



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

MERVE ALÖKTEN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. BURAK YULUĞ

İSTANBUL, 2018

## TEŞEKKÜR

BaŐta bu tezin ortaya çıkmasındaki her aŐamasında hiçbir zaman desteğini ve pozitif yaklaŐımını esirgemeyen tez danıŐmanım Prof.Dr. Burak Yuluğ'a, tezimin tım aŐamalarında yontemsel bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım Yard.Doç.Dr. Mehmet Ozansoy ve Dr. Beyza Ozansoy'a, sinirbilim alanında ufkumu nasıl geliŐtirebileceęimi her an tazeleyen yol gostericim Prof.Dr. Lutfu Hanoğlu'na, laboratuvarında desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Gulsena BaydaŐ ve Sadık Bay'a, sundukları altyapı hizmetlerinden dolayı İstanbul Medipol Üniversitesi REMER ve MEDİTAM birimdekilerinde her bir çalıŐana, tezin gerçekleŐmesinde manevi katkısı büyük olan babam Recep Alökten, annem Sabriye Alökten ve kardeŐim Burcu Alökten'e, tez süresince girdiğim tım çıkmazlardan, enerjisizliğimden ve moral bozukluklarından beni kurtarmak ve tım mutlu anlarımda benimle mutluluğumu paylaşmak için bu tezin tım yazım aŐamalarında yanımda olan Ali Can Sünnetçioğlu'na, düşüncesine her zaman güvendiğim ve beni bilimsel ilgimde sürekli tetikte tutan sohbetleriyle Melike Kafadar'a, benden lisansımdan beri manevi desteğini hiç eksiltmemiŐ Senem Akbay'a en içten teŐekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL ,TABLO VE RESİMLER LİSTESİ.....	viii
1-TÜRKÇE ÖZET .....	1
2-ABSTRACT.....	2
3-GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4-GENEL BİLGİLER .....	5
4.1. Nöron.....	5
4.1.1 Nöronun anatomi ve fizyolojisi.....	5
4.1.2 Serebral Korteks ve Kortikal Nöronlar.....	9
4.2. Merkezi Sinir Sistemi Hücrelerinde Hasarlanma.....	13
4.2.1 Aksonal dejenerasyon.....	13
4.3. Merkezi Sinir Sistemi Hücrelerinde Yaralanmaya Yanıt Mekanizmaları..	15
4.3.1 Nörorejenerasyon.....	16
4.4. Minosiklin ve Etkileri.....	19
4.4.1. Minosiklinin farmakolojik yapısı.....	19
4.4.2. Minosiklinin antibiyotik etkisi.....	20
4.4.3. Minosiklinin nörodejenerasyona etkisi.....	21
4.4.3.1. İskemik inme.....	22
4.4.3.2. İntraserebral hemoraji.....	24
4.4.3.3. Spinal kord hasarı.....	26
4.4.3.4. Travmatik beyin hasarı.....	27
4.4.3.5. Parkinson hastalığı.....	28
4.4.3.6. Huntington hastalığı.....	30
4.4.3.7 Alzheimer hastalığı.....	31
4.4.3.8. Amiyotrofik lateral skleroz.....	32

4.4.4. Minosiklinin nörorejenerasyona etkisi.....	33
<b>5-MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>36</b>
5.1.Kullanılan deney hayvanları .....	36
5.2. Kullanılan malzemeler .....	36
5.3. Hücrelerin izolasyonundan önceki hazırlıklar ve hücrelerin elde edilmesi.....	37
5.3.1. Petrilerin hazırlanması.....	37
5.3.2.Kültür için kullanılacak besiyerlerinin hazırlanması.....	38
5.3.2.1.Diseksiyon için hazırlanan besiyeri .....	38
5.3.2.2. Kültür için hazırlanan besiyeri.....	38
5.3.3.Diseksiyon aşaması.....	38
5.3.4.Kültür protokolü.....	39
5.4. Hazırlanan kültüre minosiklin uygulanması ve lazer mikrodiseksiyon ile aksotomi işlemi.....	40
5.4.1. Minosiklin uygulaması.....	40
5.4.2. Lazer mikrodiseksiyon ile aksotomi işlemi.....	41
5.5. Propidyum iyodür uygulaması.....	43
<b>6-BULGULAR .....</b>	<b>44</b>
<b>7-TARTIŞMA .....</b>	<b>53</b>
<b>8-SONUÇ.....</b>	<b>56</b>
<b>9-KAYNAKLAR.....</b>	<b>57</b>
<b>10-ETİK KURUL ONAYI .....</b>	<b>79</b>
<b>11-ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>82</b>

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>6-OHDA:</b>	6-hydroxydopamine
<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>:</b>	Amiloid Beta 1-42
<b>AH:</b>	Alzheimer Hastalığı
<b>ALS:</b>	Amiyotrofik Lateral Skleroz
<b>APP:</b>	Amiloid Precursor Protein
<b>Arg1:</b>	Arginaz-1
<b>Bid:</b>	Bax Like BH3
<b>Bcl-2:</b>	B-cell lymphoma 2
<b>Bax:</b>	BCL2-associated X
<b>COX-2:</b>	Cyclooxygenase
<b>DISC:</b>	Death inducing signaling complex
<b>eIF-2<math>\alpha</math>:</b>	Eukaryotic Initiation Factor 2 alfa
<b>ERK 1/2:</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>FBS:</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FDA:</b>	Food and Drug Administration
<b>HH:</b>	Huntington Hastalığı
<b>HMGB-1:</b>	High mobility group box 1
<b>IL-1:</b>	İnterlökin-1
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	İnterlökin-1 Beta
<b>IL4ra:</b>	İnterlökin-4 reseptör alfa
<b>IL-6:</b>	İnterlökin-6
<b>IL-10:</b>	İnterlökin-10
<b>iNOS:</b>	inactive Nitric Oxide Species
<b>İSH:</b>	İntraserebral Hemoraji
<b>kDa:</b>	Kilodalton
<b>L15:</b>	Lebowitz 15 medium
<b>MCA:</b>	Middle Serebral Artery
<b>MHC II:</b>	Major histocompatibility complex
<b>MMP:</b>	Matriks Metalloproteaz
<b>MMP-9:</b>	Matriks Metalloproteaz-9

<b>mRNA:</b>	mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MPP+:</b>	Mitochondrial processing peptidase
<b>MTPT:</b>	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
<b>NADPH:</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NBA:</b>	Neurobasal A medium
<b>NIH:</b>	National Institute of Health
<b>NO:</b>	Nitrik oksit
<b>Nos2:</b>	Nitrik oksit sentaz 2
<b>p38 MAPK:</b>	P38 mitogen-activated protein kinases
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>peIF-2<math>\alpha</math>:</b>	Phosphorilated Eukaryotic Initiation Factor 2 alfa
<b>PFA:</b>	Paraformaldehit
<b>PLA2:</b>	Phospholipases A2
<b>PLL:</b>	Poly Lysine-L
<b>ROS:</b>	Reactive oxygen species
<b>SKH:</b>	Spinal kord hasarı
<b>SOX2:</b>	Sex determining region Y-box 2
<b>TBH:</b>	Travmatik beyin hasarı
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tumour Necrosis Factor alfa
<b>Trem1:</b>	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1

<b>ŞEKİL, TABLO VE RESİMLER LİSTESİ</b>	<b>Sayfa No.</b>
Şekil 4.1.1-1 Nöron anatomisi.....	5
Şekil 4.1.1-2 Nöron tipleri.....	6
Şekil 4.1.2-1 Enine kesitte korteks kalınlığı ve nükleuslar.....	7
Şekil 4.1.2-2 Kortikal katmanlar.....	8
Şekil 4.1.2-3 Projeksiyon nöronları ve internöronlar.....	9
Şekil 4.2.1 Aksonal hasar sonrası nöron yanıtları.....	10
Şekil 4.4.1 Minosiklinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 6. Gruplar arası canlılık oranları.....	52
<b>Tablo 5.2</b> Kullanılan sarf malzeme listesi.....	26
<b>Tablo 6.</b> Gruplar arası canlılık verileri.....	51
<b>Resim 5.3.4</b> 1 saatlik kortikal nöron kültürü.....	29
<b>Resim 5.4.2-1</b> PALM Combisystem.....	30
<b>Resim 5.4.2-2</b> Aksotomi öncesi nöron.....	30
<b>Resim 5.4.2-3</b> Aksotomi sonrası nöron.....	31
<b>Resim 6-1</b> 1µM minosiklin eklenmiş kortikal nöron kültürü.....	32
<b>Resim 6-2</b> 10µM minosiklin eklenmiş kortikal nöron kültürü.....	33
<b>Resim 6-3</b> 100µM minosiklin eklenmiş kortikal nöron kültürü.....	33
<b>Resim 6-4</b> 1µM minosiklin içeren petrinin PI floresan görüntüsü.....	46
<b>Resim 6-5</b> 10µM minosiklin içeren petrinin PI floresan görüntüsü.....	47
<b>Resim 6-6</b> 100µM minosiklin içeren petrinin PI floresan görüntüsü.....	47
<b>Resim 6-7</b> 1 µM minosiklin uygulanmış nöronlar için aksotomi sonrası canlılık.....	48
<b>Resim 6-8</b> 10 µM minosiklin uygulanmış nöronlar için aksotomi sonrası canlılık.....	49
<b>Resim 6-9</b> 100 µM minosiklin uygulanmış nöronlar için aksotomi sonrası canlılık.....	50

## 1-ÖZET

### *İN VİTRO* AKSOTOMİ MODELİNDE MİNOSİKLİNİN NÖROREJENERASYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Minosiklin yüksek lipofilik özelliğe sahip, kan beyin bariyerini geçebilen küçük semisentetik tetrasiklinler grubundan bir moleküldür. Antibiyotik özelliğinin yanısıra kan beyin bariyerini geçebilme özelliğinin yardımıyla iskemik beyin modellerinde nöroprotektif etkisi oluğu bulunmuştur. Birçok nörodejeneratif hastalıkta çeşitli etkilere sebep oluğu gösterilen minosiklinin nörorejenerasyona etkileri literatürde daha az yer bulmuştur. Bu merakla, in vitro kortikal kültür modelinde 1µM, 10µM ve 100µM minosiklinin lazer aksotomi ile oluşturulan aksonal hasara olan etkilerinden rejenerasyonun ön koşulu olan canlılık oranına propidyum iyodür boyama (PI) ile bakılmıştır. Düşük doz minosiklinin canlılık oranlarını hasardan sonra koruduğu görülürken, yüksek doz minosiklinin kortikal nöron kültürü için nörotoksik oluğu gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Lazer aksotomi, minosiklin, hayatta kalım, propidyum iyodür boyama, nörorejenerasyon

Bu tez İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kurumu tarafından 2017/10 proje numarası ile desteklenmiştir.



## 2-ABSTRACT

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

Minocycline is a molecule with a high lipophilic character and a small semisynthetic group of tetracyclines that cross the blood brain barrier. In addition to its antibiotic properties, it has been found to be neuroprotective in ischemic brain models with the help of the ability to cross the blood brain barrier. The literature on the effect of minocycline, which has been shown to cause various effects on many neurodegenerative diseases, on neuroregeneration finds less room in the literature. In this curiosity, the effects of 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M minocycline on axonal damage generated by laser axotomy in the in vitro cortical culture model were examined. The vitality rate, which is the prerequisite for regeneration, was investigated by propidium iodide staining. Low-dose minocycline appears to preserve vitality, while high-dose minocycline is neurotoxic for cortical neuron culture.

**Keywords:** Laser axotomy, minocycline, vitality, propidium iodide staining, neuroregeneration

This thesis was supported by the Istanbul Medipol University Scientific Research Projects Agency with project number 2017/10.

### 3-GİRİŞ VE AMAÇ

Minosiklin, yüksek lipofilik özelliğe sahip, kan beyin bariyerini geçebilen, küçük (yaklaşık 495 kDa), semisentetik tetrasiklinler grubundan bir moleküldür (1). Antimikrobiyal özellikleri ile tanınan tetrasiklinlerin uzun süre etkili ikinci jenerasyon formu olan minosiklinin antimikrobiyal özelliğinin yanı sıra nöroprotektif etkiye de sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yrjanheikki ve ark. gerbillerde yapmış oldukları iskemi modelinde, minosiklinin hipokampal nöronları global iskemiye karşı koruduğunu ilk kez göstermiştir. Minosiklin, iskemi öncesi 12. saatte verildiğinde CA1 piramidal nöronlarının sağkalım oranlarını %10.5'ten %77'ye, iskemiden 30 dakika sonra verildiğinde ise %71'e yükselttiği gösterilmiştir (2).

Minosiklinin bu etkisinin gösterilmesinden sonra araştırmacılar iskemik inme, intraserebral hemoraji, spinal kord yaralanması, travmatik beyin hasarı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve Amiyotrofik lateral skleroz gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde minosiklinin etkilerini araştırmışlardır. Ancak yapılan çoğu araştırmada *in vivo* hayvan modelleri kullanılmıştır (3). *İn vitro* çalışmalara örnek çok daha kısıtlıdır (4–6). Öte yandan minosiklinin nöroprotektif etkisinin yanında nöral rejenerasyona da katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (7–9). Ancak minosiklinin katkıda bulunduğu nörorejenerasyonunun altında yatan sebepleri araştırmak için hala çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Tüm bu bilgilerin ışığında yapılan literatür taramasında hipoglossal sinire yapılan bir *in vivo* aksotomi çalışması (10) dışında, *in vitro* aksotomi modeliyle çalışılmadığının eksikliği saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında, tek bir nöron rejenerasyonunda minosiklin tarafından ortaya çıkarılan hücre ve moleküler mekanizmaların anlaşılması için bu çalışma, birincil neonatal kortikal nöron kültüründe *in vitro* lazer aksotomi modeli ile tasarlanmıştır. Yapılacak çalışmada 0-1 günlük yenidoğan farelerden diseke edilerek çıkartılacak korteksler primer hücre kültüründe yaşatılacaktır (11). Ardından lazer aksotomi protokolüyle (12) aksonal hasar verildikten sonra 1µM, 10µM ve 100µM minosiklin (4) *in vitro* hücre kültürüne verilmiştir. Dejenerasyona verilen hücresel yanıt olan hayatta kalma propidyum iyodür boyama ile bakılmıştır.

Yapılan bu çalışma ile nörorejenerasyona etkisi *in vivo* çalışmalarla gösterilmiş olan minosiklinin yenidoğan kortikal nöron kültürü hayatta kalımına sağladığı olarak üzerinden tartışılması amaçlanmıştır.

## 4-GENEL BİLGİLER

### 4.1. Nöron

Nöron, beynin ve sinir sisteminin dış dünyadan duyu girdisi alıp motor yanıtlar için kaslara yollayan elektriksel bir uyarıyla iletim yapan anatomik ve fonksiyonel bir birimdir. Sinir sisteminin uyarıyı iletmekle görevli anatomik ve işlevsel birimidir.

Her bir nöron morfolojik olarak göreceli basittir. İnsan beyni yaklaşık 100 milyar hücre içermektedir ve binlerce farklı hücre tipi tanımlanabilirken tüm nöronlar benzer temel bir şekli paylaşır (13).

#### 4.1.1 Nöronun anatomi ve fizyolojisi

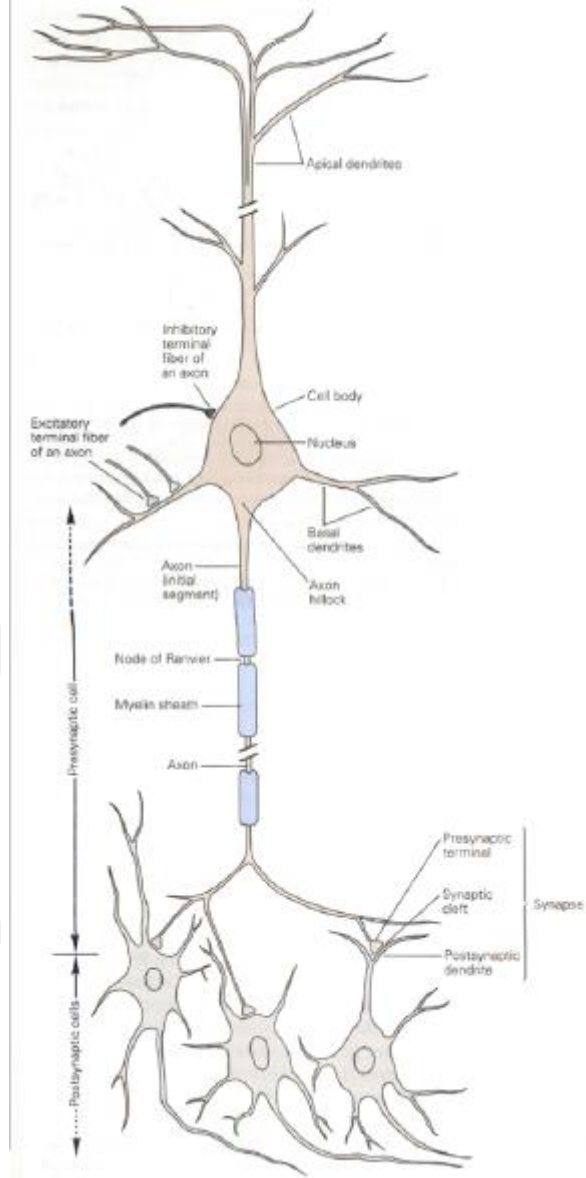
Nöronlar soma, dendrit ve akson olmak üzere 3 temel anatomik yapıdan oluşur (Şekil 4.1.1-1). Soma, hücrenin her türlü metabolik faaliyetinin yürütüldüğü merkez yapıdır. İçerisine nükleusla birlikte standart organelleri barındırır. Somadan 2 farklı tür çıkıntı uzanır. Kısa ve sayıca fazla olanlara dendrit, uzun ve tek çıkıntıya ise akson adı verilir. Dendritler ağaç benzeri dallanan uzantıları ile diğer nöronlardan gelen sinyalleri hücre gövdesine iletimden sorumlu anatomik yapıdır. Akson ise hücre gövdesinden uzaklaşarak hücrenin ürettiği yanıtı diğer nörona taşıyan yapıdır. Bir akson taşıdığı elektriksel sinyali 0.1 mm ile 3 m arası iletebilir (13, 14).

Aksonun taşıdığı elektriksel sinyal aksiyon potansiyeli olarak adlandırılır. Nöronun fizyolojik bir yanıtı olarak üretilen aksiyon potansiyeli hızlı, kısa süreli, ya hep ya hiç yasasına göre çalışan 100 mV amplitüdle 1 ms'ye kadar süren bir zamanda taşınırlar. Bu potansiyellerin başlangıç noktası somadan aksonu oluşturmak üzere ilerleyen çıkıntının ilk segmentidir. Buraya akson tepeciği de denir. Burada oluşan aksiyon potansiyelleri kesintiye uğramadan saniyede 1 ila 100 m yol alabilirler. Aksiyon potansiyelleri ya hep ya hiç yasası uyarınca çalıştıklarından oluşturdukları amplitüdü akson boyunca sabittir. Beynin bilgi aldığı, aldığı bilgiyi analiz ettiği ve aktardığı sinyaller bu aksiyon potansiyelleri ile gerçekleşmektedir.

Sinyallerin iletim hızını arttırmak üzere büyük aksonlar lipit oranı yüksek miyelin kılıfla kaplanmışlardır. Bu kılıf bir yandan izolasyon sağlarken diğer

yandan kılıfın üzerinde Ranvier nodu denilen açıklıklar bırakarak sinyallerin sıçrayarak daha hızlı iletilmelerini sağlar.

Sinyalleri taşıyan akson uzantısının sonlarına doğru düzgün dallanmalar verir ve her bir dal diğer nöronlarla iletişimi sağlayacak özel alanlara sahiptir. İki nöronun iletişim sağladığı bu yapıya sinaps adı verilmektedir. Burada iletim tek yönlüdür ve aksondan çoğu zaman dendrite doğru ilerler. Nadiren somaya ya da aksonun kendisine de iletebilir. İletimi yapan hücreye pre-sinaptik hücre, alan hücreye ise post-sinaptik hücre adı verilir. Pre-sinaptik hücreden gelen aksiyon potansiyeli akson ucundaki kimyasal madde (nörotransmitter) dolu kesecikleri aktive eder ve sinaptik boşluğa nörotransmitter salınımı yaparak post-sinaptik hücrede yeni bir aksiyon potansiyeli oluşturur, ya da post-sinaptik hücrede oluşmuş aksiyon potansiyelini baskılar. Bu iletim yöntemi nöronların temel fizyolojik özelliğini oluşturur (13, 14).



