pyramidal Cell during Primate Evolution. *In: Evolution of Nervous Systems.* Elsevier Inc, pp 192–242, 2007.
- 29 Iskandar BJ, Rizk E, Meier B, Hariharan N, Bottiglieri T, Finnell RH, Jarrard DF, Banerjee R V., Skene JHP, Nelson A, Patel N, Gherasim C, Simon K, Cook TD, Hogan KJ. Folate Regulation Of Axonal Regeneration In The Rodent Central Nervous System Through DNA Methylation. *J Clin Invest.* (120); 1603–1616, 2010.
- 30 Cameron EG, Goldberg JL. Promoting CNS Repair. *Science.* (353); 30–31, 2016.
- 31 Huebner E a, Strittmatter SM. Axon Regeneration In The Peripheral And Central Nervous Systems. *Results Probl Cell Differ Author Manusc.* (48); 339–351, 2009.
- 32 Mahar M, Cavalli V. Intrinsic Mechanisms Of Neuronal Axon Regeneration. *Nat Rev Neurosci.* (19); 323–337, 2018.
- 33 Wang T, Xiong JQ, Ren XB, Sun W. The Role Of Nogo-A In Neuroregeneration: A Review. *Brain Res Bull.* (87); 499–503, 2012.
- 34 Aubert I, Ridet JL, Gage FH. Regeneration In The Adult Mammalian CNS: Guided By Development. *Curr Opin Neurobiol.* (5); 625–635, 1995.
- 35 Sun F, He Z. Neuronal Intrinsic Barriers For Axon Regeneration In The Adult CNS. *Curr Opin Neurobiol.* (20); 510–518, 2010.
- 36 Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP, Program B. MTOR Kinase Structure, Mechanism And Regulation By The Rapamycin-binding Domain. *Nature.* (497); 217–223, 2015.

- 37 Saatman KE, Creed J, Raghupathi R. Calpain As A Therapeutic Target In Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*. (7); 31–42, 2010.
- 38 Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain In The Pathophysiology Of Spinal Cord Injury: Neuroprotection With Calpain Inhibitors. *Brain Res Rev*. (42); 169–185, 2003.
- 39 Sharma AK, Rohrer B. Calcium-induced Calpain Mediates Apoptosis Via Caspase-3 In A Mouse Photoreceptor Cell Line. *J Biol Chem*. (279); 35564–35572, 2004.
- 40 Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation Of Cell Death: The Calcium-apoptosis Link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (4); 552–565, 2003.
- 41 Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Activation And Function. 1–24, 2016.
- 42 Tait SWG, Green DR. Mitochondrial Regulation Of Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. (5); a008706, 2013.
- 43 Sensi P. History Of The Development Of Rifampin. *Rev Infect Dis*. (5); S402–S406, 1983.
- 44 Maggi , N.; Pasualucci, CR.;Ballotta R.;Sensin P. Rifampicin:a New Orally Active Rifamycin. *Chemotherapis*. (11); 285–292, 1966.
- 45 Van Ingen J, Aarnoutse RE, Donald PR, Diacon AH, Dawson R, Plemper Van Balen G, Gillespie SH, Boeree MJ. Why Do We Use 600 Mg Of Rifampicin In Tuberculosis Treatment? *Clin Infect Dis*. (52); , 2011.
- 46 Brunton L, Lazo S, Parker K. Tedavinin Farmakolojik Temeli: Goodman & Gilman. (Süzer Ö (ed.)). Nobel Tıp Kitapevleri, 2009.
- 47 Yulug B, Hanoglu L, Ozansoy M, Isik D, Kilic U, Kilic E, Schabitz WR. The Therapeutic Role Of Rifampicin In Alzheimer’s Disease. *Psychiatry Clin Neurosci*., 2018.
- 48 Tomiyama T, Kaneko H, Kataoka KI, Asano S, Endo N. Rifampicin Inhibits The Toxicity Of Pre-aggregated Amyloid Peptides By Binding To Peptide Fibrils And Preventing Amyloid-cell Interaction. *Biochem J*. (322 ( Pt 3); 859–65, 1997.
- 49 Lieu VH, Wu JW, Wang SSS, Wu CH. Inhibition Of Amyloid Fibrillization Of Hen Egg-white Lysozymes By Rifampicin And P-benzoquinone. *Biotechnol Prog*. (23); 698–706, 2007.