**Şekil 4.1.1-1** Nöron anatomisi (13)

Her bir nöron temel yapılar içeriği bakımından birbirine benzer ancak morfolojik olarak çeşitli sınıflandırmaları mevcuttur. Bu bağlamda nöronların 3 ana morfolojik yapıları bulunur;

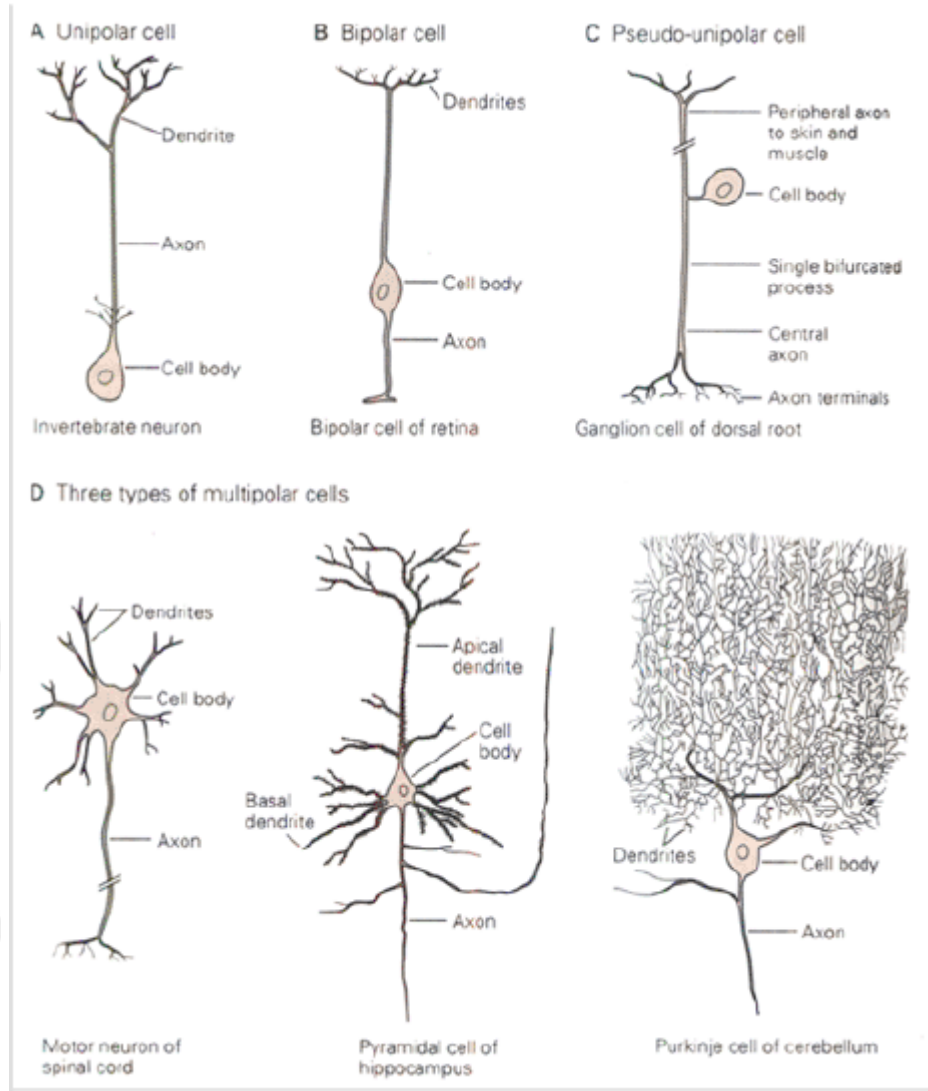
1) Unipolar nöronlar; en basit nöron tipidir. Yuvarlak bir hücre gövdesinden çıkan dendritlere ve bir aksona sahiptir. Genellikle omurgasız canlılarda çoklukla bulunurlar, omurgalıların ise daha çok otonomik sinir sisteminde görülürler.

2) Bipolar nöronlar; oval şekilli bir soma ile tek dendrit ve tek aksona sahip bu nöron türü genelde vücudun periferinden topladığı bilgiyi merkezi sinir sistemine iletme işinde görev alan nöronlardır.

3) Multipolar nöronlar; omurgalıların en tipik nöron çeşididir. Tek bir aksona ve somadan çıkan çok sayıda dendrite sahiplerdir. Dendrit sayısı, akson uzunluğu, yaptıkları iletişimin karmaşıklığı bakımından çok çeşitlidirler (Şekil 4.1.1-2) (13).

Bunların dışında nöronlar dış dünyadan bilgi taşıyan duyu, dış dünyaya cevap veren motor ve bu iki nöron tipi arasında iletişimi sağlayan internöron olmak üzere 3 adlandırma ile de fonksiyonel olarak adlandırılabilirler.





**Şekil 4.1.1-2 Nöron tipleri (13)**

A) Unipolar hücre, intervertebral nöron B) Bipolar hücre, retina nöronu C) Psödo-unipolar hücre, arka kök gangliyon hücresi D) Multipolar hücreler, motor nöron- piramidal hücre- Purkinje hücresi

#### 4.1.2 Serebral korteks ve kortikal nöronlar

Serebral korteks, serebral hemisferlerin en ince tabakasını oluşturan ve daha çok planlama ile hareket ve davranışlardan sorumlu olan bir beyin bölgesidir. Kalınlığı türden türe değişen serebral korteksin ortalama kalınlığı 2mm ila 4mm arasındadır (Şekil 4.1.2-1) (13).





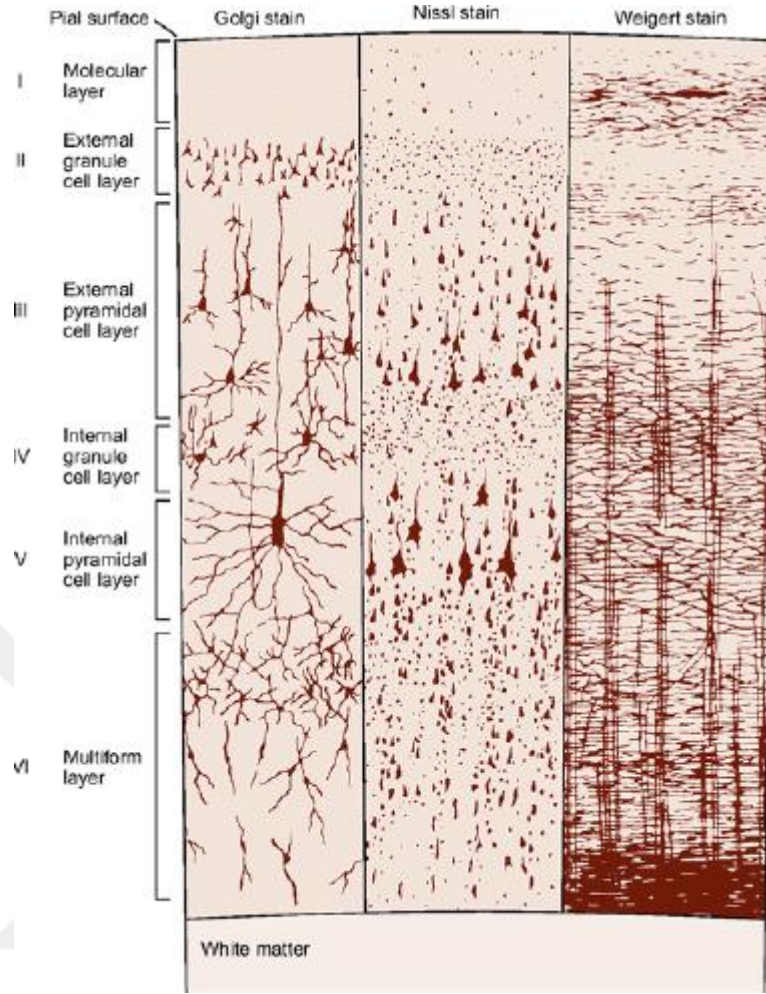
Şekil 4.1.2-1 Enine kesitte korteks kalınlığı ve nükleuslar (13)

Filogenetik olarak bakıldığında 3 bölgesi olduğundan bahsedilebilir. Korteksin daha yaşlı olan kısmına allokorteks denmektedir ve bu da kendi içinde paleokorteks ve arkikorteks olarak ikiye ayrılır. Paleokorteks serebral korteksin en eski bölgesi olduğu düşünülmektedir ve olfaktor bölgelerle ilişkilendirilmiştir ve arkikorteks ise hipokampal formasyonu içeren görece daha genç serebral korteks bölgesidir. Allokorteks 1 ila 3 tabakalı daha basit bir yapıdır. En genç ve şu anki memeli serebral korteksinde en büyük alanı kaplayan kısım neokortektir (15). Memeli neokorteksi yüzlerce farklı nöron tipini ve glia çeşitlerini içeren, ileri organizasyonlu, 6 tabakalı bir yapıdır (16, 17). Biliş, algı ve bilinçten sorumlu olan bir bölgedir. Bu yüzden evrim sırasında bariz bir genişleme ve gelişim geçirmiştir (18).

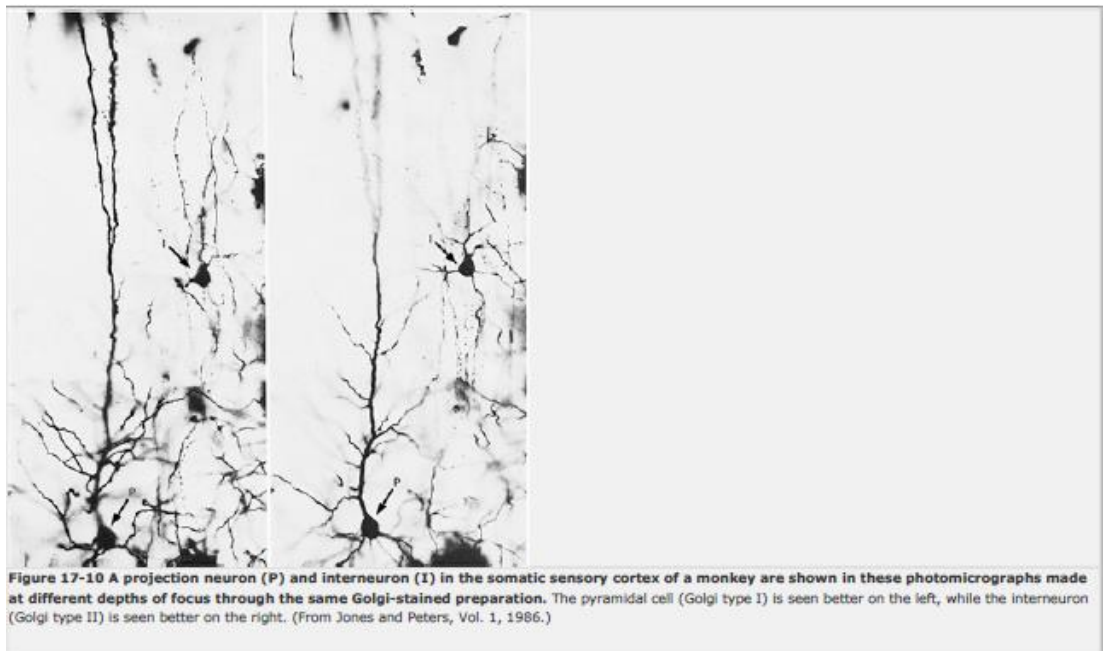
6 tabakalı neokortekste baskın 2 temel tür nöron bulunur; yerel bağlantıları sağlamak için internöronlar ve aksonları uzak serebral yapılara giden projeksiyon nöronları, ekseriyetle piramidal nöronlardır (Şekil 4.1.2-3). Neokorteks içerisindeki bu nöronal hücrelerin çeşitli şekillerdeki organizasyonu neokorteksin her biri farklı fonksiyonda 6 tabakalı yapısını oluşturur. Bu tabakalar şunlardır:

- Tabaka; aselüler moleküler tabakadır. Daha çok derin korteks bölgelerindeki nöronların dendritleriyle az miktarda nöron bulunur.
- II. Tabaka; yuvarlak, küçük ve yoğun granüler hücrelerden oluşan dış granüler tabakadır.
- III. Tabaka; büyüklüğü daha derin orta boyutluları daha yüzeysel yerleşimli olan piramidal hücrelerin bulunduğu dış piramidal tabakadır.
- IV. Tabaka; küçük düzensiz şekilli granüler hücrelerin oluşturduğu iç granüler tabakadır.
- V. Tabaka; III. Tabaka'dakilerden daha büyük piramidal hücrelerin olduğu iç piramidal tabakadır.
- VI. Tabaka; çok çeşitli hücre tiplerini içeren multiform tabakadır. Beyaz cevhere en yakın olan bölge burasıdır ve oradan kortekse gelen aksonları da içermektedir (Şekil 4.1.2-2) (13).

Tüm bu nöronal yapıları içerisinde barındıran bu kompleks beyin bölgesinin hasarları da aynı karmaşıklıkta ortaya çıkmaktadır. En önemli beyin işlevlerini üstlenen bu bölgenin hasarları insanlarda büyük kayıplara yol açmaktadır.



Şekil 4.1.2-2 Kortikal tabakalar (13)



Şekil 4.1.2-3 Projeksiyon nöronları ve internöronlar (13)

## 4.2 Merkezi Sinir Sistemi Hücrelerinde Hasarlanma

Merkezi sinir sistemi oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu karmaşık ama harmonik işleyen sistem içerisinde birçok sebeple işler beklenen gibi gitmeyebilir. Merkezi sinir sistemi hücrelerinde hasarlanma çok çeşitli yollarla ortaya çıkmaktadır ve ortaya çıkan her tablo ortaya klinik olarak farklı nörodejeneratif durumlar gösterir. Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları; amiyotrofik lateral skleroz, travmatik beyin hasarı, intraserebral hemoraji gibi çok geniş fiziksel görünüşleri olan nörodejeneratif durumların başlangıç noktaları ve yarattığı patolojik bulguları önemli farklılıklar içerir. Ancak daha yakından bakıldığında ise birbirine benzeyen sekonder mekanizmalarla, yolaklarla ilişkili oldukları görülür. En önemli ortaklıklarından biri ise hasarlanmış dokuya cevaben verdikleri inflamatuvar yanıtıdır (19).

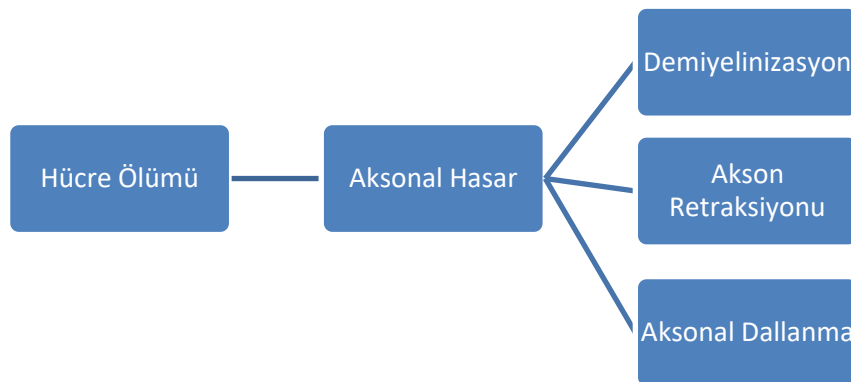
Nörodejenerasyon terim olarak ele alındığında sadece nöronu içeren bir bakışla dejenerasyonu ele alıyormuş gibi gözükse de çok yönlü bir kavramı karşılamaktadır. Nöronun ilişkide olduğu glial, vasküler ve hücreyel olmayan otonom mekanizmaları da kapsamaktadır (20). Örneğin vasküler sorunlardan doğan intraserebral hemorajiler, endotel ve nöron arasındaki sinyalizasyonun bozulduğu gözlenen Alzheimer hastalığı (21, 22) gibi tablolar nörodejeneratif bozuklukların tek varyantlı olmadığını göstermektedir. Ancak hangi sebeple olursa olsun nörodejeneratif durumların çoğunda aksonal hasarlanmanın eşlik ettiği de aşıkardır.

### 4.2.1 Aksonal dejenerasyon

Aksonal dejenerasyonu sinir sisteminde hasara yol açacak nörolojik hastalıklarda, kemotoksik ya da travmatik yaralanmalardan sonra nöronlarda görülebilecek en tipik yıkım şeklidir (Şekil 4.2.1).

Hasarla oluşan akson bütünlüğünün kaybı, öncelikle milisaniyeler içinde miyelin parçalanmasına sebep olur, ardından distal akson ucuna hücre dışındaki  $Ca^{++}$  iyonları akson içine dolmaya başlar (23). İçeri giren  $Ca^{++}$  DLK gibi yaralanma sinyallerini aktive eder. Bu sırada aksonal taşınımın gelen maddeler birikir, anterograd taşımın yerini daha çok retrograd taşınımına bırakır ve akson retraksiyon konisi oluşturur. Bunu hızlı bir şekilde hücre iskeletinin kaybı safhası izler ve bu yıkım kalpain gibi iyon duyarlı proteazlarla (24) gerçekleşir. Mikrotübüllerin yıkılımı aksonal dejenerasyonun ilk sinyallerini oluşturur (25). Hücre iskeletinin yıkımı da görüldükten sonra akson mikroçevresine bu dejenerasyona karşılık mikroglia ve makrofaj göçü gerçekleşir. Burada temel amaç deşrede olmuş akson ve miyelin parçalarını fagosite etmek olsa da bu yanıt mekanizması aksonal dejenerasyonun şiddetini de etkileyecektir.

Aksonal hasardan sonra oluşan ve hakkında akson uzamasında daha az bilinen fenomen akson retraksiyonudur. Yukarıda bahsedilen hızlı retraksiyondan sonraki uzun yanıt döneminde asetillenmiş tubulin dineinle retrograd taşımaya ile DLK, JNK ve JIP3 yaralanma sinyallerini taşımaya devam eder (26–28). Tersinden mitokondriyle beraber STAT3 proteinleri kinezinle taşınır ve ATP senteziyle dejeneratif etkinin şiddeti azaltılmaya çalışılır (29).



**Şekil 4.2.1** Aksonal hasar sonrası nöron yanıtları

### 4.3 Merkezi Sinir Sistemi Hücrelerinde Yaralanmaya Yanıt Mekanizmaları

Beyin dokusu herhangi bir hasarla karşı karşıya kaldığında dokunun ilk vereceği yanıt aktif hale gelen beyin immun sisteminin oluşturduğu inflamatuvar yanıt (30, 31). Nöroinflamatuvar süreç nörodegeneratif hastalıkların birçoğunun progresyonunda yer alır (32). Bu inflamatuvar yanıt öncelikle beyin immun hücreleri olan mikrogliaların aktive olmasıyla ve bunu takip eden periferik immun hücrelerin beyin dokusuna akışı ile sağlanır (33, 34).

Mikrogliaların temel işlevleri pasif durumda doku yapısı ve sinaptik oluşumları desteklemek ve hasara yönelik immun aktif duruma geçtiklerinde ise fagositik aktivitelerini tamamlamak üzere sitokin, kemokin, NO, ROS gibi maddeleri salgılamaktır (19). Sitokin, kemokinler gibi inflamatuvar düzenleyicilerin immun cevap olarak sekrese edilmesi nöronlarda önce fonksiyonel yıkıma daha sonra da nöronu yapısal hasara uğratabilir (35). Bu basamakta immun cevap giderek nörotoksikleşir ve hücreleri bekleyen iki durum oluşur; apoptoz ve nekroz.

Apoptoz mekanizması daha çok hücre içindeki yıkıcı mekanizmalara bağlı olarak gelişir. Genelde başlatıcı ve bitirici olarak iki farklı tür kaspaz aktivitesiyle oluşurlar. Kaspaz 8- 9 daha çok başlatıcı kaspazlarken, kaspaz 3-6-7 apoptozun bitirici darbelerini ortaya çıkartırlar. Kaspaz aktiviteleri, yani apoptotik olaylar, hem iç hem de dış faktörlerdeki değişikliklerle aktive olabilirler (36). Dış faktörlerle indüklenen apoptoz kısaca şöyle gerçekleşir;

- Salgılanan TNF ailesi bileşenleri proteinler ölüm reseptörlerine bağlanarak aktif hale gelir.
- Burdan gelen sinyaller DISC'i forme eder.
- Etkin hale gelen DISC proteini kaspaz-8'in aktif hale gelmesini sağlar.
- Başlatıcı kaspaz-8 bitirici kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptoz gerçekleşir.

İç faktörler ile gerçekleşen apoptotik olay mitokondrial eksenli değişikliklerle gerçekleşir. Bu değişiklikler direkt olarak intrinsik uyarılarla başlayabileceği gibi dış faktörler tarafından da başlatılabilir (37). Dış faktörlü apoptotik olayda aktif hale gelen kaspaz-8 Bid üzerinden pro-apoptotik Bcl-2

ailesini ve bu yolla da Bax proteinini etkin hale getirir. Bu da mitokondriden Sitokrom-c'nin salınımına yol açar (38). Sitokrom-c apoptotik bir moleküldür ve başlatıcı kaspaz-9 aktive eder, kaspaz-9 ise bitirici kaspaz-3'ü aktive ederek apoptoz meydana gelir (39). Apoptozun sadece iç mekanizmalarla oluşması genelde mitokondride gerçekleşen oksidatif strese bağlıdır. TNF ve ROS miktarının artması direkt olarak kaspaz aktivitelerini düzenler ve hücreyi ölüme sürükler.

Nekroz mekanizması ise genelde salınan TNF- $\alpha$  ve ROS miktarının beklenenden çok daha fazla miktarlarda bulunması veya uzun süredir maruz kalınan inflamasyon sebebiyle gerçekleşir (40, 41). Nekroz, dereceli olarak apoptozun kaspaz mekanizmasını inhibe eder ve hücrenin ATP yıkımını öne çıkartarak hücreyi ölüm yoluna sokar (40).

Apoptoz da nekroz da hasar sırasında salgılanan sitokin ve kemokinlere bağımlı gerçekleşen mekanizmalardır ve hücrelerin sağ kalımları düşünüldüğünde yukarıda bahsedilen moleküler yapılara terapötik müdahaleler hücrelerin dejenerasyonunun önüne geçilmesi için ana hedefler haline gelmesini sağlar.

Hasarlanan sinir sistemi her zaman ölüm yollarına girmeyebilir. Eğer regülatör sitokin ve kemokinlerin, ROS ve NOS'ların miktarları dengede tutulabilir, hasar alanını glial skarla çevreleyip büyümesini engelleyebilir ve hücrelerin normal şartlarda yerine getirdikleri potansiyel hayati döngüler aktive edilebilirse, hücreler hasarın verdiği zarardan bir ölçüde kurtulabilirler. Bunun için yıkılan nöral ağların tekrar restorasyonuna ve hatta nörojenez ihtiyacı duyulur.

#### **4.3.1 Nörorejenerasyon**

Omurgasız canlıların çoğu ve daha ilkel omurgalılarda yaygın bir şekilde periferik ve merkezi sinir sistemi rejenerasyon yeteneğine sahipken (42–44) memeli hayvanların doğumdan sonra yeni nöronların ortaya çıkaramayacağı düşüncesi bir dönem literatüre hakimdi. Ancak çeşitli çalışmalar yetişkin hipokampus, olfaktor bulbus, retinal gangliyonik hücreleri ve korteksinde dahi

nörörejenerasyonun izlerini bulmuşlardır (45–48). Elde edilen yetişkin nörogenezine ait bilgilere göre maalesef bu rejenerasyon yeteneği merkezi sinir sistemi hücrelerinde zayıftır (49–51).

Fakat embriyojenik ve yenidoğan hücrelere bakıldığında durum değişmektedir. Yenidoğan kültürlerinin aksotomiye rağmen yaşadığını bildiren çalışmalar mevcuttur (52, 53). E18 nöronlarla yapılan bir çalışmada, hasarlı kortikal nöronların neredeyse %50, hipokampal nöronlarınsa tamamına yakınında nörörejenerasyon görmüşlerdir (54). Yetişkin nöronlarla karşılaştırıldıklarında embriyojenik ve yenidoğan nöronların çok daha hızlı bir şekilde hasarlanan akson ucundan büyüme konisi geliştirebildikleri, bu sayede daha çabuk akson uzamasını sağlayabildikleri ve tekrar inşa edilen büyüme konilerinin rejenerasyonun ana odaklarından biri olduğu fark edilir (54–58).

Büyüme konisinin oluşabilmesi için hasarın olduğu bölgedeki lokal moleküller, hasar öncesi aksone doğru yola çıkmış olan kargolar, hasar bölgesinde lokal translasyonlar ve somada meydana gelecek gen ekspresyonlarıyla beraber yeni moleküllerin sentezi ve taşınması gerekir. Hasarın olduğu bölgede ilk anda ortaya çıkan molekül  $Ca^{++}$  molekülüdür. Parçalanmış aksondan hücre içine doğru yüksek miktarlarda  $Ca^{++}$  girişi olur ve bu da rejenerasyonun başlangıç aşamasını oluşturmaktadır (23), öyledir ki  $Ca^{++}$  bulunmayan ortamda yapılan aksone hasar sonrası büyüme konisi oluşmaz ve rejenerasyon meydana gelmez (58–61). Oluşan  $Ca^{++}$  akışı büyüme konisi için gereken hücre iskeleti elemanlarının oluşması için sinyal mekanizmasını oluştururken aynı zamanda hasarlanan membranın hızlıca kapanmasını, geriye doğru moleküller sinyalizasyonu ve lokalize translasyonu sağlar (57, 62–66).  $Ca^{++}$  akışı aynı zamanda ERK sinyalizasyonunu da sağlar (67). ERK-1, ERK-2 ve p38 MAPK'in inhibitörlerinin de büyüme konisinin rejenerasyonunu önlediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (24, 68–70). Bu kinazlar büyüme konisinin restorasyonunda direkt görev alır.

Yine büyüme konisinin oluşabilmesi için kalpailer tarafından yıkılan hücre iskeletinin (24) yeniden forme edilmesi gerekir (69). Büyüme bağlantılı tubulin (71) ve akson yönlendirme için gerekli aktin (63) lokal protein sentezleri sayesinde tekrar yapılırlar (57). İmmatur kortikal nöron aksonlarına



da RNA bulunduğu (72) için yine burada nörorejenerasyon potansiyeli daha fazla olmaktadır.

Bu mekanizmaların yanı sıra nörorejenerasyonun yeni gen ekspresyonu ile de oluşabileceğinden bahsedilmiştir. Yetişkin beyin ve spinal kordunda yaşam boyunca kök hücrelerin bulunduğu bilinmektedir (73). Magavi ve ark.'nın kortikal tabaka IV nöronlarına BrdU ile verdikleri kontrollü hasar modelinde doğru lezyon koşulları oluşturmanın progenitör hücreleri apoptoza karşı piramidal nöronlara dönüştürebileceğı gösterilmiştir. Oluşan hücreler uzun aksonlar uzatmış ve kortikotalamik bağlantıları da tamamlayabilmişlerdir (74). Aynı zamanda akson hasarı çoğu durumda transkripsiyon faktörlerini ve epigenetik düzenleyicileri de aktive ettiği durumların olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (75).

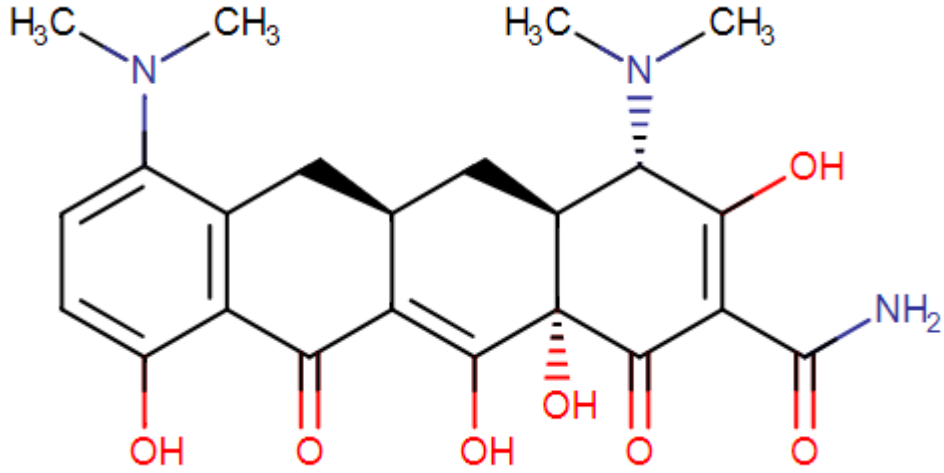
Tüm bu rejeneratif mekanizmaların karşısında hasar yanıt olarak ortaya çıkan glial skarın negatif etkisi de ortaya çıkmaktadır. Hasar boyutunu azaltmak ve hücre içi apoptotik sinyalleri çevrelemek için oluşan glial skar bir yanıyla sağlıklı bir cevap gibi dursa da fiziksel bir bariyer oluşturması ve aksonun elongasyonunu engelleyen inhibe eden proteoglikanlar, TNF'ler gibi protein ailelerini salgılaması yönüyle de nörorejenerasyonun önünde engel teşkil etmektedir (77). Burada yine yetişkin ve embriyonik hücreler arasındaki fiziksel farkı görmekteyiz. Embriyonik hücrelerin glial çevreleri yetişkinlere göre daha farklı seyreder. Embriyonik aksonlar miyelinsiz oldukları için çevreden gelen nörotrofik yol gösterici faktörlere doğrudan maruz kalabilirler ve bu da onların daha kolay nöronal rejenerasyonunu sağlar. Ancak yetişkin nöronlarda bulunan miyelinin yarattığı izolasyon aynı faktörler salınsa dahi aynı etkiyi yaratamayacaktır. Hasarlanan miyelin debrislerinin de miyelin bağlantılı inhibitörleri aktive edip aksonal uzamayı kısıtlayacağı da gösterilmiştir (78, 79). Bu olumsuz faktörlerin yarattığı etkilerin kısıtlayıcı mekanizmalarını bulmak nöronlarda rejenerasyonu tetikleme için anahtar olacaktır.

Tüm bunlar ele alındığında aslında nörorejenerasyonun sadece nöronun içsel faaliyetinden meydana gelmediğı nöronun bulunduğu mikroçevrenin içinde bulunduğu durumun da çok belirleyici olduğu açıktır.

#### 4.4. Minosiklin ve Etkileri

##### 4.4.1. Minosiklinin farmakolojik yapısı ve metabolizması

7-dimetilamino-6-dimetil-6-deoksitetrasiklin açık formülüne sahip minosiklin 30 yılın üzerinde kullanım süresine sahip ikinci kuşak, yarı sentetik bir tetrasiklin analogudur (Şekil 4.4.1). Minosiklin farmakokinetik olarak birinci kuşak tetrasiklinlerden çok daha iyi bir profile sahiptir. Ağızdan alındığında hızlıca ve tamamen emilir, yaşlı popülasyonda dahi uzun ömrü ve mükemmel doku penetrasyonu ile %100 biyoyararlanım gösterir (80–82). Metabolizasyonu karaciğerde olan ilacın, atılımı fekal yolla gerçekleşir, üriner yolla atılımı minimaldir (83).



Şekil 4.4.1 Minosiklinin kimyasal yapısı

Minosiklin uzun süreli kullanımlar için güvenli bulunmuş bir ilaçtır. Uzun dönemli tedavilerde günde FDA tarafından önerilen en yüksek doz olan 200mg'a kadar insanlarda genelde güvenli ve iyi tolere edilebilir olarak bulunmuştur. Minosiklinin en bilinen yan etkileri şöyledir; fotosensitivite, karaciğer ve böbrek toksisitesi, dişlere etki, diyare, bulantı, vertigo, hafif baş dönmesidir. Bu çok görülen yan etkiler genelde alımından sonraki erken

dönemde başlar ve tedavinin sonlandırılmasıyla kısa sürede kaybolur. Ancak 6 aydan uzun sürecek tedaviler için hastaların 3 ayda bir genel kontrolden geçirilmesi tavsiye edilir (82–84).

#### **4.4.2. Minosiklinin antibiyotik etkisi**

Tetrasiklinler geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiklerden sayılırlar. Çünkü aerobik - anaerobik, gram pozitif- gram negatif ve Riketsiya, Klamidy, Plasmodyum ve Mikoplazma pnömonia gibi mikroorganizmaların tamamına karşı aktif olarak çalışırlar. Tetrasiklinlerin antibiyotik olarak görev yapmalarını sağlayan temel mekanizma; bakteriyel 30S ribozomal alt ünitelere bağlanabilme ve protein sentezini inhibe etme yetenekleridir. Etkinliğini arttırmak adına birçok yapısal değişiklik üzerinde çalışılmıştır. Örneğin, 7 ila 9. karbonları arasındaki ring modifikasyonu, minosiklin ve doksisisiklinin semi sentetik bileşikleriyle yüksek etkinliğe taban oluşturmaktadır (85).

Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin üzerinde etkili olan minosiklin, akne vulgaris tedavisi için İlaç ve Sağlık Bakım Ürünleri Düzenleme Ajansı tarafından (MHRA-İngiltere) ve romatoid artrit ile cinsel yolla bulaşan bazı hastalıkların tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA-ABD) tarafından geliştirilmiştir (86, 87).

Antibiyotik amaçla akne vulgaris, lepra, gonore, riketsia enfeksiyonları, mikoplazma enfeksiyonları, basil enfeksiyonları, kok enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, üretrit ve bunun dışında yüksek lipofilik özelliğinden dolayı merkezi sinir sistemine geçiş yapabildiği için daha yeni olarak nörolojik hastalıklarda da kullanılmaktadır (83).

#### 4.4.3. Minosiklinin nörodejenerasyona etkisi

Minosiklin kan beyin bariyerini kolaylıkla aşabilen lipofilik bir madde (88) olmasıyla serebrospinal sıvıya ve merkezi sinir sistemi hücrelerine geçiş yapmayı başarır (89–91). Bu özellik de minosiklinin birçok merkezi sinir sistemi hastalığının tedavisinde kullanılabilme olasılığını ortaya çıkarmıştır (3, 92, 93). Tetrasiklinlerin antibiyotik özellikleri ilk olarak 1940'larda tanımlanmıştır ancak daha yeni olarak, çalışmalar daha çok antibiyotik olmayan özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır. Gerçekten de tetrasiklinlerin anti-mikrobiyal aktivitelerinden bağımsız olarak, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik aktiviteleri ile anjiyogenez, tümör metastazı ve proteoliz üzerindeki inhibe edici etkilerini içeren çok çeşitli biyolojik etkileri belirtilmiştir (94–97). Minosiklin özelinde bakılacak olursa roza, büllöz dermatoz, nörotrofilik hastalıklar, pioderma gangrenozum, sarkoidozis, aort anevrizmaları, kanser metastazları, periodontit ve otoimmün hastalıkları (romatoid artrit ve skleroderma gibi) içeren inflammatuar kökenli hastalıklar için yararlı olduğu daha önce de belirtilmiştir (91, 98).

Bu çalışmalardan yola çıkılarak minosiklinin antiinflammatuar, immunomodülatör ve nöroprotektif etkilerinde yer alan mekanizmaları araştırılmaya başlanmıştır. iNOS, MMPs, PLA2 gibi anahtar enzimlerin aktiviteleri üzerindeki inhibitör etki (99–101), p38 MAPK fosforilasyonunun redüksiyonu (102), kaspaz 1 ve kaspaz 3 aktivasyonunun inhibisyonu (103), Bcl-2 sebepli etkilerin iyileştirilmesi (104–106), PARP-1 aktivitesinin inhibisyonu (107), tirozin proteininin nitrasyonunun redüksiyonu (108) gibi bulgular çalışmaların bu alanda daha da derinleşmesine kanıt olmuştur. Anti inflammatuar ve anti apoptotik özelliklerinden yola çıkılarak araştırmacıların merakını merkezi sinir sistemi için de çekerek çalışmaların yapılmasına sebep olmuştur.

Yrjanheikki ve ark. (2) minosiklinin nöroprotektif etkisini yayınlamış ilk gruptur. Bu buluş minosiklinin deneysel inme, nörodejeneratif hastalıklar ve spinal kord hasarında da nöroprotektif etkilerinin araştırılmasına öncülük etmiştir. Bu çalışmaların bazıları, minosiklinin önemli nöroprotektif etkilerini

göstermişken bir taraftan diğerleri, minosiklinin etkisiz hatta yıkıcı etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmaların vardığı sonuçlar hangi deneysel modelin kullanıldığına, hangi dozda verildiğine, veriliş şekline, ilaç tedavisinin süresine, türe göre değişiklik göstermektedir. Örneğin minosiklin dozunu test eden çeşitli çalışmalardan nöroproteksiyon gösterenler görece daha düşük dozlar olup yüksek dozlarda toksisite gözlenmiştir (109, 110). Şaşırtıcı olarak, minosiklin tedavisi yenidoğan farelerdeki inme modellerinde kötü prognoza sebep olurken, benzer doz ve paradigma ile verilen minosiklinin sıçanlardaki hasarı azalttığı görülmüştür (110, 111).

Ancak yine de minosiklinin nöroproteksiyon etkileri azımsanmayacak ölçüde değerlidir ve iskemi modelleri, intraserebral hemoraji, spinal kord yaralanmaları, travmatik beyin hasarları, Parkinson ve Huntington hastalıkları, Alzheimer hastalığı, Amiyotrofik Lateral Skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif durumlarda nöroprotektif etkileri çalışılmaktadır.

#### **4.4.3.1. İskemik inme**

Anti-inflamatuar özelliklerine karşın, minosiklin hem global hem de fokal iskemi modellerinde nöroprotektif ajan olarak rol oynadığı ve bu süreci iskemik beyin bölgesinden inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile sağladığı gösterilmiştir (112, 113). Gerbillerde yapılan önbeyin iskemi modeli, minosiklinin tedavisi iskemik hasarın hemen ardından başlasa dahi mikroglyal aktivasyonu engelleyerek infarkt boyutunu küçülttüğü, hipokampal nöronların yaşama ihtimallerini arttırdığı rapor edilmiştir. Bu etkiler etkilenen beyin bölgelerindeki IL-1 $\beta$  dönüştürücü enzimlerin, COX-2 ve iNOS mRNA seviyelerinde azalmanın eşliğinde oluşur (2, 114).

Fokal beyin iskemisinde MMP inhibisyonun infarkt hacmini azaltan ve böylelikle nöroproteksiyon sağladığını belirten çalışmalar (115) sonucunda minosiklinin de bu yolu kullanarak nöroproteksiyon sağladığı düşünülmüştür (116, 117). Minosiklinin nöroprotektif etkisinin MMP'ı inhibe ederek ortaya çıktığını öne süren bir çalışmada (116) MMP-9 bulunan ve MMP-9 knock-out edilen farelerde beyin iskemi modeli oluşturulmuş ve kalıcı beyin iskemisine

karşı MMP-9 bulunan farelerde koruma görülürken, MMP-9 knock-out edilen farelerde koruma görülmemiştir. Sonrasında Park ve ark. (117) yaptığı bir diğer çalışmada farelere intraperitoneal verilen 1ml/100g minosiklinin, yine diğer MMP inhibitörlerine benzer şekilde, deneysel fokal kortikal iskemiyi takip eden nöroinflamasyonun tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar, hem iskemik olaydan önce hem de sonra minosiklin tedavisinin MMP inhibisyonu üzerinden infarkt hacmini ve iskemik kortekste inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunda azalttığını göstermişlerdir.

Minosiklin tedavisi sonrası beyin içerisindeki inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonundaki azalma birçok klinik öncesi tekrarlı çalışmada ortaya konmuştur. Bu mediyatörlerden önemli biri olan HMGB-1 ile minosiklinin ilişkisi ve bu yolla iskemik hasarın korunması arasındaki ilişki saptanmıştır (118, 119). HMGB-1 iskemide aktif rol alan alarmin grubu bir çekirdek proteindir (120) ve nekrotik hasarlı hücreler tarafından ekstraselüler alana salınır (121). Bu yüzden iskemide bir markır olarak kullanılmaktadır. Kikuchi ve ark. (118) oksijen ve glikozu deprime ederek oluşturdukları in vitro iskemi modelinde minosiklinin HMGB-1'le düzenlenen p38 MAPK ile ERK 1/2 aktivitesini inhibe ettiğini ve buldukları deneysel koşullar altında ilk 4 saat hücre ölümü görmediklerini bildirmişlerdir. Bu da minosiklinin akut fazda yararlı bir etkisinin olabileceği sonucuna varılmasına kanıt oluşturmaktadır. Bir başka çalışmada Hayakawa ve ark. (119) 4 saat MCA oklüzyonu yapılan murinleri 14 gün boyunca intraperitoneal olarak minosiklinle tedavi etmişlerdir ve buldukları moleküler sonuçlara göre minosiklin geç dönemde dahi mikrogliyal aktivasyonu inhibe ederek HMGB-1'i azaltmıştır. Ayrıca murinlerde iskemi kaynaklı nöromotor bozukluklarda iyileşme elde edilmiştir.

Minosiklinin in vitro ve in vivo çalışmalarda farklı nöronal hücre tiplerinde farklı etkiler gösterdiği de görülmüştür. Örneğin in vivo ve in vitro modellerdeki nöronlar için düşük dozlarda nöroprotektif bulunan minosiklinin astrositler üzerinde koruyucu bir etkisi gözlenmemiştir (109). Buna karşılık, iskemi kaynaklı astroglioziste azalma ve iskemik hasardan sonra azalan beyaz cevher hasarı minosiklin uygulaması ile beraber ortaya çıkmıştır (122, 123).

Minosiklinin en önemli etki mekanizmalarından biri olan mikrogliyal aktivasyonun inhibisyonu yoluyla oluşturduğu koruyucu etkinin yanı sıra Min ve ark. (124) yenidoğan farelerde yaptıkları araştırmada minosiklinin sadece mikrogliyal aktivite üzerinden beyin inflamasyonunun azaltıldığını değil bunun yanında periferik inflamasyon cevabı olarak ortaya çıkan lökosit aracılı inflamasyonu da azalttığını rapor etmiştir. Bunun yanında minosiklinin kognitif düzeyde de iyileşme etkisi kaydedilmiştir (125).

Bahsedilen çalışmalarda minosiklin akut fazdaki etkilerinin yanında Arvin ve ark. (126) hipoksik iskemik hasardan sonra kronik dönem için sistemik minosiklin tedavisinin düzenlenebileceğini, kaspaz 3 aktivasyonunu ve kalpain klivaj substratı önleyerek gelişen beyinde nöroproteksiyon sağlanılabileceğini belirtmiştir.

Preklinik çalışmaların umut vadetmesi sonucunda araştırmacılar iskemik beyin hasarından muzdarip hastaların tedavilerinde minosiklinin kullanılıp kullanılmayacağını araştırma konusu edinmişlerdir. Açık uçlu, katılımcı kör bir çalışmada 5 gün süresince günde 200 mg minosiklinin oral alımının akut merkezi sinir sistemi hasarında 6 ila 24 saat içinde büyük komplikasyonları önlediğini, 7. , 30. ve 90. günlerde anlamlı derecede NIH İnme Skalası skorlarını düşürdüğünü ve Barthel İndeksi skorlarını yükselttiğini raporlanmıştır (127). Bu da minosiklinin akut fazda alımının iskemik hasar prognozunda iyileşmeye yarar sağladığını göstermektedir.

Minosiklinin *in vivo* ve *in vitro*da görülen inhibitör etkisi infarkt boyutunda azalmayla ortaya çıkarken pozitif etkisi kognitif davranışsal komplikasyonlarda görülmektedir. Deneysel modellerdeki bu sonuçlarla yapılanön translasyonel çalışmalarda akut fazda minosiklinin nöromotor iyileşmeye katkıda bulunduğu özetlenebilir.