- 50 Qosa, H.;Abuznait, AH.; Hill, RA.; Kaddoumi A. Enhanced Brain Amyloid- $\beta$  Clearance By Rifampicin And Caffeine As A Possible Protective Mechanism Against Alzheimer's Disease. (31); 151–165, 2012.
- 51 Abuznait, AH.;Cain, C.; Ingram, D.; Burk, D.; Kaddoumi A. Up-regulation Of P-glycoprotein Reduces Intracellular Accumulation Of Beta Amyloid: Investigation Of P-glycoprotein As A Novel Therapeutic Target For Alzheimer's Disease. J Pharm Pharmacol. (63); 1111–1118, 2011.
- 52 Abuznait AH, Patrick SG, Kaddoumi A. Exposure Of LS-180 Cells To Drugs Of Diverse Physicochemical And Therapeutic Properties Up-regulates P-glycoprotein Expression And Activity. J Pharm Pharm Sci. (14); 236–248, 2011.
- 53 Kaur P, Sodhi RK. Memory Recuperative Potential Of Rifampicin In Aluminum Chloride-induced Dementia: Role Of Pregnane X Receptors. Neuroscience. (288); 24–36, 2015.
- 54 Jain S, Rathod V, Prajapati R, Nandekar PP, Sangamwar AT. Pregnane X Receptor And P-glycoprotein: A Connexion For Alzheimer's Disease Management. Mol Divers. (18); 895–909, 2014.
- 55 Yan L, Wang Y, Liu J, Nie Y, Zhong X, Kan Q. Alterations Of Histone Modifications Contribute To Pregnane X Receptor-Mediated Induction Of CYP3A4 By Rifampicin S. Mol Pharmacol. (2);113-123, 2017.
- 56 Yamasaki Y, Kobayashi K, Inaba A, Uehara D, Tojima H, Kakizaki S, Chiba K. Indirect Activation Of Pregnane X Receptor In The Induction Of Hepatic CYP3A11 By High-dose Rifampicin In Mice. Xenobiotica. (0); 1–8, 2017.
- 57 Taneja G, Chu C, Maturu P, Moorthy B, Ghose R. Role Of C-Jun-N-terminal Kinase In Pregnane X Receptor-mediated Induction Of Human Cytochrome P4503A4 In Vitro. Drug Metab Dispos. (46); 397–404, 2018.
- 58 Sharma D, Turkistani AA, Chang W, Hu C, Xu Z, Chang TKH. Negative Regulation Of Human Pregnane X Receptor By MicroRNA-18a-5p: Evidence For Suppression Of MicroRNA-18a-5p Expression By Rifampin And Rilpivirine. Mol Pharmacol. (92); 48–56, 2017.
- 59 Umeda T, Ono K, Sakai A, Yamashita M, Mizuguchi M, Klein WL, Yamada M, Mori H, Tomiyama T. Rifampicin Is A Candidate Preventive Medicine