#### **4.4.3.2. İntraserebral hemoraji**

İntraserebral hemoraji görülen inme vakalarının yaklaşık 5'te 1'ini oluşturup inmenin en önemli nedenleri arasında (33) yer almaktadır (128). Temelde beyindeki kan damarlarının spontan rüptürleriyle oluşur. Damar

bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte kan beyin parenkimine dolar, kan beyin bariyeri hasarlanır, hematomlar oluşur (129, 130). Oksijen ve glukozun taşınımı sekteye uğrar ve nöronlarda apoptoz ve nekroz izlenir. Hematomlu bölgede mikroglialar aktifleşir, periferdeki immün hücreler beyne doğru göç ederler (33, 34). Ödem meydana gelir ve pro-inflamatuar sitokinler üretilir. İntraserebral hemorajiye yanıt olarak salınan en önemli sitokinler arasında TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve MMP-12 sayılabilir (131).

Minosiklinin bilinen etkilerinden dolayı araştırmacılar İSH'de de hangi tedavi edici etkileri olabileceğini çalışmışlardır. İn vivo modellerde oluşturulan birkaç çalışmada İSH sonrası verilen minosiklinin ödem ve mikrodamar yapısındaki bozulmadan kaynaklı hasarı azalttığı (132), TNF- $\alpha$  ve MMP-12 ekspresyonunu düşürdüğü (72, 132, 133), trombin kaynaklı aktive olan mikrogliaların salgıladığı IL-1 $\beta$  miktarını, hematoma çevresi beyin ödemi ile atrofisini ve nörolojik bozuklukları azalttığı (72), subkortikal beyaz cevheri de koruyucu ve fonksiyonunu düzeltici etkisi olduğu (134) kanıtlanmıştır. Ancak hematoma sınırında yaşayan ancak 1-3 gün sonra içinde ölme eğilimi gösteren nöronlara etkisine bakıldığında minosiklin mikrogliyal aktiviteyi azaltmasına rağmen bu nöronlara karşı nöroprotektif olamamış, doku kaybını önleyememiştir (131). Bu da minosiklinin nöroprotektif etkisinin hücreyel yanıtlarında her zaman aynı sonuçlara sebep olmadığını gösterir. Başka bir çalışma da minosiklin verilmiş şeklinin minosiklinin etkinliğine önemli katkısı bulunduğunu göstermiştir. İntrakraniyal ve intraperitoneal verilip karşılaştırıldığında intrakraniyal olarak direkt hematoma üzerine verilen minosiklinin dozaj da arttığında beyin hasarını ve nöron kaybını daha çok azalttığı kanıtlanmış, hem intrakraniyal hem de intraperitoneal verilen minosiklinin ise sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur (135).

İN vitro modellerde, minosiklin kollajen tip-IV kaybını, mikrogliyal aktivasyondan ortaya çıkan ROS üretimini düşürür (136).

Bu bulgulardan yola çıkılarak yapılan klinik çalışmalar da yapılmıştır. Orta ve kronik İSH hastalarında yüksek doz intravenöz (maksimum 700mg) minosiklin kullanımı güvenlidir. Klinik ve radyolojik bir etkisi görülmesi bile hastaların MMP seviyesinde 5. günde anlamlı bir azalış yaratmayı başarmıştır



(137). Fouda ve ark. yine MMP inhibisyonu görmeyi bekledikleri akut İSH'li hastalarda minosiklin kullanımından sonra bir düşüş gözleyememişlerdir. Ancak hastane öncesi intravenöz minosiklin kullanımının güvenli olduğunu bildirmişlerdir (138).

#### 4.4.3.3. Spinal kord hasarı

Spinal kord hasarları (SKH) en sık görülen travmatik hasarlardan biridir. Motor nöronların işlevini bozduğu ve duyu yollarını etkilediği için vücutta önemli lokomotor fonksiyonların yerine getirilememesine sebep olur. Bu bağlamda spinal kord hasarlarında minosiklin uygulamaları daha çok motor fonksiyon üzerine yoğunlaşmıştır.

Yapılan fare ve sıçan SKH modellerinde arka ekstremitelerde motor fonksiyon ve koordinasyonun geliştiği gösterilmiştir (139–144). Motor fonksiyonun gelişmesine yarar sağlayan mekanizmalar arasında azalan mikrogial aktivitenin baskılamadığı nöro-büyüme faktörlerinin ortaya çıkması (140), oligodendrosit ölümünün gecikmesi veya azalması ile genel apoptozun azalmasının etkisi (140, 143, 144) ile bununla korele görülen lezyon bölgesinin ve aksonal hasarın azalması (139, 143–145), sitokrom c ve kaspaz aktivitesinin azalması (146, 147) bulunmaktadır. Bunun yanısıra yukarıda bahsedilen azalmış mikrogial aktivitenin SKH'ndaki akut ve kronik etkilerini *in vitro* ve *in vivo* olarak inceleyen Pinkernelle ve ark. (148) akut fazda glial skarın bileşeni olan reaktif astrositin bağışıklık ve glutamat düzenliliği üzerindeki yararlı etkilerini minosiklinin baskıladığına vurgu yapmışlar ve kronik dönemde kendi *in vitro* modellerinde minosiklin tedavisiyle glial skarı azaltabildiklerini göstermişlerdir. Bu nedenle akut faz yerine SKH'da kronik fazda minosiklin tercihi kullanılabilir.

Bu çalışmaların açtığı yolda Casha ve ark. SKH'lı hastalarda önce faz I (149) daha sonra faz II (150) çalışmalarda minosiklin tedavisini denemiştir. Faz I çalışmada 1 yıl boyunca günde toplam 400 mg'ı aşmayacak şekilde intravenöz minosiklin alan hastaların ASIA, FBÖ, SCIM gibi fonksiyonel SKH skalalarında anlamlı iyileşme görmüşler ancak bu iyileşmeyi sadece servikal

kord seviyesinden yaralanmış hastalarda elde etmişlerdir. Faz II çalışmasında ise plasebo verilen hastalara kıyasla 7 gün boyunca 200 mg minosiklin alan hastalar ASIA skalası motor fonksiyonda 6 puan gelişme göstermişlerdir. Yine burda da servikal kord inkomplet yaralanmalı hastalarda daha büyük bir iyileşme gözlenmiştir (Faz III çalışma yayınına ulaşılammıştır.).

SKH'nın yol açtığı bir diğer bozukluk duyu yollarının hasarına bağlı ortaya çıkan nöropatik ağrıdır. Minosiklin kullanılan SKH hayvan modellerinde IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  ile p38 MAPK üzerinden nosisepsiyonun yeniden düzenlenmesini sağlayarak nöropatik ağrının azaldığını saptayan çalışmalar literatürde mevcuttur (151–153).

#### **4.4.3.4. Travmatik beyin hasarı**

Travmatik beyin hasarı (TBH) halk sağlığını ilgilendiren en önemli nörodejeneratif bozukluklardan biridir (154). Bu nedenle sinir sistemini koruyucu etkisi bulunan minosiklinin travmatik hasarlara olan etkisi birçok çalışmanın konusu olmuştur.

Travmatik beyin hasarı sonrası nöroinflamasyona aracılık eden beyin yerleşik immün hücreleri olan mikroglialar aktive olurlar. Hasarı takiben kortikal dokuda sitokin ve kemokin ekspresyonunda artış ile hasar alan hemisferdeki talamus ve hipokampüste dahi bariz doku hasarı meydana gelir. Bu hasar sonucu oluşan tablo hem olgun hem de pediatrik beyinde hemen hemen aynıdır (155–159).

Minosiklin TBH sonrası in vivo yapılan deneylerde yetişkin ve pediatrik beyinde aktif hale gelen mikroglial aktiviteyi özellikle akut dönemde azaltmıştır (160–162). Bunun yanında azalmış mikroglial aktivitenin bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülen hasarlanmış bölgenin hacminin azalması yetişkin hayvanların kullanıldığı çalışmalarda yine akut dönem minosiklin tedavisi ile sağlanmıştır (160, 163). Şaşırtıcıdır ki pediatrik hayvanların kullanıldığı çalışmalarda özellikle talamusta nöron hayatta kalımını sağlasa dahi hasar hacmine minosiklin tedavisini etkisiz kaldığı da bildirilmiştir (161, 162). Yine daha ilginç olarak, yeni bir klinik çalışmada orta-

ağır TBH'lı hastalarla yapılan uzun erimli bir çalışmada akut minosiklin tedavisinin insanlarda da mikroglial aktiviteyi azalttığı ancak uzun dönemde beyin atrofisine sebep olduğu gösterilmiştir (164).

Yine beyin hasarına yanıt olarak görülen önemli sitokinlerden IL-1 $\beta$  yetişkin in vivo çalışmalarda minosiklin tedavisiyle akut dönemde azalmıştır (160, 163). Minosiklinin IL-1 $\beta$  ları baskılama mekanizmasını kaspaz-1 ekspresyonunu inhibe etme yoluyla elde ettiği düşünülmektedir (163). Aksine pediatrik modellerin kullanıldığı çalışmalarda inflamatuvar etkinin olmadığı tartışılmıştır (162).

In vivo yapılan çalışmalarda akut dönemde motor defisitlerde (160, 163) ve kognitif süreçlerde iyileşmeyi -özellikle beyaz cevherin korunumu yoluyla- (165–167) sağladığı da gösterilmiştir. Ancak yine Scott ve ark. (164) yaptığı klinik çalışmada kognitif parametrelerde azalma görülmüştür. Çelişkili gibi gözüken bu çalışmaların daha iyi anlaşılması için daha fazla karşılaştırmalı araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

#### **4.4.3.5. Parkinson hastalığı**

Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra görülen en sık ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Nigrostriatal yolaktaki dopaminerjik nöronların kaybı ile Lewy cisimcikleri denen a-sinüklein agregatlarıyla karakterizedir. Oksitadif stres, mitokondrial disfonksiyon ve nöroinflamasyon hastalığın prognozunda etkili unsurlardır (168). Artmış mikroglial aktivitenin de ROS sekresyonunu arttığı gözlenmiştir (169). Minosiklinin bu unsurlardaki bulunan etkileri Parkinson hastalığının tedavisi için çeşitli modeller kullanılarak araştırılmıştır.

Kimyasal bir Parkinson modellerinde yapılan çalışmalardan bazıları mikroglial aktivitenin ve hücre ölümlerinin azaldığını bulurken (170, 171), diğerleri azalmış mikroglial aktivite ve artmış nörotoksisiteyi rapor etmişlerdir (172, 173). MTPT Parkinson fare modelinde minosiklinin nigrostriatal dopaminerjik nrodejenerasyonunu önlendiği ve bu etkinin striatum ve nukleus akkumbensteki dopamin tktiminin önlenmesi ile ve kaspaz-1 iNOS

ekspresyonu azalmasıyla ilişkisi kurulmuştur (171). Wu ve ark.nın yaptığı çalışma ise nigrostriatal dopaminerjik nöronları koruma yeteneği olan minosiklinin azalmış mikroglia aktivasyonu, olgun IL-1 $\beta$  formasyonunun inhibisyonu, NADPH oksidazı ve iNOS aktivasyonu ile olan ilişkisini ortaya koymuşlardır (174). Ek olarak serebellar granüler nöronlar ve glia primer kültürünün kullanıldığı in vitro bir çalışma MPP+'nin aracılık ettiği iNOS ekspresyonu ve NO-indüklü nörotoksisiteyi inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu etki serebellar granüler nöronlardaki p38 MAPK inhibisyonu ile alakalı bulunmuştur (171). Tam tersine, Yang ve ark. yaptıkları çalışmada minosiklinin MTPT indüklü toksisiteyi azaltmadığı ve dopaminerjik nöronlar üzerinde koruyucu etki yapmadığını ortaya koyan sonuçlar elde etmişler ve bunu minosiklinin dozu, veriliş şekli gibi yöntem farklılıklarına bağlamışlardır. 1 yıl sonra yapılan primat kullanılan bir çalışmada ise minosiklinin putaminal dopaminerjik sinir sonlanmalarında büyük kayıplara yol açtığı dikkat çekmiştir. Çalışmanın devamında yapılan fare modelinde ise minosiklin alan grup daha yavaş motor iyileşme göstermiş ve dorsal striatumda dopaminerjik hücre kaybı daha fazla saptanmıştır (172).

Weaver farelerin kullanıldığı genetik Parkinson modelinde, minosiklin tedavisinin nigrostriatal nöroproteksiyona yol açtığı bulunmuştur (175).

Yine başka bir model olan 6-OHDA Parkinson modeliyle yapılan çalışmalarda birbiriyle tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalarda minosiklinin mikroglial aktiviteyi azaltarak nigrostriatal dopaminerjik nöronları koruduğu (176) ancak bu terapötik etkinin minosiklinin veriliş zamanıyla belirleyici olacağına dikkat çekilmiştir. Özellikle hasar sonrası verilen minosiklinin hücre kaybını daha azalttığı tartışılmıştır (177). Minosiklinin veriliş zamanını araştıran yeni bir çalışma ise zebra balıklarında yapılmış, 6-OHDA enjeksiyonundan önce verilen minosiklinin dopaminerjik nöronları koruduğu ve kontrollere nazaran daha hareketli oldukları gözlenmiştir. 6-OHDA enjeksiyonundan sonra verilen minosiklinle nörorestorasyon etkisine bakılmış ve lokomotor fonksiyonun tam olarak iyileştiği saptanmıştır. Ancak dopaminerjik nöronları bir kısmı restore olsalar dahi tam olarak iyileşme göstermemişlerdir (178).

Hayvan modellerindeki bu sonuçlara dayanarak klinik çalışmalar da düzenlemiştir. Bir pilot klinik çalışmada hastalara 18 ay boyunca günde 200 mg minosiklin verilmiş. Değişiklikler Parkinson hastalığı derecelendirme skalası ile değerlendirilmiş, semptomlarda azalma ya da artma gözlenmemiştir (179).

#### **4.4.3.6. Huntington hastalığı**

Huntington hastalığının transgenik R6/2 fare modelinde minosiklinin etkilerini araştırılmış ve hastalığın ilerleyişini ve ölüm oranını geciktirdiğini rapor etmişlerdir. Altında yatan mekanizma olarak da kaspaz-1 ve kaspaz-3'ün ekspresyonunu inhibe etmesi ile azalmış iNOS aktivitesi olarak belirtilir. Dahası minosiklin ile tedavi edilmiş farelerin beyinlerinde daha düşük miktarda olgun IL-1 $\beta$  bulunmaktadır (103). Ancak başka bir çalışma ise yine aynı genetik model üzerinde yaptıkları çalışmada minosiklinin terapötik etkisine dair bir işaret bulamamışlar ve hatta zararlı etkilerine dikkat çekmişlerdir (172, 180). Diğer yandan minosiklinin pirüvat ya da koenzim Q ile kombine şekillerde kullanımı HH taşıyan farelerde önemli ölçüde nöroproteksiyon sağlamıştır (181, 182).

Pre-klinik çalışmaları çelişkili olan minosiklinin olumlu etkiler göze alınarak dahil edildiği klinik çalışmalara da literatürde rastlamak mümkündür. Az katılımcılı açık bir çalışmada minosiklinle 2 ay boyunca günde 100-200 mg minosiklinle tedavi edilen hastalar 6 ay sonunda değerlendirilmiş ve toksisite bulunmamasının yanısıra motor iyileşme ve mini mental skorlamalarında artış elde edilmiştir. 24. ayda takiplerinde ise motor fonksiyonallikte denge ve psikiyatrik bulgularda azalma bildirmişlerdir (183). Aynı dozların kullanıldığı çift kör randomize kontrollü bir araştırmada ise hastalar minosiklin dozunu iyi tolere etmiş ancak HH değerlendirme ölçeğinde bir değişiklik kaydedilememiş ve hatta stroop testte daha kötü sonuçlar belirtilmiştir (184). Diğer bir pilot çalışmada ise tolerasyonun iyi olduğunu benzer şekilde ortaya koymuş fakat 6 aylık minosiklin tedavisinden sonra motor gelişmeden yoksun kalınmıştır (185). 18 ay boyunca yapılan çalışmada günde 200 mg minosiklinin iyi tolere

edilebilir ve güvenli olduğu bulunmuş, total fonksiyonel kapasitede anlamlı olmasa da göz ardı edilmeyecek iyileşme kaydedilmiştir (186). Bu çelişkili sonuçlar minosiklinin moleküler etki mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılabilmesi kaynaklı etkilerinin öngörülememesinden izleniyor diye düşünülebilir.

#### 4.4.3.7 Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalığı nöronal hücre kaybı, plak agregasyonundan doğan vasküler hasar ve nörofibriler yumaklarla karakterize kognitif fonksiyonlara da etki eden nörodejeneratif bir hastalıktır (187, 188). AH'nda amiloid beta oluşan sabit ve belirgin nörit plaklarının bir bileşeni ise aktif mikroglialardır (189). Görülen bu mikroglial aktivite ve sonrasında yol açtığı IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokin ve proteazların sekresyonu (189) minosiklinin farmakolojik profilinin AH tedavisine bir aday olabileceği düşüncesini oluşturmuştur. AH'da minosiklinin etkilerini araştıran ilk çalışma saporin verilen farelerdeki kolinerjik hücre kaybının ve mikroglia aktivasyonunun azalması, pro-inflamatuar mediatörlerin transkripsiyonunda aşağı doğru düzenlenme ve artmış kognitif bozukluğu selimleştirme gibi yararlı etkiler ortaya çıkardığını kanıtlamıştır (141, 190).

Minosiklin tedavisi, APP transgenik farelerde sinir büyüme faktörü, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  nin mikroglial üretimini baskılar (191). Üstelik Choi ve ark.(192) A $\beta$ <sub>1-42</sub> tedavisi ya da APP'nin C fragmanının aktarılmasıyla diferansiye edilen PC-12 nöronal hücrelerinde, sinaptik plastisite ve kaspaz-12 aktivasyonu için gerekli de novo protein sentezinin etkinliğini azaltarak kognitif fonksiyonları tamir edilebilen eIF-2 $\alpha$  fosforilasyonunu (193–195) minosiklinin azalttığını rapor etmişlerdir. p-eIF2 $\alpha$  daki yükseliş ayrıca minosiklin verilen iki hayvan modeliyle de düşürülmüştür; A $\beta$ <sub>1-42</sub> verilmiş sıçanlar ve Tg2576 farelerde minosiklin nöronal ölümü azaltmış, kognitif bozukluğu iyileştirmiş ve hafıza ile öğrenmedeki defisitleri azaltmıştır (192). Benzer olarak, minosiklin tedavisi erken plak öncesi inflammatuar süreçte Alzheimer benzeri bir transgenik sıçan modelinde bilişsel-davranışsal

bozuklukları düzeltmede ve fazla çalışan A $\beta$  ile MHC II, iNOS ve COX-2 gibi proinflatuar markır seviyelerini düşürmüştür (196).

#### 4.4.3.8. Amiyotrofik lateral skleroz

ALS spinal kord, beyin sapı ve motor korteksteki motor nöronların ölümü ile karakterize bir nörodejeneratif bir hastalıktır. ALS'nin patogeneğine bakışta, kaspaz 1-3 ,iNOS, p38 MAPK 1 içeren çeşitli pro-inflatuar sinyallerin yükselmiş aktiviteleri ve yukarı doğru düzenlenmiş ekspresyonları ile ilişkisi göze çarpar (197, 198). Tam da bu yüzden minosiklinin bu hastalığın prognozunda yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Gerçekten de mutant human SOD1-G93A geni eksprese edilmiş fareler minosiklin hastalığın ilerleyişini geciktirmiş, bu farelerde uzamış sağ kalım yaratmıştır. Bu modelde ayrıca in vitro hücre ve hücreden izole edilmiş mitokondride minosiklin sitokrom c'nin geçişini kolaylaştıran mitokondrial geçirgenliği azaltmıştır (199). ALSli farelerde motor nöron dejenerasyonu ve kas kuvveti zayıflamasını geciktirdiği ile artmış yaşam süresi gibi benzer etkiler başkaca çalışmalarda da ortaya konmuştur (200, 201). Ek olarak in vitro çalışmalarda ALS de dahil olmak üzere motor nöron hastalığı olan hastalardan alınan ve kültürlenmiş nöronlara verilen minosiklinin nöronal apoptozu azalmıştır (202). Daha yeni bir primer kortikal nöron kültürü çalışmasında ALS'li hastalardan alınan serebrospinal sıvı ile toksik hale getirilip ALS modeli oluşturulmuş ve minosiklinin bu oluşan toksisiteyi azalttığı ve nöroprotektivite sağladığı gösterilmiştir (203).

Hayvan modellerindeki umut verici çalışmalar sonucu çok merkezli, randomize plasebo kontrollü faz 3 çalışması hemen denenmiş fakat minosiklinin zararlı bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur. ALS hastaları 9 ay boyunca günde 400 mg minosiklinle tedavi edildiklerinde, bu hastalar ALS fonksiyon skalasında plasebo gruba göre manuel kas testi ve vital kapasitede daha hızlı bir düşüş göstermişlerdir. Ayrıca anlamlı olmasa dahi minosiklin grubunda sağkalım oranı biraz daha azdır (204). Bu sonuçlar minosiklin dozunun glutamat reseptör 1 fosforilasyonu ile membran etkinliğini arttırmış

ve glutamat toksisitesiyle nöron kaybına yol açtığını tartışmıştır. Sonuçlar minosiklinin nöronal hücrelerdeki moleküler etkilerine daha derinden bakılması ihtiyacını doğurmaktadır.

#### 4.4.4 Minosiklinin nörorejenerasyona etkisi

Minosiklinin bu geniş ve yer yer çelişkilere sahip nöroprotektif etkilerinin yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalarda nörorejeneratif etkileri de ortaya konmaya başlanmıştır. Ne yazık ki şu ana kadar literatürde yapılmış çalışmaların sayısı epey azdır.

Sinir sisteminde rejenerasyon kapasitesi merkezi ve periferel konumlanışa göre değişiklik göstermektedir. Siyatik sinir hasarını konu alan bir çalışmada minosiklinin inflamasyon (MHC1, THNF- $\alpha$ , MMP9), stres (ATF3, VEGF), büyüme bağlantılı protein (GAP-43) ve apoptotik (Bcl-2, Bax, kaspaz-3) faktörlere etkileri incelenmiştir. GAP-43, MMP9, TNF- $\alpha$ , MHC1 ve VEGF ekspresyon seviyeleri düşerken apoptotik faktörlerin seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir. Bu faktörlerden spinal kord L3-6 seviyesine kadar eksprese edilebilen sadece kontralaterale göre ipsilateralde GAP-43 ve MMP-9 olmuştur. Bu da siyatik sinir hasarına bağlı motor nöronların yeniden yapılanmasında minosiklinin kısmi yardımına işaret etmiştir (205).

Brakial pleksus modeli kullanan Yew ve ark. (206) sıçanlara hasar sonrası 2 hafta intraperitoneal ve intratekal olarak iki gurpta minosiklin tedavisi uygulamışlardır. İntraperitoneal verilen minosiklinin p38 MAPK fosforilasyonunu inhibe ederek ve mikroglial aktiviteyi azaltmak suretiyle motor nöron sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir. Daha önce de bahsedilen mikroglial inaktivasyon fiziksel olarak hasar bölgesini bloklayan bir özellik taşımaktan çıkıp rejenerasyon kolaylaştırır.

Nörorejenerasyon söz konusunda olduğunda hasarlı aksonun tekrar restore olabilmesi için yerine getirmesi gereken önemli şartlardan biri de etraftaki yönlendirici proteinlerden sinyal alıp akson uzamasını fasilete etmesidir. Bu akson uzamasını güçlü bir şekilde inhibe edebilen miyelinden türevlenmiş RGMa'yı (207), MCAO sonrası verilen minosiklin iskemik kortekste anlamlı oranda düşürmüştür. Hatta bu inhibisyon akson uzamasını



fasilite etmiş, 1 hafta içinde kontrol gruplarına göre fark olmasa dahi 2. haftada minosiklinle tedavi edilmiş hasarlı nöronların aksonları kontrollere göre anlamlı düzeyde uzamışlardır (9). Bu çalışmanı yetişkin sıçanlarla yapılmış olması rejeneratif kapasitesinin zayıf olduğu bir dokuda dahi minosiklinin etki edebileceğine de işaret etmektedir.

Karşıt olarak hasarlı arka kök gangliyonlarına verilen minosiklin makrofaj aktivitesini azaltmış ancak aksonal uzamayı ortadan kaldırmış, akson retraksiyonuna yol açmıştır. Öyle ki salın verilen kontrol grubunun akson uzunlukları minosiklin verilen gruba göre oldukça uzun kalmıştır (8). Yine bu bilgiyi destekleyecek şekilde minosiklinin duyu nöron aksonlarına karşı herhangi bir koruyucu etkisinin bulunmadığı ve hatta duyu nöronlarında nörit büyümesini azalttığı da gösterilmiştir (7). Burdan elde edilen sonuçlarla minosiklinin periferik ve merkezi sistemi nöronlarına da farklı moleküler etkileri olabileceği tartışılabilir.

Rejenerasyonun diğer bir yoluysa gen ekspresyonlarını ortaya çıkardığı kök hücre diferansiyasyonlarıdır. Daha önce de bahsedildiği üzere yetişkin beyinde nöronal kök hücreler bulunmaktadır. Bu prekursor hücrelerin kendini yenileme süreçlerinde minosiklinin doğrudan iyileştirici etki yaptığı kanıtlamıştır. Ayrıca bu öncül hücrelerin oligodendrositlerine de diferansiye olmasına yardımcı olur. Gariptir ki bu etkileri mikroglial aktivitenin süpresyonu özelliğinden ve kök hücreleri uyarıcı-diferansiye edici Notch, Wnt ve MAPK gibi yolların sinyalizasyonun da bağımsız görünmektedir. Kök hücre yoğunluğu minosiklin lateral ventriküllerden direkt verildiğinde artmış olarak izlenmiştir (208). Yenidoğan farelerin kullanıldığı diğer bir çalışma da nöronal kök hücrelerin yoğunlukla bulunduğu hipokampüsün subventriküler zonu ve subgranüler zonunda midazolamın oluşturduğu indüklenmiş apoptoz ve baskılanmış nörogeneze minosiklinin yanıtını araştırmıştır. Hasar öncesi verilen minosiklin SVZ ve SGZ'deki hücre proliferasyonunu arttırmış ve uzamsal öğrenme ile hafızayı da güçlendirmiştir (209).

Minosiklinin rejenerasyona etkileri çok çeşitli olabilmekle beraber literatürün moleküler mekanizmaları anlamak adına çok daha yeni olduğu bir yerde durulmaktadır. Bu çeşitli yanıtların altında yatan sebepleri bir araya

getirebilmek için çokça rejenerasyona yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 5-MATERYAL VE METOT

Yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı rejeneratif kapasitesinin daha yüksek olarak görüldüğü yenidoğan farelerin beyinleri kullanılan çalışmamızda yüksek kognitif işlevleri ve hasarlandığında ortaya çıkan kompleks klinikleri sebebiyle korteks bölgesi tercih edilmiştir. Moleküler mekanizmaları daha yakından izleyebilmek adına da in vitro model kullanılmıştır.

Bu bağlamda Balb-C erkek farelerden kortikal nöronların izolasyonu yapıldı. Kültüre edilen kortikal nöronlara minosiklin uygulanarak laser mikrodiseksiyon ile aksotomi yapıldı. Nörorejenerasyon etkisinin ölçülmesi için immunositokimya yapılan hücreler fikse edilip görüntülendi ve rejenerasyon markırlarının analizi tamamlandı.

### 5.1 Kullanılan deney hayvanları

Çalışma için yenidoğan (p0-p1) Balb-C albino erkek fareler kullanıldı. Çalışma için gereken 20 adet Balb-C fareler İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Araştırmaları Merkezi tarafından sağlanmıştır. Çalışmada farelerin kullanımı için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (Etik Kurul Numarası 38828770-604.01.01-E.35856) alındı.

### 5.2 Kullanılan malzemeler

SARF MALZEMELERİ	FİRMA	KATALOG NO.
L-15 Medium (Leibovitz) 500ML	Sigma	L5520
Neurobasal-A Medium 500ML	Life Tech-Gibco	10888022
Hybernat-A Medium 500ML	Life Tech-Gibco	A1247501

DNA I, powder, protein $\geq 80$	Sigma	D4513
B-27® 50X	Life Tech-Gibco	1750444
GlutaMAX™-I 100X	Invitrogen Gibco- Thermofisher	35050061
Papain, toz, 100mg	Sigma	P4762
Poly-L-lysine, toz, 5mg	Sigma	P6282
Paraformaldehit, toz,100g	Sigma	158127
Triton-X-100, 100ml	Sigma	T8787
PBS, 500ml	Thermofisher	10010023
PBS tablet, 100 tablet	Thermofisher	18912014
Phosphate buffered saline	Sigma	P4417
Antibiyotik antimikotik solüsyon, 100x	BioReagent	
Propidyum iyodür solüsyon	Sigma	P4864

**Tablo 5.2** Kullanılan sarf malzeme listesi

### 5.3. Hücrelerin izolasyonundan önceki hazırlıklar ve hücrelerin elde edilmesi

#### 5.3.1 Petrilerin hazırlanması

Kortikal hücrelerin izolasyonundan en az 2 saat önce hücrelerin ekileceği 35mmlik cam tabanlı petriyer Poly-L-Lysine (herbir petri için 75µl PLL+675 µl sterile distile su) ile kaplandı. Poly-L-Lysine'in bu aşamadaki işlevi petri yüzeylerini hidrofilik hale getirmesi ve bu sayede hücrelerin petriye tutunma

yüzdelerini arttırmasıdır. 2 saat oda sıcaklığında bekletilen petripler daha sonra 3'er kez distile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

### **5.3.2 Kültür için kullanılacak besiyerlerinin hazırlanması**

#### **5.3.2.1 Diseksiyon için hazırlanan besiyeri**

Steril ortamda hazırlanan besiyerinin içeriğinde Hybernate-A mediumu kullanıldı, ek olarak %1 Glutamax ve %1 antibiyotik eklendi. Diseksiyon işlemine kadar -20 °C'de bekletildi.

#### **5.3.2.2 Kültür için hazırlanan besiyeri**

Steril ortamda hazırlanan besiyeri 2 mM Glutamax, 100U penisilin, 100mg streptomisin, 250 ng amfoterisin içeren %2 B27'li Neurobasal-A (NBA) medyumundan hazırlanmış ve kullanımına kadar 37 C ve %5 CO2 li ortamda bekletilmiştir.

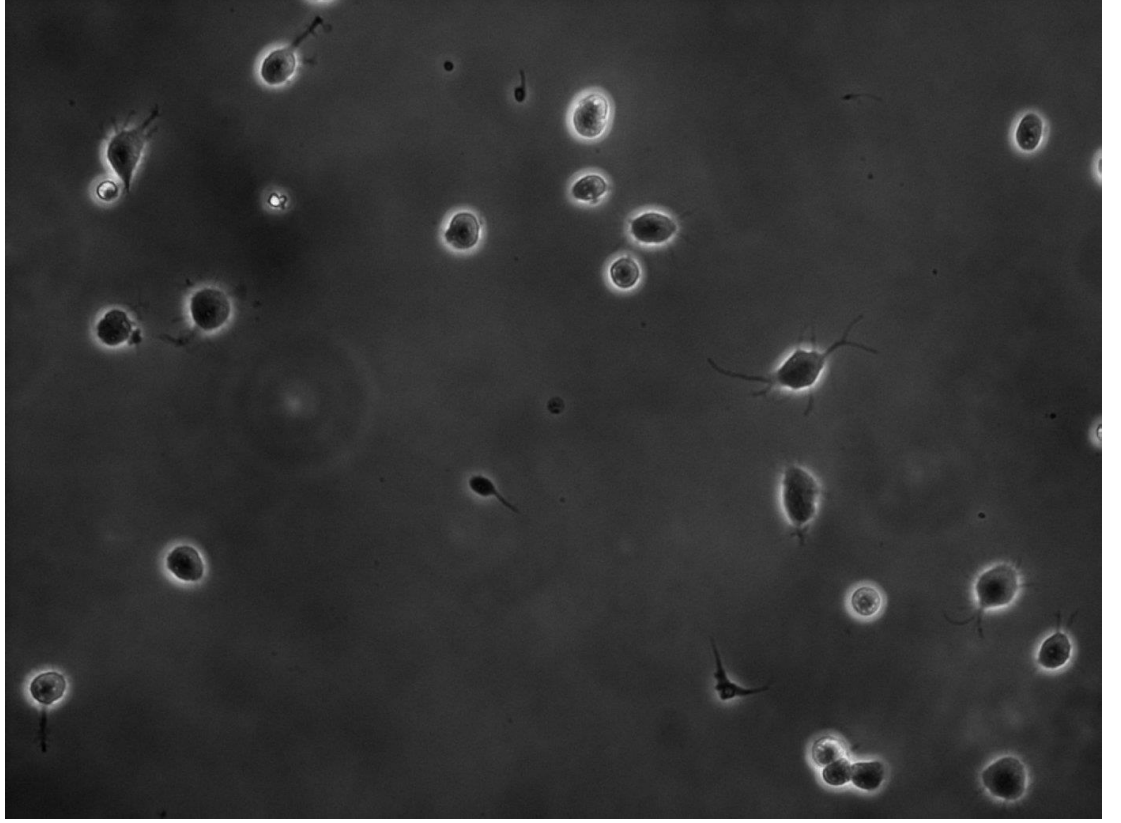
### **5.3.3 Diseksiyon aşaması**

Dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edilen yenidoğan farenin kafası kontaminasyon riskine karşın %70 etanol içeren alkol solüsyonu ile dezenfekte edilir. Hızlıca soğuk Hybernate-A'lı diseksiyon medyumunu bulunan petriye aktarılır. Mikrocerrahi için kullanılan stereo mikroskop altına alınan petri içindeki kafanın önce derisi orta hattan iki yana açılır, daha sonra retinal makas ile kafatası orta hattan düzgünce ikiye kesilir, yana alınır. Açılan kafatasının içinden beyin dokusu ortaya çıkartılır. Serebellum ve bulbus olfaktoriuslar serebrumdan enine kesiler ile uzaklaştırılır. Korteks tabakası nazikçe ve sırasıyla kaldırılarak alınır, ince uçlu forseps yardımıyla korteks üzerindeki meninks tabakası dokuya zarar vermeden sıyrılarak alınır. Kan damarsız ve fibröz dokusuz temiz korteks tabakası elde edilir.

#### 5.3.4 Kùltür Protokolü

Elde edilen kortikal doku içerisinde Papain ve DNase enzimlerini içeren 2 mM Glutamax, 100U penisilin, 100mg streptomisin, 250 ng amfoterisin içeren %2 B27'li Leibovitz's (L15) medyumlu tûpün içine aktarılır. Dokular medyum içerisinde +4C de 45 dakika inkûbe edilir. İnkûbasyon tamamlandıktan sonra çapı 2mm'den başlayan ve sürekli incelen pipet uçları ile tritürasyon yapıldıktan sonra Pasteur pipetten de geçirilerek mekanik parçalanması gerçekleştirilir. 800 RPM'de 3 dk santrifûje edilen doku sıvısının içinden supernatant uzaklaştırılır. Kalan kısma 2 mM Glutamax, 100U penisilin, 100mg streptomisin, 250 ng amfoterisin içeren %2 B27'li L15 medyum eklenir ve ikinci kez 800 RPM'de 3 dk santrifûj edilir. Santrifûj sonunda tekrar supernatant uzaklaştırılır ve 2 mM Glutamax, 100U penisilin, 100mg streptomisin, 250 ng amfoterisin içeren %2 B27'li NBA medyum ilave edilir.

Bu işlemden sonra hücreler sayılır ve PLL ile kaplanmış cam tabanlı 35 mm çaplı petrilere eşit şekilde ekilir. Nöronların petriye tutunabilmeleri için 2 saat boyunca 37 C ve %5 CO<sub>2</sub> li inkûbatörde nöronlar dinlendirilir. Hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra NBA'li medyum koyularak besiyerleri tamamlanmış bir biçimde 37 C ve %5 CO<sub>2</sub> li inkûbatöre bırakılır (Resim 5.3.4).



**Resim 5.3.4** 1 saatlik kortikal nöron kültürü

#### **5.4. Hazırlanan kültüre minosiklin uygulanması ve lazer mikrodiseksiyon ile aksotomi işlemi**

##### **5.4.1 Minosiklin uygulaması**

Primer kortikal nöron kültürü yapıldıktan 24 saat sonra petriyeler 4 farklı gruba ayrıldı. İlk grup petriye 1  $\mu\text{M}$ , ikinci grup petriye 10  $\mu\text{M}$ , üçüncü grup petriye 100  $\mu\text{M}$  minosiklin aksotomiden 15 dakika önce eklendi, dördüncü grup ise kontrol grubu olarak seçildi ve minosiklin eklenmedi.

#### 5.4.2 Lazer mikrodiseksiyon ile aksotomi işlemi

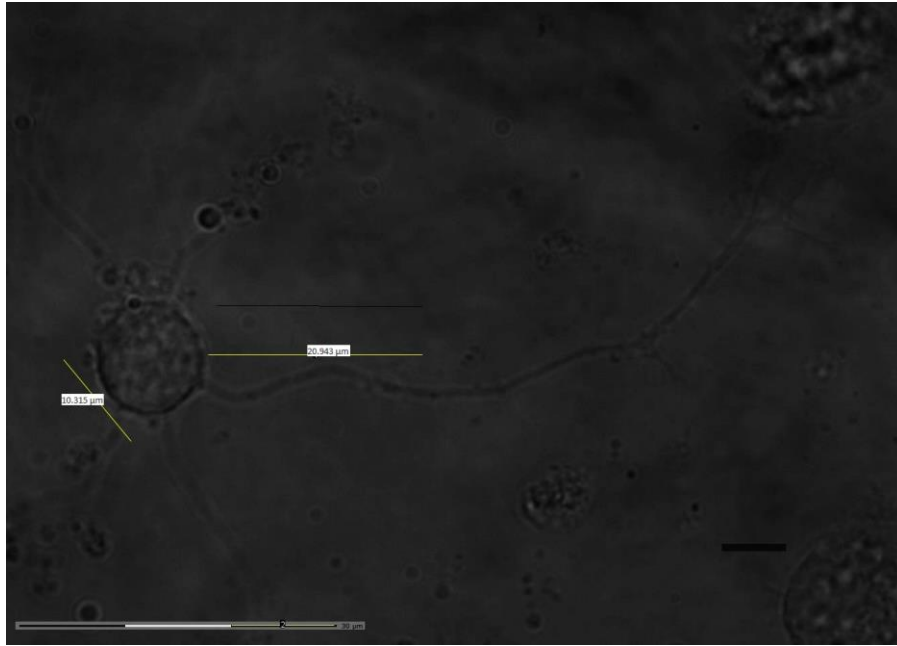
Maddeler eklendikten 15 dakika sonra PALM Combisystem (MicroDissection and MicroTweezers System) kullanılarak lazer aksotomi işlemi yapıldı. Bu sistem 337 nanometrede çalışan ve her biri 3 nanosaniye süren yaklaşık 300 IJ enerjisi serbest bırakan, saniyede 1-30 darbe üreten bir ultraviyole lazer ünitesi ve invert mikroskoptan oluşan lazer mikrodiseksiyon sistemine sahiptir (Resim 5.4.2).



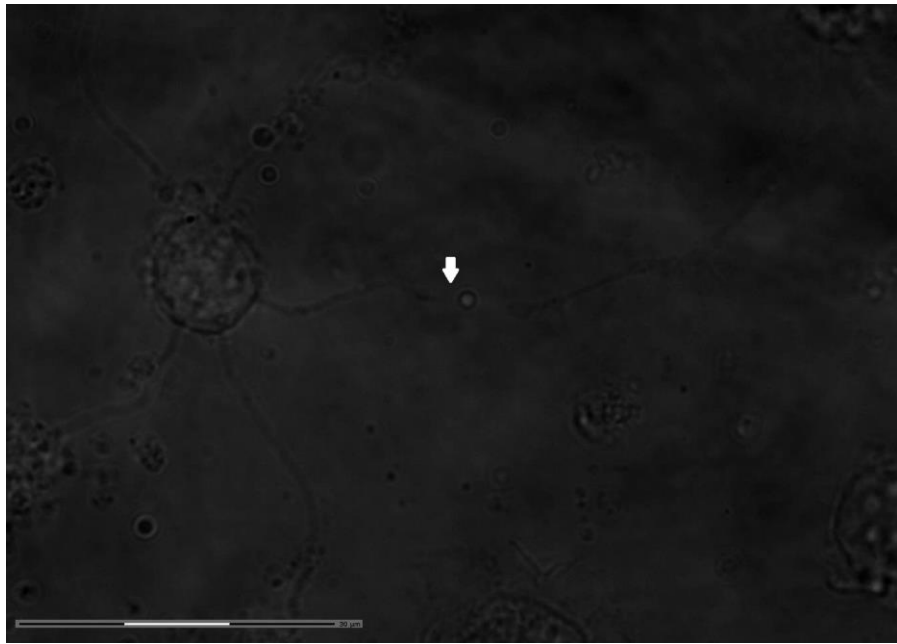
**Resim 5.4.2-1** PALM Combisystem

Lazer transeksiyonlarında 100X yağlı faz kontrast objektif kullanıldı. Aksonlar; lazer ışını, mikroskop ve bağlı CCD kamera kontrolleri bulunan özel yazılım olan PALM Robo yazılımı ile bilgisayara aktarılan dijital görüntüler üzerinde belirlenen soma çapının iki katı mesafede işaretlenen yerlerden kesildi. Verilen lazer her bir transeksiyon için yaklaşık %1'lik bir süre boyunca %65'lik bir yoğunlukta ve 21'lik odak uzaklığında uygulandı (Resim 5.4.2-2 ve Resim 5.4.2-3) (12).





**Resim 5.4.2-2** Aksotomi öncesi nöron (100x büyütme)



**Resim 5.4.2-3** Aksotomi sonrası nöron (100x büyütme)

### **5.5 Propidyum iyodür uygulaması**

Aksotomi protokolü uygulandıktan 24 saat sonra membran bütünlüğü bozulmuş, canlılığını yitirmiş hücrelerin tespiti için propidyum iyodür boyaması yapılmıştır. Propidyum iyodür membran yıkımı olan hücreleri floresan mikroskobunda kırmızıya boyamış görülürken, sağlıklı nöronlar boyanmadan kalır.

Propidyum iyodür boyama 1,5 µl solüsyonu her bir petri için ekleyerek gerçekleştirilmiş ve 10 dakika inkübasyon süresinden sonra hücreler floresan mikroskobuyla görüntülenebilir hale getirilmiştir.