- Against Amyloid- $\beta$  And Tau Oligomers. *Brain*. (139); 1568–1586, 2016.
- 60 Namba, Y.; Kawatsu, K.; Izumi, S.; Ueki, A.; Jkeda K. Neurofibrillary Tangles And Senile Plaques In Brain Of Elderly Leprosy Patients. *Lancet*. (340); 938, 1992.
- 61 Endoh M, Kunishita T, Tabira T. No Effect Of Anti-leprosy Drugs In The Prevention Of Alzheimer's Disease And Beta-amyloid Neurotoxicity. *J Neurol Sci*. (165); 28–30, 1999.
- 62 Loeb MB, Molloy DW, Smieja M, Standish T, Goldsmith CH, Mahony J, Smith S, Borrie M, Decoteau E, Davidson W, McDougall A, Gnarpe J, O'Donnell M, Chernesky M. A Randomized, Controlled Trial Of Doxycycline And Rifampin For Patients With Alzheimer's Disease. *J Am Geriatr Soc*. (52); 381–387, 2004.
- 63 Molloy DW, Standish TI, Zhou Q, Guyatt G. A Multicenter, Blinded, Randomized, Factorial Controlled Trial Of Doxycycline And Rifampin For Treatment Of Alzheimer's Disease: The DARAD Trial. *Int J Geriatr Psychiatry*. (28); 463–470, 2013.
- 64 Iizuka T, Morimoto K, Sasaki Y, Kameyama M, Kurashima A, Hayasaka K, Ogata H, Goto H. Preventive Effect Of Rifampicin On Alzheimer Disease Needs At Least 450 Mg Daily For 1 Year: An FDG-PET Follow-Up Study. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. (7); 204–214, 2017.
- 65 Jing X, Shi Q, Bi W, Zeng Z, Liang Y, Wu X, Xiao S, Liu J, Yang L, Tao E. Rifampicin Protects PC12 Cells From Rotenone-induced Cytotoxicity By Activating GRP78 Via PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 Pathway. *PLoS One*. (9); 1–9, 2014.
- 66 Lin D, Jing X, Chen Y, Liang Y, Lei M, Peng S, Zhou T, Zheng D, Zeng Z, Wu X, Yang L, Xiao S, Liu J, Tao E. Rifampicin Pre-treatment Inhibits The Toxicity Of Rotenone-induced PC12 Cells By Enhancing Sumoylation Modification Of A-synuclein. *Biochem Biophys Res Commun*. (485); 23–29, 2017.
- 67 Wu X, Liang Y, Jing X, Lin D, Chen Y, Zhou T, Peng S, Zheng D, Zeng Z, Lei M, Huang K, Tao E. Rifampicin Prevents SH-SY5Y Cells From Rotenone-Induced Apoptosis Via The PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /CREB Signaling

- Pathway. *Neurochem Res.* 43(4); 886-893, 2018.
- 68 Hong J, Wang L, Zhang T, Zhang B, Chen L. Sigma-1 Receptor Knockout Increases A-synuclein Aggregation And Phosphorylation With Loss Of Dopaminergic Neurons In Substantia Nigra. *Neurobiol Aging.* (59); 171–183, 2017.
- 69 Liang Y, Jing X, Zeng Z, Bi W, Chen Y, Wu X, Yang L, Liu J, Xiao S, Liu S, Lin D, Tao E. Rifampicin Attenuates Rotenone-induced Inflammation Via Suppressing NLRP3 Inflammasome Activation In Microglia. *Brain Res.* (1622); 43–50, 2015.
- 70 Liang Y, Zhou T, Chen Y, Lin D, Jing X, Peng S, Zheng D, Zeng Z, Lei M, Wu X, Huang K, Yang L, Xiao S, Liu J, Tao E. Rifampicin Inhibits Rotenone-induced Microglial Inflammation Via Enhancement Of Autophagy. *Neurotoxicology.* (63); 137–145, 2017.
- 71 Limbourg FP, Huang Z, Plumier JC, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schütz G, Moskowitz MA, Liao JK. Rapid Nontranscriptional Activation Of Endothelial Nitric Oxide Synthase Mediates Increased Cerebral Blood Flow And Stroke Protection By Corticosteroids. *Journal Of Clinical Investigation.* 110(11); 1729-1738, 2002.
- 72 Nau R, Wellmer A, Soto A, Koch K, Schneider O, Schmidt H, Gerber J, Michel U, Brück W. Rifampin Reduces Early Mortality In Experimental *Streptococcus Pneumoniae* Meningitis. *J Infect Dis.* (179); 1557–1560, 1999.
- 73 Qavi AH, Imran TF, Hasan Z, Ilyas F. Facial Weakness, Diplopia, And Fever In A 31-Year-Old: An Atypical Case Of Tuberculous Meningitis. *Cureus.* (9); 1–6, 2017.
- 74 Ruslami R, Ganiem AR, Dian S, Apriani L, Achmad TH, van der Ven AJ, Borm G, Aarnoutse RE, Van Crevel R. Intensified Regimen Containing Rifampicin And Moxifloxacin For Tuberculous Meningitis: An Open-label, Randomised Controlled Phase 2 Trial. *Lancet Infect Dis.* (13); 27–35, 2013.
- 75 Uppal L, Singhi S, Singhi P, Aggarwal R. Role Of Rifampin In Reducing Inflammation And Neuronal Damage In Childhood Bacterial Meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* (36); 556–559, 2017.
- 76 Gallo GG, Radaelli P. Rifampin. *Anal Profiles Drug Subst.* (5); 467–513,