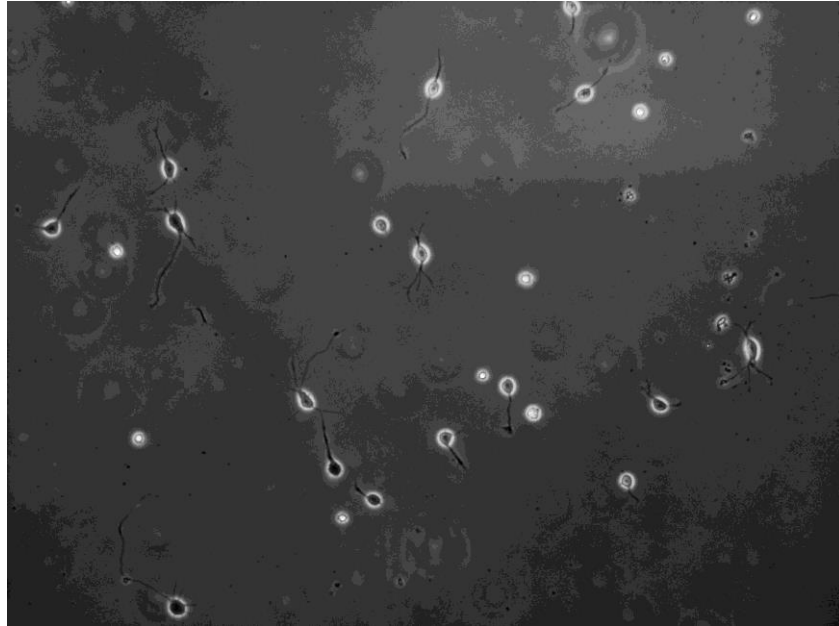


## 6-BULGULAR

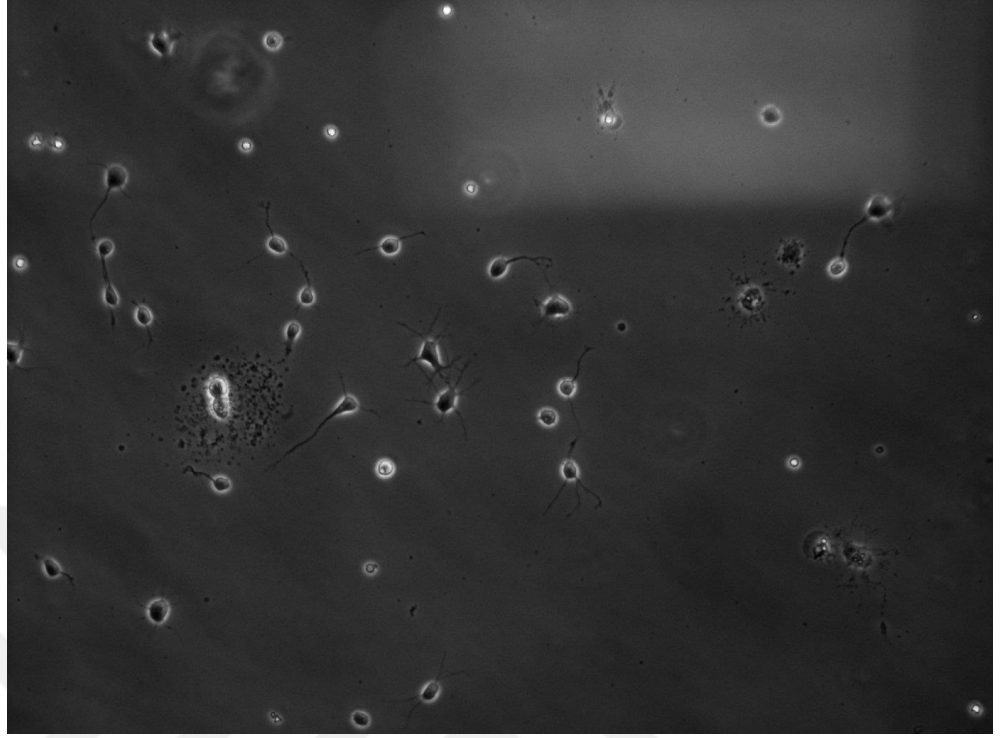
Yenidoğan Balb-C farelerden izole edilen kortikal nöronlara 1, 10 ve 100  $\mu\text{M}$  minosiklin uygulaması ardından lazer aksotomi uygulaması yapıldı. Sonrasında yapılan analizler ve kontrol gruplarıyla karşılaştırmalar yapılarak nörojenerasyona minosiklinin etkisi araştırıldı.

Korteks diseksiyonu ve ardından pimer nöron kültürü protokolleri tamamlandıktan sonra hücreler 5 farklı gruba ayrıldı. Daha önce yapılan çalışmalardan edinilen bilgilerle birinci gruba 1  $\mu\text{M}$ , ikinci gruba 10  $\mu\text{M}$  ve üçüncü gruba ise 100  $\mu\text{M}$  37°C PBS de çözdürülen minosiklin solüsyonları primer kortikal nöron kültürünün yapılmasından 23 saat 45 dakika sonra nöronların besiyerine eklendi. 4. gruba minosiklin uygulanmadan kontrol grup olarak aksotomi uygulaması yapıldı. 5. gruba ise herhangi bir işlem yapılmadı, sağlıklı kontrol grup olarak kullanıldı.

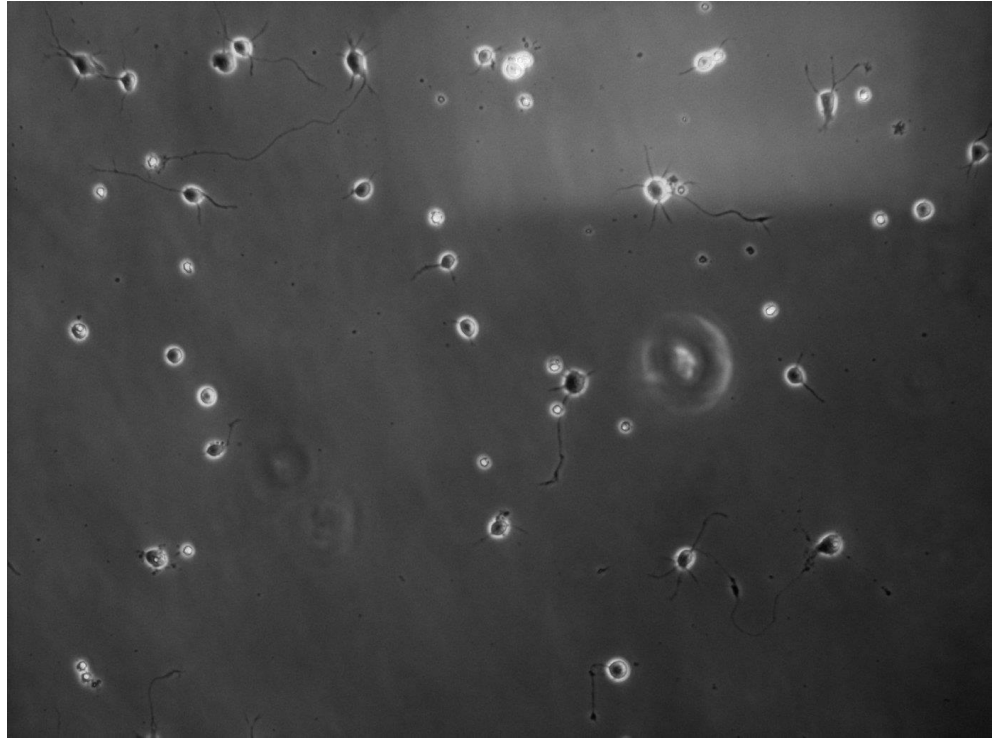
Gruplara minosiklin eklenmesinden 15 dk sonra, kontrol gruplarına ise hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra lazer mikrodiseksiyon mikroskobu ile aksotomi yapıldı. Ekimden 24 saat sonra nöronlar kesilebilecek miktarlarda nörit uzattılar.



**Resim 6-1** 1 $\mu$ M minosiklin eklenmiş kortikal nöron kültürü

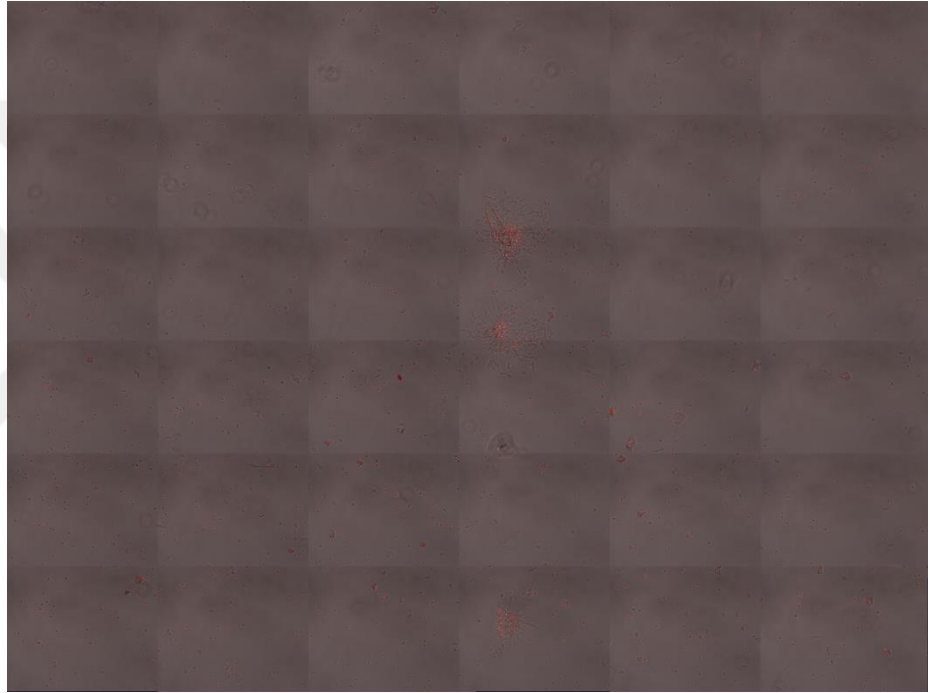


**Resim 6-2** 10 $\mu$ M minosiklin eklenmiş kortikal nöron kültürü

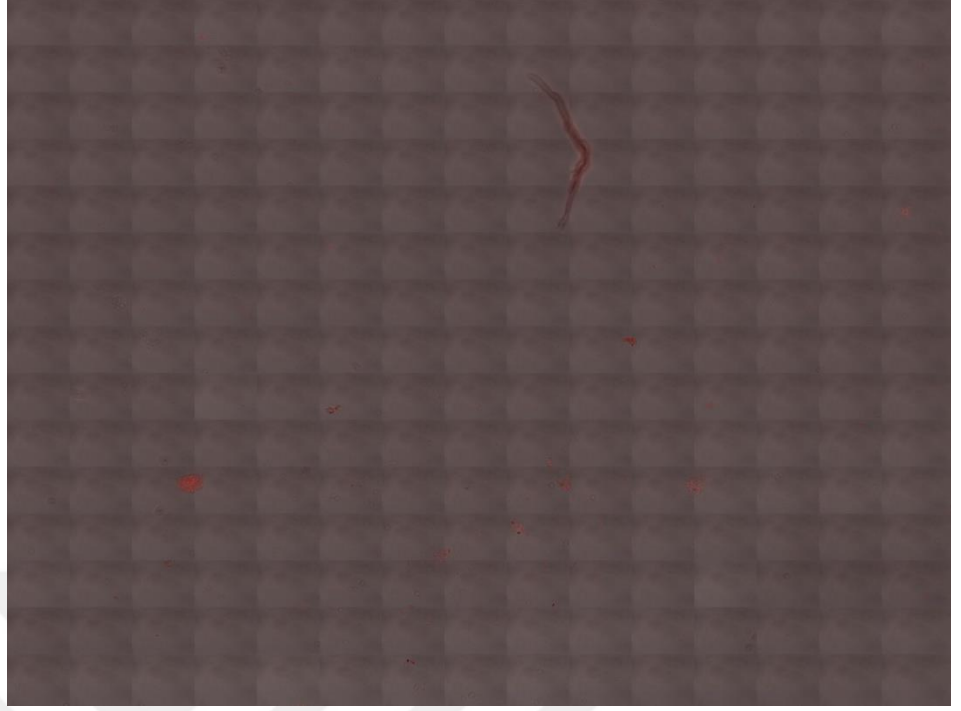


**Resim 6-3** 100 $\mu$ M minosiklin eklenmiş kortikal nöron kültürü

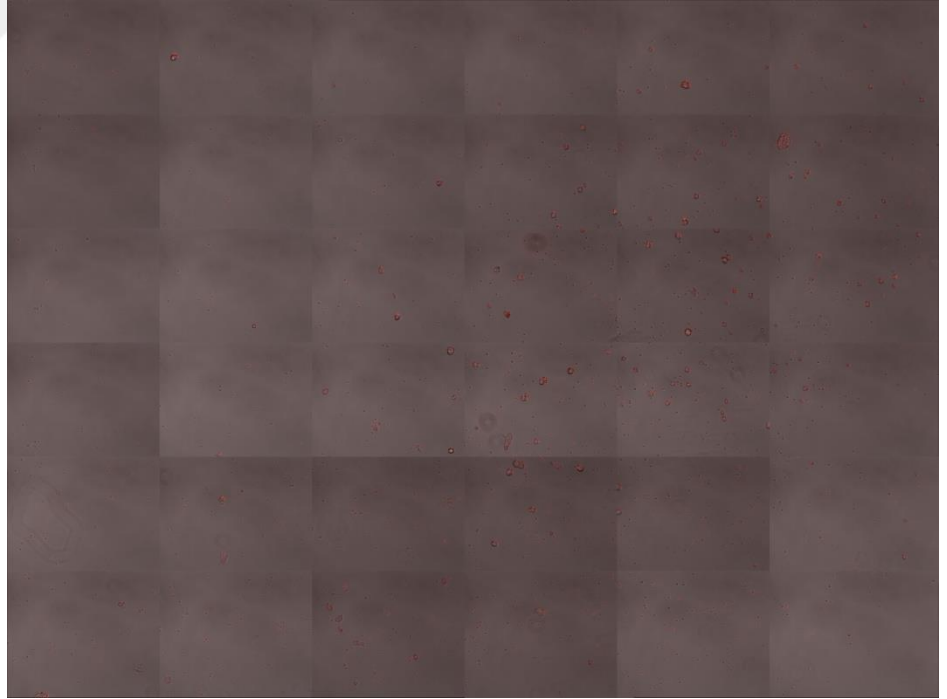
Nöronların hayatta kalımlarını tespit etmek üzere aksotomiden 24 saat sonra uygulanan propidyum iyodür vasıtasıyla önce floresan görüntüleme yapıldı (Resim.6-4, Resim.6-5, Resim.6-6). Aksotomi yapılan nöronlar 24 saat önceki görüntülerindeki koordinatları ile bulunarak canlılık sayımı yapıldı (Resim.6-7, Resim.6-8, Resim.6-9).



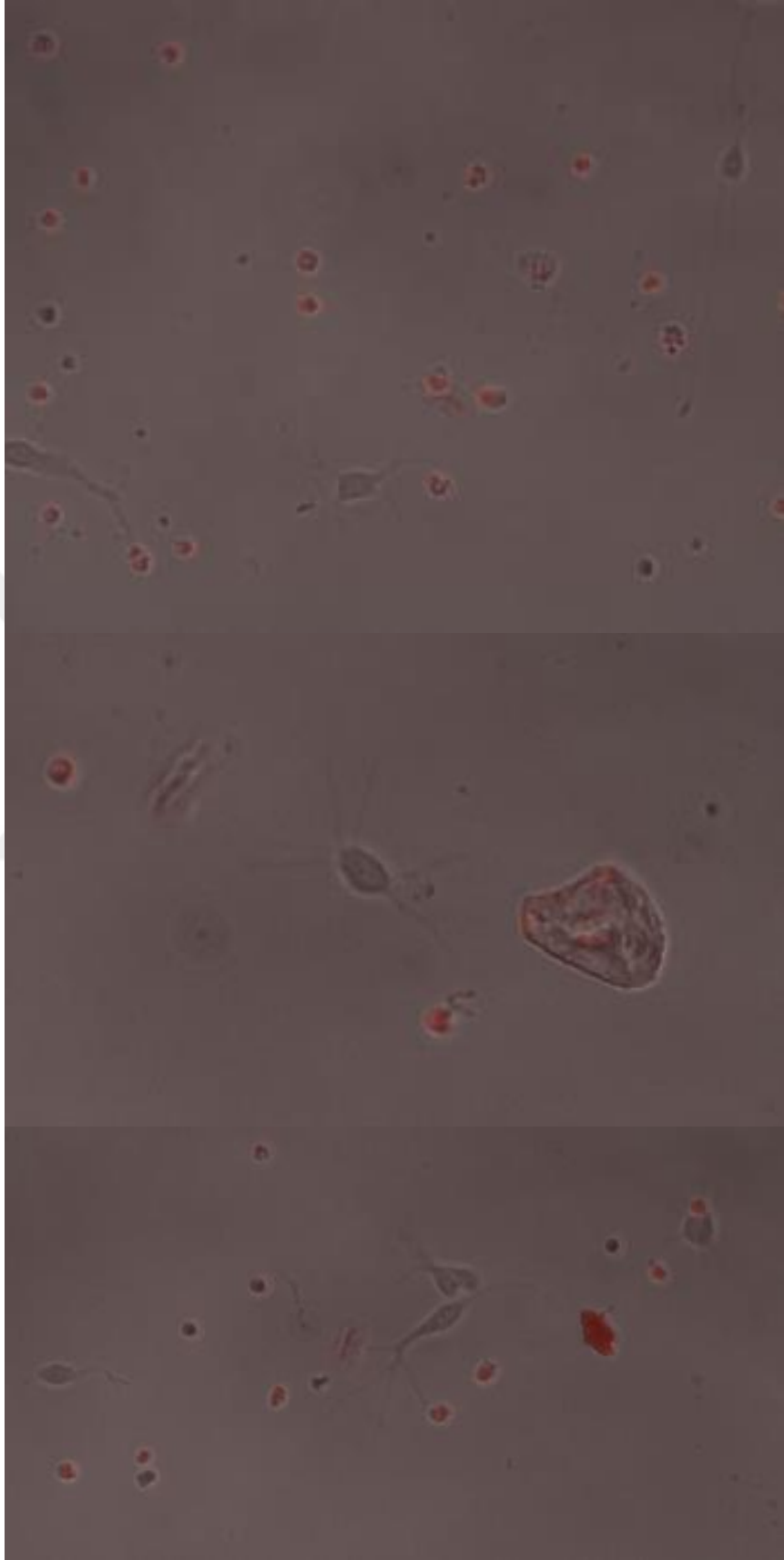
**Resim.6-4** 1  $\mu$ M minosiklin içeren petrinin PI floresan görüntüsü



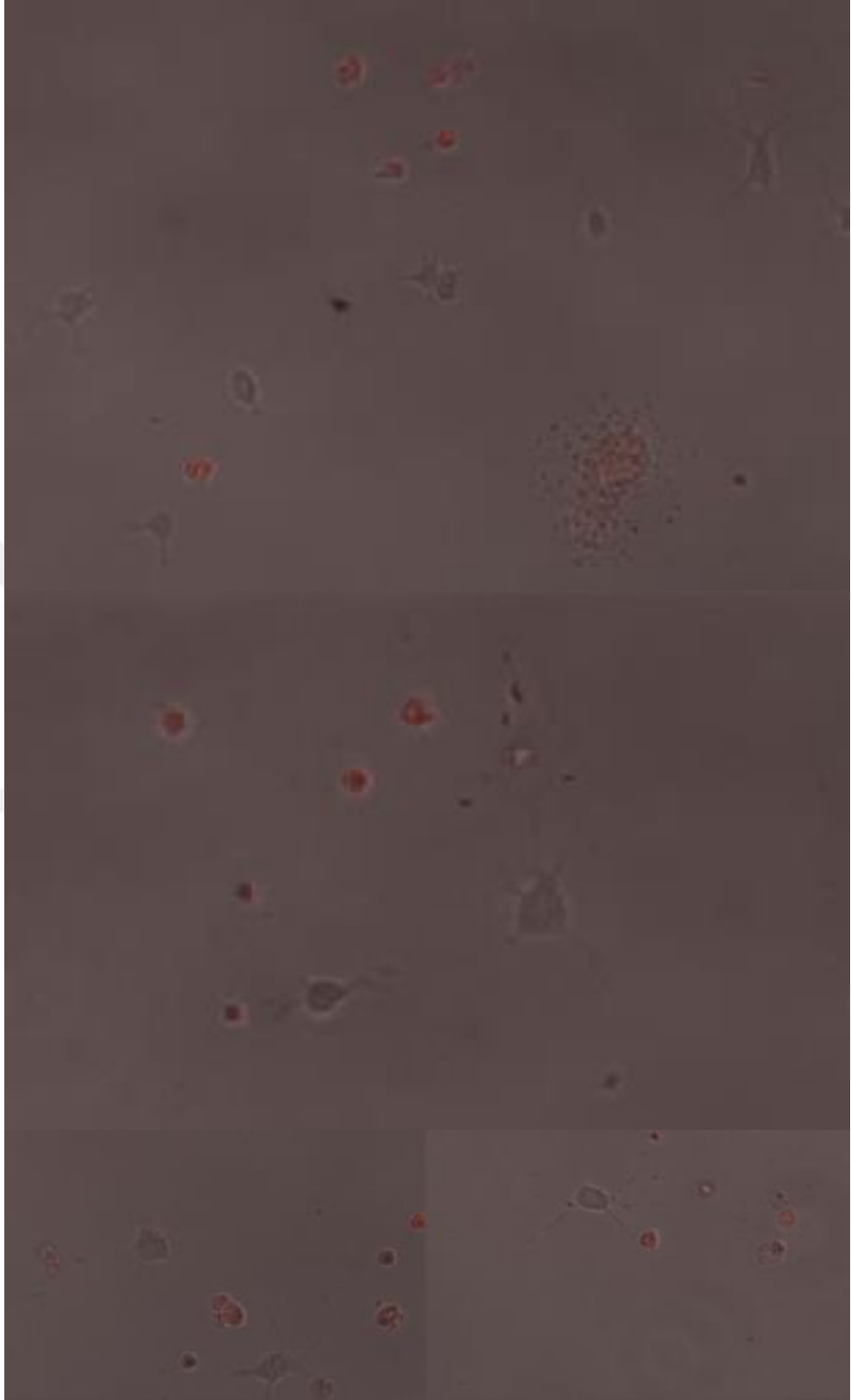
**Resim.6-5** 10 µM minosiklin içeren petrinin PI floresan görüntüsü



**Resim.6-6** 100 µM minosiklin içeren petrinin PI floresan görüntüsü



**Resim.6-7** 1  $\mu$ M minosiklin uygulanmış nöronlar için aksotomi sonrası canlılık



**Resim 6-8** 10  $\mu$ M minosiklin uygulanmış nöronlar için aksotomi sonrası canlılık



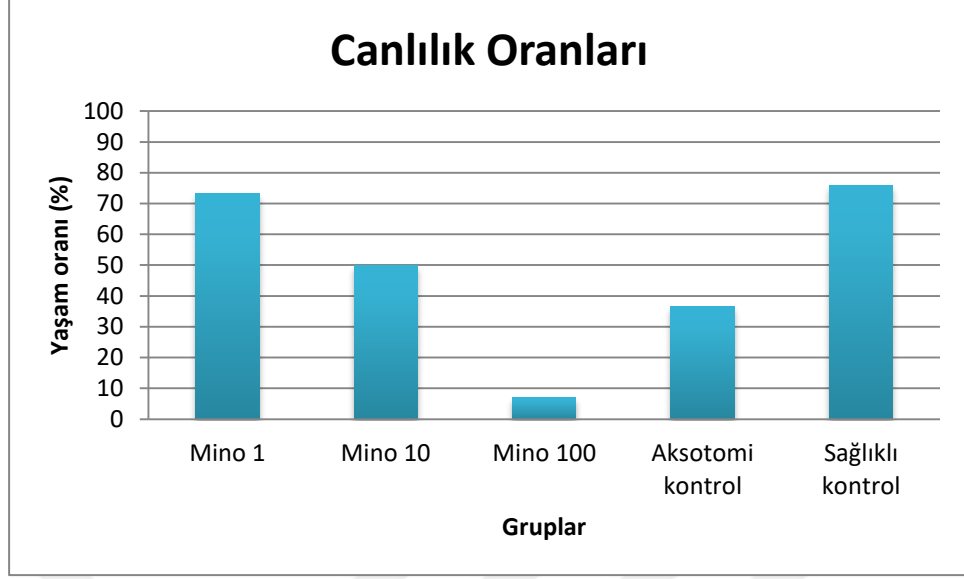


**Resim 6-9** 100  $\mu\text{M}$  minosiklin uygulanmış nöronlar için aksotomi sonrası canlılık

Ardından minosiklin uygulanan, aksotomi kontrol ve sağlıklı kontrol petrilerinin canlılık oranları yüzdelik hesapla tespit edildi (Tablo.6). Yapılan sayımda sağlıklı kontrol için sayılan 58 nöronun 14'ü ölü olarak görülmüş ve %75,86 canlılık oranı saptanmıştır. Aksotomi yapılan kontrol petrisinde ise 30 nöronun 19'u ölü olarak saptanmış ve %36,6 canlılık oranı tespit edilmiştir. Aksotomi sonrası 1  $\mu$ M minosiklin eklenen petride 30 nöronun 8 nöron ölü olarak işaretlenmiş ve canlılık oranı hasara karşılık %73,3 olarak bulunmuştur. 10  $\mu$ M minosiklin eklenen petride ise 30 nöronun 15'i ölü olarak gözlenmiş ve %50 canlılık oranı saptanmıştır. 100  $\mu$ M minosiklin uygulanan petri hasardan sonra 28 nöronun yalnız 2 nöron için canlı işaretlenmiş ve canlılık oranı %7,14'te kalmıştır.

	<b>Canlı Hücre Sayısı</b>	<b>Ölü Hücre Sayısı</b>	<b>Yaşam Oranı</b>	<b>Toplam Hücre Sayısı</b>
<b>1<math>\mu</math>M minosiklin</b>	22	8	73,333	30
<b>10<math>\mu</math>M minosiklin</b>	15	15	50	30
<b>100<math>\mu</math>M minosiklin</b>	2	26	7,142	28
<b>Aksotomi Kontrol</b>	11	19	36,666	30
<b>Sağlıklı Kontrol</b>	44	14	75,862	58

**Tablo.6** Gruplar arası canlılık verileri



Şekil.6 Gruplar arası canlılık oranları

## 7-TARTIŞMA

Minosiklin nöroprotektif etkisi hastalık modelinde gösterilmiş bir semisentetik, kan beyin bariyerini aşabilen tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir. (83)

Minosiklinin merkezi sinir sistemine kolayca sızabilen yapısının anlaşılmasından sonra araştırmacılar iskemik inme, intraserebral hemoraji, spinal kord yaralanması, travmatik beyin hasarı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve Amiyotrofik lateral skleroz gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde minosiklinin etkilerini araştırmışlardır. Adı geçen klinik durumların hemen hepsinde gözlenen en büyük ortak özelliklerden biri aksonal dejenerasyondur. Aksonal dejenerasyon nöronlarda görülebilen en tipik yıkım şeklidir. Hücrenin aksonal hasardan sonraki rejenerasyona atacağı ilk adım bu dejenerasyon modelinden sonra göstereceği hayatta kalım mekanizmalarını devreye sokmak olacaktır. Bu bağlamda çalışmaya lazer aksotomi modeli konu edilmiştir.

Lazer aksotomi modeli kullanarak yapılan bu çalışmada, daha önce farklı *in vitro* nöron kültürü deneylerinde de kullanılan (4, 72, 210, 104, 109, 135, 148, 170, 192, 203, 206) 1, 10 ve 100  $\mu\text{M}$  minosiklin dozajları kullanılmıştır.

Elde edilen veriler sonucunda aksotomi sonrası 1  $\mu\text{M}$  minosiklin uygulanan petrillerdeki kortikal nöronların %73,3'nün sağ kalımı görülmüştür. Aksotomi sonrası hayatta kalımı neredeyse iki kat arttırmıştır. Wilkins ve ark. yaptığı NO indüklü E16 kortikal nöron hasar modelinde 1  $\mu\text{M}$  minosiklin eklenen petrilere %50 oranında sağ kalım gözlenmiştir (210). Diğer bir yandan da Parkinson modeliyle çalışılan bir striatum nöron kültüründe düşük doz minosiklinin yaşam oranını arttırdığı ortaya konmuş, 0,01  $\mu\text{M}$  minosiklin eklenen hücreler %94,4 hayatta kalım gösterirken 1  $\mu\text{M}$  minosiklin kullanılan nöronlarda ise %88,2 sağkalım izlenmiştir (109). Başka bir kimyasal Parkinson modeli üzerinden *in vitro* çalışan Radad ve ark. da rotenonla indüklenmiş nöronlara 1  $\mu\text{M}$  minosiklin eklediklerinde hücrelerin %17 daha fazla yaşadıklarını görmüşlerdir (170). Wu ve ark. intraserebral hemoraji modelinde mikrogliya kültürüne uyguladıkları 1  $\mu\text{M}$  minosiklin ise TNF- $\alpha$ ' yı %90

oranında düşürürken ve IL-1 $\beta$ 'y'ı ise %70 azaltmıştır (72). Primer motor korteks nöron kültürünü beyin omurilik sıvısı ile toksikleştirmiş bir ALS modelinde 1  $\mu$ M minosiklin %30'a kadar nöroprotektivite sağlayabilmiştir (203). Kısaca, çalışmada kullanılan düşük doz minosiklinin literatürle uyumlu bir biçimde aksotomiden sonra sağkalımı neredeyse sağlıklı kontrol kadar arttırdığı ortaya konmuştur.

Çalışma için denenen bir diğer doz olan 10  $\mu$ M minosiklinin aksotomi sonrası %50 sağkalım sağladığı gözlenmiştir. Aynı dozu kullanan dopaminerjik nöron kültürü Parkinson modelinde %13'e varan sağkalım artışı görülmüştür (170). Du ve ark. dopaminerjik nöron kültürüne uyguladıkları 10  $\mu$ M minosiklinin tedavisinin MPP+ indüklü hasarın yarattığı %40'a varan nöron ölümünün neredeyse tamamını glial ortamda ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (4). A $\beta$ <sub>1-42</sub> ile oluşturulan bir Alzheimer modeli in vitro çalışmasında da hipokampal nöronların 10  $\mu$ M minosiklinle tedavisinde nöronal hayatta kalımı anlamlı şekilde arttırdığı görülmüştür (192). Pinkernelle'in 2013 yılında yaptığı bir spinal kord yenidoğan motor nöron kültüründe kullandığı 10  $\mu$ M minosiklinin 1. günde anlamlı derecede sağkalımı arttırdığı ortaya konmuştur ancak bu etkisi 4. güne kadar devam etmemiştir (148). Bu da akut dönemdeki etkinliğini düşündürebilir. Literatürle beraber ele alındığında 10  $\mu$ M minosiklinin, çok düşük doz uygulanan minosiklin etkisine nazaran daha az efektif görünmekle beraber lazer aksotomi yardımıyla oluşturulan nörodejeneratif modelde de nöronal sağkalımda azımsanmayacak kadar etkili olduğu görülmektedir.

Bu çalışma içerisinde kullanılan yüksek doz olan 100  $\mu$ M minosiklin daha önceki çalışmalarda toksik olarak nitelendirilmiştir (109, 148, 206). Matsukawa'nın yapmış olduğu sıçan striatumu kültüründe 100  $\mu$ M minosiklinin sağkalımı %10,5'e kadar düşürdüğü saptanmıştır. Yine Pinkernelle'in spinal kord modelinde 100  $\mu$ M olarak uygulanan minosiklinin mikrogial aktiviteyi erken dönemden başlayarak uzun süreli inhibe ettiği, migrasyonu önlediği ve hücresel sağkalımı azalttığı kanıtlanmıştır (148). Spinal kök avülsiyonu içeren brakial pleksus kültürü kullanılarak hazırlanan dejeneratif modellen bir çalışmada bile 10  $\mu$ M minosiklin hücre hayatta kalımını

korurken, 100  $\mu\text{M}$  minosiklinin nöron ve astrosit ölümüne yol açtığı ve rejeneratif süreçlerin önünü tıkadığını ortaya koymuştur (206). Bu çalışmalara paralel olarak aksotomi sonrası 100  $\mu\text{M}$  minosiklin uygulanan nöronların ancak %7,14 hayatta kalabilmiştir. Yüksek doz kullanılan minosiklinin toksik etkisi olduğu bu çalışmada da gösterilmiştir.

Rejenerasyonun ilk basamağı sayılacak hasar sonrası canlılık, minosiklinin bu etkisinin kortikal yenidoğan nöronlarda lazer aksotomi modeliyle kullanıldığı bu çalışma alanında ilk olmasıyla özgün olmasının yanı sıra düşük dozlarda (1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$ ) verilen minosiklinin literatürle uyumlu olarak canlılığı hasardan sonra sağladığı ve yüksek dozunun (100  $\mu\text{M}$ ) ise nörotoksik olduğunu ortaya koymuştur.

Elde edilen bu veriler ışığında minosiklin kortikal nöronlarda oluşan akson dejenerasyonuna karşı hücresel canlılıkta düşük dozlarda nöroprotektif olduğunu bu modelde de kanıtlamış olup rejeneratif basamaklar için umut verici bir ajan olarak değerlendirilmiştir.

## 8-SONUÇ

Sonuçlar minosiklinin, aksotomi sonrası yenidoğan kortikal hücre kültürüne uygulandığında özellikle çok düşük dozlarının (1  $\mu$ M) nöronal sağkalımı neredeyse sağlıklı kontroller oranında (sağlıklı kontrol %75,86, 1 $\mu$ M minosiklin %73,3) sağladığı ve rejeneratif süreçlere iyi bir zemin sağladığı söylenebilmekle beraber, yüksek doz minosiklinin (100  $\mu$ M) kortikal nöronlara nörotoksik olduğu (%7,14 sağkalım) ve rejenerasyon yolunu tıkadığı görülmüştür.



## 9- KAYNAKLAR

- 1 Macdonald H, Kelly RG, Allen ES, Noble JF, Kanegis LA. Pharmacokinetic Studies On Minocycline In Man. *Clin Pharmacol Ther.* (14); 852–61.
- 2 Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J, Cattaneo E, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. Tetracyclines Inhibit Microglial Activation And Are Neuroprotective In Global Brain Ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (95); 15769–74, 1998.
- 3 Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The Promise Of Minocycline In Neurology. *Lancet Neurol.* (3); 744–751, 2004.
- 4 Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DLG, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. Minocycline Prevents Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration In The MPTP Model Of Parkinson’s Disease.
- 5 Gullo F, Amadeo A, Donvito G, Lecchi M, Costa B, Constanti A, Wanke E. Atypical “Seizure-Like” Activity In Cortical Reverberating Networks In Vitro Can Be Caused By LPS-Induced Inflammation: A Multi-Electrode Array Study From A Hundred Neurons. *Front Cell Neurosci.* (8); 361, 2014.
- 6 Tian Y, Wu X, Guo S, Ma L, Huang W, Zhao X. Minocycline Attenuates Sevoflurane-Induced Cell Injury Via Activation Of Nrf2. *Int J Mol Med.* (39); 869–878, 2017.
- 7 Ali S, Driscoll HE, Newton VL, Gardiner NJ. Matrix Metalloproteinase-2 Is Downregulated In Sciatic Nerve By Streptozotocin Induced Diabetes And/Or Treatment With Minocycline: Implications For Nerve Regeneration. *Exp Neurol.* (261); 654–665, 2014.
- 8 Kwon MJ, Kim J, Shin H, Jeong SR, Kang YM, Choi JY, Hwang DH, Kim BG. Contribution Of Macrophages To Enhanced Regenerative Capacity Of Dorsal Root Ganglia Sensory Neurons By Conditioning Injury. *J Neurosci.* (33); 15095–15108, 2013.
- 9 Tao T, Xu G, Si Chen C, Feng J, Kong Y, Qin X. Minocycline Promotes Axonal Regeneration Through Suppression Of RGMa In Rat MCAO/Reperfusion Model. *Synapse.* (67); 189–198, 2013.



- 10 Tanaka T, Murakami K, Bando Y, Nomura T, Isonishi A, Morita-Takemura S, Tatsumi K, Wanaka A, Yoshida S. Microglia Support ATF3-Positive Neurons Following Hypoglossal Nerve Axotomy. *Neurochem Int.*, 2017.
- 11 Hilgenberg LGW, Smith MA. Preparation Of Dissociated Mouse Cortical Neuron Cultures. *J Vis Exp.*562, 2007.
- 12 Öztürk G, Cengiz N, Erdoğan E, Him A, Oğuz EK, Yenidünya E, Aysıt N. Two Distinct Types Of Dying Back Axonal Degeneration In Vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (39); 362–376, 2013.
- 13 Kandel ER. Principles of neural science. Fifth Edit. McGraw-Hill Medical, 2013.
- 14 By John E. Hall, PhD ACG. Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology. 13.th Edit. ELSEVIER, 2015.
- 15 Götz J. Tau And Transgenic Animal Models. *Brain Res Rev.* (35); 266–286, 2001.
- 16 Ramón y Cajal S, Sánchez-Prieto R, Anaya A. A Genetic Model For Undifferentiated Cell Tumor Formation: Similar Tumors Formed By Different Cell Lines Transformed By The E1A Oncogene. *Histol Histopathol.* (10); 811–20, 1995.
- 17 Cerebral Cortex: Comparative Structure And Evolution Of Cerebral Cortex - Google Kitaplar. Available from: <https://books.google.com.tr/books?id=uaIACAAAQBAJ&pg=PA43&lpg=PA43&dq=peter+and+jones+1984+brain+akademik&source=bl&ots=8fxxJhhW0R&sig=tu3BiH1QPn8iuOxbjJAQb9WP-AE&hl=tr&sa=X&ved=0ahUKEwj8geud4NzbAhWzx6YKHTcRDF4Q6AEIRTAf#v=onepage&q=peter and jones 1> [last accessed June 18, 2018].
- 18 Finlay BL, Darlington RB. Linked Regularities In The Development And Evolution Of Mammalian Brains. *Science.* (268); 1578–84, 1995.
- 19 Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation In Neurodegeneration. *Cell.* (140); 918–34, 2010.
- 20 Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-Cell Autonomous Toxicity In Neurodegenerative Disorders: ALS And Beyond. *J Cell Biol.* (187); 761–72,

- 2009.
- 21 Zlokovic B V., Deane R, Sallstrom J, Chow N, Miano JM. Neurovascular Pathways And Alzheimer Amyloid  $\beta$ -Peptide. *Brain Pathol.* (15); 78–83, 2006.
  - 22 Iadecola C. Neurovascular Regulation In The Normal Brain And In Alzheimer’s Disease. *Nat Rev Neurosci.* (5); 347–360, 2004.
  - 23 Hao Y, Collins C. Intrinsic Mechanisms For Axon Regeneration: Insights From Injured Axons In *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev.* (44); 84–91, 2017.
  - 24 Gitler D, Spira ME. Real Time Imaging Of Calcium-Induced Localized Proteolytic Activity After Axotomy And Its Relation To Growth Cone Formation. *Neuron.* (20); 1123–1135, 1998.
  - 25 Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, Hoopfer E, Mitchison T, Luo L, He Z. Involvement Of The Ubiquitin-Proteasome System In The Early Stages Of Wallerian Degeneration. *Neuron.* (39); 217–225, 2003.
  - 26 Drerup CM, Nechiporuk A V. JNK-Interacting Protein 3 Mediates The Retrograde Transport Of Activated C-Jun N-Terminal Kinase And Lysosomes. *PLoS Genet.* (9); e1003303, 2013.
  - 27 Shin JE, Cho Y, Beirowski B, Milbrandt J, Cavalli V, DiAntonio A. Dual Leucine Zipper Kinase Is Required For Retrograde Injury Signaling And Axonal Regeneration. *Neuron.* (74); 1015–1022, 2012.
  - 28 Ahmad FJ, Hughey J, Wittmann T, Hyman A, Greaser M, Baas PW. Motor Proteins Regulate Force Interactions Between Microtubules And Microfilaments In The Axon. *Nat Cell Biol.* (2); 276–280, 2000.
  - 29 Luo L, O’Leary DDM. AXON RETRACTION AND DEGENERATION IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu Rev Neurosci.* (28); 127–156, 2005.
  - 30 Block ML, Hong J-S. Microglia And Inflammation-Mediated Neurodegeneration: Multiple Triggers With A Common Mechanism. *Prog Neurobiol.* (76); 77–98, 2005.
  - 31 Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune Activation In Brain Aging And Neurodegeneration: Too Much Or Too Little? *Neuron.* (64); 110–122, 2009.
  - 32 Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, Wiig

- H, Alitalo K. A Dural Lymphatic Vascular System That Drains Brain Interstitial Fluid And Macromolecules. *J Exp Med.* (212); 991–9, 2015.
- 33 Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, Strong R, Narayana P, Hill-Felberg SJ, Aronowski J. Cell Death In Experimental Intracerebral Hemorrhage: The "Black Hole" Model Of Hemorrhagic Damage. *Ann Neurol.* (51); 517–524, 2002.
- 34 Qureshi AI, Suri MFK, Ostrow PT, Kim SH, Ali Z, Shatla AA, Guterman LR, Hopkins LN. Apoptosis As A Form Of Cell Death In Intracerebral Hemorrhage. *Neurosurgery.* (52); 1041–1048, 2003.
- 35 Ising C, Heneka MT. Functional And Structural Damage Of Neurons By Innate Immune Mechanisms During Neurodegeneration. *Cell Death Dis.* (9); 120, 2018.
- 36 Circu ML, Aw TY. Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems, And Apoptosis. *Free Radic Biol Med.* (48); 749–762, 2010.
- 37 Han D, Ybanez MD, Ahmadi S, Yeh K, Kaplowitz N. Redox Regulation Of Tumor Necrosis Factor Signaling. *Antioxid Redox Signal.* (11); 2245–2263, 2009.
- 38 Nguyen KC, Willmore WG, Tayabali AF. Cadmium Telluride Quantum Dots Cause Oxidative Stress Leading To Extrinsic And Intrinsic Apoptosis In Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Toxicology.* (306); 114–123, 2013.
- 39 Kupsco A, Schlenk D. Molecular Mechanisms Of Selenium-Induced Spinal Deformities In Fish. *Aquat Toxicol.* (179); 143–150, 2016.
- 40 Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch In The Decision Between Apoptosis And Necrosis. *J Exp Med.* (185); 1481–6, 1997.
- 41 Friedlander RM. Apoptosis And Caspases In Neurodegenerative Diseases. *N Engl J Med.* (348); 1365–1375, 2003.
- 42 Wanner M, Lang DM, Bandtlow CE, Schwab ME, Bastmeyer M, Stuermer CA. Reevaluation Of The Growth-Permissive Substrate Properties Of Goldfish Optic Nerve Myelin And Myelin Proteins. *J Neurosci.* (15); 7500–8, 1995.