1976.

- 77 Öztürk G, Cengiz N, Erdoğan E, Him A, Oğuz EK, Yenidünya E, Ayşit N. Two Distinct Types Of Dying Back Axonal Degeneration In Vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (39); 362–376, 2013.
- 78 Staal JA, Dickson TC, Gasperini R, Liu Y, Foa L, Vickers JC. Initial Calcium Release From Intracellular Stores Followed By Calcium Dysregulation Is Linked To Secondary Axotomy Following Transient Axonal Stretch Injury. *J Neurochem.* (112); 1147–1155, 2010.





## 10-ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.35858  
Konu : Etik Kurulu Kararı

06/10/2017

**Sayın Doç. Dr. Burak YULUĞ**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Rifampisin İn Vitro Aksotomi Modelinde Nörorejenerasyona Etkisinin Araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYЕК) Başkanı

EK:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 06.10.2017 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden C47E15B8X3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto: bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
06/10/2017	58		Doç. Dr. Burak YULUĞ

“Rifampisin in vitro aksotomi modelinde nörorejenerasyona etkisinin araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “ <b>Oybirliği</b> ” ile karar verilmiştir.
<b>Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay</b>

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.44141  
Konu : Etik Kurulu Kararı

08/10/2018

**Sayın Prof. Dr. Burak YULUĞ**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu 06/10/2017 tarihli ve 58 karar no ile onay verilen “Rifampisin’in İn Vitro Aksotomi Modelinde Nörorejenerasyona Etkisinin Araştırılması” isimli araştırma başvurunuzun etik onay süresinin “31/12/2018”e kadar uzatılması isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 08.10.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 9E07724CX2 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)

## 11-ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Ebru	<b>Soyadı</b>	Coşkun
<b>Doğum Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğum Tarihi</b>	1994
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kimlik No.</b>	13052239588
<b>E-mail</b>	ebrucoskun@gmail.com	<b>Tel.</b>	5378248668

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	-	
<b>Yüksek Lisans</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi / Sinirbilim	2018
<b>Lisans</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi / Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	2016

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>
<b>Stajyer Fizyoterapist</b>	Medipol Mega Hastaneler Kompleksi	2015-2016

### Yabancı Dil

	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	İyi	Orta	İyi

<b>Yabancı Dil Sınav Notu</b>					
<b>KPDS</b>	<b>YDS</b>	<b>YÖKDİL</b>	<b>TOEFL IBT</b>	<b>CAE</b>	<b>CPE</b>

-	-	81	-	-	-
---	---	----	---	---	---

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	82	83	72
<b>Diğer</b>			

### **Bilgisayar Bilgisi**

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
MS Office	İyi

### **Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer**

-