- 43 Lurie DI, Selzer ME. Axonal Regeneration In The Adult Lamprey Spinal Cord. *J Comp Neurol.* (306); 409–416, 1991.
- 44 Wu Z, Ghosh-Roy A, Yanik MF, Zhang JZ, Jin Y, Chisholm AD. *Caenorhabditis Elegans* Neuronal Regeneration Is Influenced By Life Stage, Ephrin Signaling, And Synaptic Branching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (104); 15132–7, 2007.
- 45 Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons From CNS Neurones Regenerate Into PNS Grafts. *Nature.* (284); 264–265, 1980.
- 46 Altman J, Das GD. Autoradiographic And Histological Evidence Of Postnatal Hippocampal Neurogenesis In Rats. *J Comp Neurol.* (124); 319–335, 1965.
- 47 Altman J. Autoradiographic And Histological Studies Of Postnatal Neurogenesis. IV. Cell Proliferation And Migration In The Anterior Forebrain, With Special Reference To Persisting Neurogenesis In The Olfactory Bulb. *J Comp Neurol.* (137); 433–457, 1969.
- 48 Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning Enhances Adult Neurogenesis In The Hippocampal Formation. *Nat Neurosci.* (2); 260–265, 1999.
- 49 Liu K, Tedeschi A, Park KK, He Z. Neuronal Intrinsic Mechanisms Of Axon Regeneration. *Annu Rev Neurosci.* (34); 131–152, 2011.
- 50 Tedeschi A, Bradke F. Spatial And Temporal Arrangement Of Neuronal Intrinsic And Extrinsic Mechanisms Controlling Axon Regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* (42); 118–127, 2017.
- 51 Giovanni S Di. Molecular Targets For Axon Regeneration: Focus On The Intrinsic Pathways. *Expert Opin Ther Targets.* (13); 1387–1398, 2009.
- 52 Goslin K, Banker G. Experimental Observations On The Development Of Polarity By Hippocampal Neurons In Culture. *J Cell Biol.* (108); 1507–16, 1989.
- 53 Dotti CG, Banker GA. Experimentally Induced Alteration In The Polarity Of Developing Neurons. *Nature.* (330); 254–6, 1987.
- 54 Bradke F, Dotti CG. Differentiated Neurons Retain The Capacity To Generate Axons From Dendrites. *Curr Biol.* (10); 1467–1470, 2000.

- 55 Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J. Studies On The Development And Behavior Of The Dystrophic Growth Cone, The Hallmark Of Regeneration Failure, In An In Vitro Model Of The Glial Scar And After Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* (24); 6531–9, 2004.
- 56 Ylera B, Ertürk A, Hellal F, Nadrigny F, Hurtado A, Tahirovic S, Oudega M, Kirchhoff F, Bradke F. Chronically CNS-Injured Adult Sensory Neurons Gain Regenerative Competence Upon A Lesion Of Their Peripheral Axon. *Curr Biol.* (19); 930–936, 2009.
- 57 Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyer RL, Holt CE, Fawcett JW. Axonal Protein Synthesis And Degradation Are Necessary For Efficient Growth Cone Regeneration. *J Neurosci.* (25); 331–42, 2005.
- 58 Kamber D, Erez H, Spira ME. Local Calcium-Dependent Mechanisms Determine Whether A Cut Axonal End Assembles A Retarded Endbulb Or Competent Growth Cone. *Exp Neurol.* (219); 112–125, 2009.
- 59 Chierzi S, Ratto GM, Verma P, Fawcett JW. The Ability Of Axons To Regenerate Their Growth Cones Depends On Axonal Type And Age, And Is Regulated By Calcium, CAMP And ERK. *Eur J Neurosci.* (21); 2051–2062, 2005.
- 60 Ziv NE, Spira ME. Localized And Transient Elevations Of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Induce The Dedifferentiation Of Axonal Segments Into Growth Cones. *J Neurosci.* (17); 3568–79, 1997.
- 61 Ziv NE, Spira ME. Axotomy Induces A Transient And Localized Elevation Of The Free Intracellular Calcium Concentration To The Millimolar Range. *J Neurophysiol.* (74); 2625–37, 1995.
- 62 Ambron RT, Walters ET. Priming Events And Retrograde Injury Signals. *Mol Neurobiol.* (13); 61–79, 1996.
- 63 Vogelaar CF, Gervasi NM, Gumy LF, Story DJ, Raha-Chowdhury R, Leung K-M, Holt CE, Fawcett JW. Axonal MRNAs: Characterisation And Role In The Growth And Regeneration Of Dorsal Root Ganglion Axons And Growth Cones. *Mol Cell Neurosci.* (42); 102–115, 2009.
- 64 Yan D, Wu Z, Chisholm AD, Jin Y. The DLK-1 Kinase Promotes MRNA

- Stability And Local Translation In C. Elegans Synapses And Axon Regeneration. *Cell*. (138); 1005–1018, 2009.
- 65 Rishal I, Fainzilber M. Axon–soma Communication In Neuronal Injury. *Nat Rev Neurosci*. (15); 32–42, 2014.
- 66 Perry RB, Fainzilber M. Local Translation In Neuronal Processes- *In Vivo* Tests Of A “Heretical Hypothesis.” *Dev Neurobiol*. (74); 210–217, 2014.
- 67 Puttagunta R, Tedeschi A, Sória MG, Hervera A, Lindner R, Rathore KI, Gaub P, Joshi Y, Nguyen T, Schmandke A, Laskowski CJ, Boutilier A-L, Bradke F, Di Giovanni S. PCAF-Dependent Epigenetic Changes Promote Axonal Regeneration In The Central Nervous System. *Nat Commun*. (5); 3527, 2014.
- 68 Nix P, Hisamoto N, Matsumoto K, Bastiani M. Axon Regeneration Requires Coordinate Activation Of P38 And JNK MAPK Pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (108); 10738–43, 2011.
- 69 Gomis-Rüth S, Wierenga CJ, Bradke F. Plasticity Of Polarization: Changing Dendrites Into Axons In Neurons Integrated In Neuronal Circuits. *Curr Biol*. (18); 992–1000, 2008.
- 70 Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. Axonal MRNA In Uninjured And Regenerating Cortical Mammalian Axons. *J Neurosci*. (29); 4697–707, 2009.
- 71 Bisby MA, Tetzlaff W. Changes In Cytoskeletal Protein Synthesis Following Axon Injury And During Axon Regeneration. *Mol Neurobiol*. (6); 107–123, 1992.
- 72 Wu J, Yang S, Xi G, Fu G, Keep RF, Hua Y. Minocycline Reduces Intracerebral Hemorrhage-Induced Brain Injury. *Neurol Res*. (31); 183–188, 2009.
- 73 Gage FH, Horner PJ. Regenerating The Damaged Central Nervous System. *Nature*. (407); 963–970, 2000.
- 74 Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction Of Neurogenesis In The Neocortex Of Adult Mice. *Nature*. (405); 951–955, 2000.
- 75 Twiss JL, Merianda TT. Old Dogs With New Tricks: Intra-Axonal Translation Of Nuclear Proteins. *Neural Regen Res*. (10); 1560–2, 2015.

- 77 Roitbak T, Syková E. Diffusion Barriers Evoked In The Rat Cortex By Reactive Astrogliosis. *Glia*. (28); 40–48, 1999.
- 78 Filbin MT. Myelin-Associated Inhibitors Of Axonal Regeneration In The Adult Mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci*. (4); 703–713, 2003.
- 79 He Z, Koprivica V. The Nogo Signaling Pathway For Regeneration Block. *Annu Rev Neurosci*. (27); 341–68, 2004.
- 80 Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C, Weinstein L. Relation Between Lipophilicity And Pharmacological Behavior Of Minocycline, Doxycycline, Tetracycline, And Oxytetracycline In Dogs. *Antimicrob Agents Chemother*. (8); 713–20, 1975.
- 81 Kramer PA, Chapron DJ, Benson J, Mercik SA. Tetracycline Absorption In Elderly Patients With Achlorhydria. *Clin Pharmacol Ther*. (23); 467–72, 1978.
- 82 Klein NC, Cunha BA. Tetracyclines. *Med Clin North Am*. (79); 789–801, 1995.
- 83 Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman Tetracycline Farmakolojik Temeli. Nobel Tıp Kitapevi.
- 84 Williams D, Laughlin L, Lee Y-H. MINOCYCLINE: POSSIBLE VESTIBULAR SIDE-EFFECTS. *Lancet*. (304); 744–746, 1974.
- 85 Nelson ML. Chemical And Biological Dynamics Of Tetracyclines. *Adv Dent Res*. (12); 5–11, 1998.
- 86 Good ML, Hussey DL. Minocycline: Stain Devil? *Br J Dermatol*. (149); 237–239, 2003.
- 87 Blum D, Chtarto A, Tenenbaum L, Brotchi J, Levivier M. Clinical Potential Of Minocycline For Neurodegenerative Disorders. *Neurobiol Dis*. (17); 359–366, 2004.
- 88 Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Minocycline. *Drugs*. (9); 251–291, 1975.
- 89 Aronson AL. Pharmacotherapeutics Of The Newer Tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc*. (176); 1061–8, 1980.
- 90 Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines

- Inhibit Microglial Activation And Are Neuroprotective In Global Brain Ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (95); 15769–74, 1998.
- 91 Kielian T, Esen N, Liu S, Phulwani NK, Syed MM, Phillips N, Nishina K, Cheung AL, Schwartzman JD, Ruhe JJ. Minocycline Modulates Neuroinflammation Independently Of Its Antimicrobial Activity In Staphylococcus Aureus-Induced Brain Abscess. *Am J Pathol.* (171); 1199–214, 2007.
- 92 Saivin S, Houin G. Clinical Pharmacokinetics Of Doxycycline And Minocycline. *Clin Pharmacokinet.* (15); 355–366, 1988.
- 93 Wang X, Barone FC, White RF, Feuerstein GZ, Barone FC. Subtractive Cloning Identifies Tissue Inhibitor Of Matrix Metalloproteinase-1 (TIMP-1) Increased Gene Expression Following Focal Stroke. *Stroke.* (29); 516–20, 1998.
- 94 Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G, Sipos T, Baron HJ. Adjunctive Treatment With Subantimicrobial Doses Of Doxycycline: Effects On Gingival Fluid Collagenase Activity And Attachment Loss In Adult Periodontitis. *J Clin Periodontol.* (28); 146–156, 2001.
- 95 Greenwald R, Golub L. Biologic Properties Of Non-Antibiotic, Chemically Modified Tetracyclines (CMTs): A Structured, Annotated Bibliography. *Curr Med Chem.* (8); 237–242, 2001.
- 96 Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: Nonantibiotic Properties And Their Clinical Implications. *J Am Acad Dermatol.* (54); 258–265, 2006.
- 97 Ramamurthy NS, Vernillo AT, Greenwald RA, Lee H-M, Sorsa T, Golub LM, Rifkin BR. Reactive Oxygen Species Activate And Tetracyclines Inhibit Rat Osteoblast Collagenase. *J Bone Miner Res.* (8); 1247–1253, 2009.
- 98 Zemke D, Majid A. The Potential Of Minocycline For Neuroprotection In Human Neurologic Disease. *Clin Neuropharmacol.* (27); 293–298, 2004.
- 99 Amin AR, Patel RN, Thakker GD, Lowenstein CJ, Attur MG, Abramson SB. Post-Transcriptional Regulation Of Inducible Nitric Oxide Synthase MRNA In Murine Macrophages By Doxycycline And Chemically Modified



- Tetracyclines. *FEBS Lett.* (410); 259–264, 1997.
- 100 Pruzanski W, Greenwald RA, Street LP, Lauberte F, Stefanski E, Vadas P. Inhibition Of Enzymatic Activity Of Phospholipases A2 By Minocycline And Doxycycline. *Biochem Pharmacol.* (44); 1165–1170, 1992.
- 101 Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines Inhibit Connective Tissue Breakdown: New Therapeutic Implications For An Old Family Of Drugs. *Crit Rev Oral Biol Med.* (2); 297–321, 1991.
- 102 Corbacella E, Lanzoni I, Ding D, Previati M, Salvi R. Minocycline Attenuates Gentamicin Induced Hair Cell Loss In Neonatal Cochlear Cultures. *Hear Res.* (197); 11–18, 2004.
- 103 Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. Minocycline Inhibits Caspase-1 And Caspase-3 Expression And Delays Mortality In A Transgenic Mouse Model Of Huntington Disease. *Nat Med.* (6); 797–801, 2000.
- 104 Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. Minocycline Inhibits Caspase-Independent And -Dependent Mitochondrial Cell Death Pathways In Models Of Huntington's Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (100); 10483–7, 2003.
- 105 Domercq M, Matute C. Neuroprotection By Tetracyclines. *Trends Pharmacol Sci.* (25); 609–612, 2004.
- 106 J. Jordan, M. Ramos, I. Ikuta, N. Aguirre, M.F. Galindo. Minocycline And Cytoprotection: Shedding New Light On A Shadowy Controversy. *Curr Drug Deliv.* (4); 225–231, 2007.
- 107 Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA. Minocycline Inhibits Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 At Nanomolar Concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (103); 9685–90, 2006.
- 108 Whiteman M, Halliwell B. Prevention Of Peroxynitrite-Dependent Tyrosine Nitration And Inactivation Of  $\alpha_1$ -Antiproteinase By Antibiotics. *Free Radic Res.* (26); 49–56, 1997.

- 109 Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, Kaneko Y, Ojika K, Hess DC, Borlongan C V. Therapeutic Targets And Limits Of Minocycline Neuroprotection In Experimental Ischemic Stroke. *BMC Neurosci.* (10); 126, 2009.
- 110 Tsuji M, Wilson MA, Lange MS, Johnston M V. Minocycline Worsens Hypoxic-Ischemic Brain Injury In A Neonatal Mouse Model. *Exp Neurol.* (189); 58–65, 2004.
- 111 Carty ML, Wixey JA, Colditz PB, Buller KM. Post-Insult Minocycline Treatment Attenuates Hypoxia-Ischemia-Induced Neuroinflammation And White Matter Injury In The Neonatal Rat: A Comparison Of Two Different Dose Regimens. *Int J Dev Neurosci.* (26); 477–485, 2008.
- 112 FEUERSTEIN GZ, WANG X, BARONE FC. Inflammatory Gene Expression In Cerebral Ischemia And Trauma. *Ann N Y Acad Sci.* (825); 179–193, 1997.
- 113 Koistinaho J, Hökfelt T. Altered Gene Expression In Brain Ischemia. *Neuroreport.* (8); i–viii, 1997.
- 114 Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A Tetracycline Derivative, Minocycline, Reduces Inflammation And Protects Against Focal Cerebral Ischemia With A Wide Therapeutic Window. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (96); 13496–500, 1999.
- 115 Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix Metalloproteinase Expression Increases After Cerebral Focal Ischemia In Rats: Inhibition Of Matrix Metalloproteinase-9 Reduces Infarct Size. *Stroke.* (29); 1020–30, 1998.
- 116 Koistinaho M, Malm TM, Kettunen MI, Goldsteins G, Starckx S, Kauppinen RA, Opdenakker G, Koistinaho J. Minocycline Protects Against Permanent Cerebral Ischemia In Wild Type But Not In Matrix Metalloprotease-9-Deficient Mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* (25); 460–467, 2005.
- 117 Park CH, Shin TK, Lee HY, Kim SJ, Lee WS. Matrix Metalloproteinase Inhibitors Attenuate Neuroinflammation Following Focal Cerebral Ischemia In Mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* (15); 115, 2011.
- 118 Kikuchi K, Kawahara K ichi, Biswas KK, Ito T, Tancharoen S, Morimoto Y,

- Matsuda F, Oyama Y, Takenouchi K, Miura N, Arimura N, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Arimura S, Iwata M, Mera K, Sameshima H, Ohno Y, Maenosono R, Yoshida Y, Tajima Y, Uchikado H, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Hashiguchi T, Maruyama I. Minocycline Attenuates Both OGD-Induced HMGB1 Release And HMGB1-Induced Cell Death In Ischemic Neuronal Injury In PC12 Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (385); 132–136, 2009.
- 119 Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M. Delayed Treatment With Minocycline Ameliorates Neurologic Impairment Through Activated Microglia Expressing A High-Mobility Group Box1-Inhibiting Mechanism. *Stroke.* (39); 951–958, 2008.
- 120 Bustin M. Regulation Of DNA-Dependent Activities By The Functional Motifs Of The High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. *Mol Cell Biol.* (19); 5237–46, 1999.
- 121 Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release Of Chromatin Protein HMGB1 By Necrotic Cells Triggers Inflammation. *Nature.* (418); 191–195, 2002.
- 122 Cai Z, Lin S, Fan L-W, Pang Y, Rhodes PG. Minocycline Alleviates Hypoxic–ischemic Injury To Developing Oligodendrocytes In The Neonatal Rat Brain. *Neuroscience.* (137); 425–435, 2006.
- 123 Lechpammer M, Manning SM, Samonte F, Nelligan J, Sabo E, Talos DM, Volpe JJ, Jensen FE. Minocycline Treatment Following Hypoxicischaemic Injury Attenuates White Matter Injury In A Rodent Model Of Periventricular Leucomalacia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (34); 379–393, 2008.
- 124 Min Y, Li H, Xu K, Huang Y, Xiao J, Wang W, Li L, Yang T, Huang L, Yang L, Jiang H, Wang Q, Zhao M, Hua H, Mei R, Li F. Minocycline-Suppression Of Early Peripheral Inflammation Reduces Hypoxia-Induced Neonatal Brain Injury. *Front Neurosci.* (11); 511, 2017.
- 125 Liu Z, Fan Y, Won SJ, Neumann M, Hu D, Zhou L, Weinstein PR, Liu J. Chronic Treatment With Minocycline Preserves Adult New Neurons And Reduces Functional Impairment After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke.* (38); 146–52, 2007.

- 126 Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin SZ, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline Markedly Protects The Neonatal Brain Against Hypoxic-Ischemic Injury. *Ann Neurol.* (52); 54–61, 2002.
- 127 Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, Anca-Hershkowitz M, Sadeh M. Minocycline Treatment In Acute Stroke: An Open-Label, Evaluator-Blinded Study. *Neurology.* (69); 1404–10, 2007.
- 128 Wang J, Doré S. Inflammation After Intracerebral Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* (27); 894–908, 2007.
- 129 Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *N Engl J Med.* (344); 1450–1460, 2001.
- 130 Mayer SA, Rincon F. Treatment Of Intracerebral Haemorrhage. *Lancet Neurol.* (4); 662–672, 2005.
- 131 Wasserman JK, Schlichter LC. Neuron Death And Inflammation In A Rat Model Of Intracerebral Hemorrhage: Effects Of Delayed Minocycline Treatment. *Brain Res.* (1136); 208–218, 2007.
- 132 Wasserman JK, Schlichter LC. Minocycline Protects The Blood–brain Barrier And Reduces Edema Following Intracerebral Hemorrhage In The Rat. *Exp Neurol.* (207); 227–237, 2007.
- 133 Wasserman JK, Zhu X, Schlichter LC. Evolution Of The Inflammatory Response In The Brain Following Intracerebral Hemorrhage And Effects Of Delayed Minocycline Treatment. *Brain Res.* (1180); 140–54, 2007.
- 134 Manso Y, Holland PR, Kitamura A, Szymkowiak S, Duncombe J, Hennessy E, Searcy JL, Marangoni M, Randall AD, Brown JT, McColl BW, Horsburgh K. Minocycline Reduces Microgliosis And Improves Subcortical White Matter Function In A Model Of Cerebral Vascular Disease. *Glia.* (66); 34–46, 2018.
- 135 Xue M, Mikliaeva EI, Casha S, Zygun D, Demchuk A, Yong VW. Improving Outcomes Of Neuroprotection By Minocycline: Guides From Cell Culture And Intracerebral Hemorrhage In Mice. *Am J Pathol.* (176); 1193–202, 2010.
- 136 Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG. Microglia Potentiate

- Damage To Blood-Brain Barrier Constituents: Improvement By Minocycline In Vivo And In Vitro. *Stroke*. (37); 1087–93, 2006.
- 137 Chang JJ, Kim-Tenser M, Emanuel BA, Jones GM, Chapple K, Alikhani A, Sanossian N, Mack WJ, Tsivgoulis G, Alexandrov A V., Pourmotabbed T. Minocycline And Matrix Metalloproteinase Inhibition In Acute Intracerebral Hemorrhage: A Pilot Study. *Eur J Neurol*. (24); 1384–1391, 2017.
- 138 Fouda AY, Newsome AS, Spellicy S, Waller JL, Zhi W, Hess DC, Ergul A, Edwards DJ, Fagan SC, Switzer JA. Minocycline In Acute Cerebral Hemorrhage: An Early Phase Randomized Trial. *Stroke*. (48); 2885–2887, 2017.
- 139 Wells JEA, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection By Minocycline Facilitates Significant Recovery From Spinal Cord Injury In Mice. *Brain*. (126); 1628–1637, 2003.
- 140 Yune TY, Lee JY, Jung GY, Kim SJ, Jiang MH, Kim YC, Oh YJ, Markelonis GJ, Oh TH. Minocycline Alleviates Death Of Oligodendrocytes By Inhibiting Pro-Nerve Growth Factor Production In Microglia After Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. (27); 7751–61, 2007.
- 141 Hunter CL, Quintero EM, Gilstrap L, Bhat NR, Granholm A-C. Minocycline Protects Basal Forebrain Cholinergic Neurons From Mu P75-Saporin Immunotoxic Lesioning. *Eur J Neurosci*. (19); 3305–3316, 2004.
- 142 Cho DC, Cheong JH, Yang MS, Hwang SJ, Kim JM, Kim CH. The Effect Of Minocycline On Motor Neuron Recovery And Neuropathic Pain In A Rat Model Of Spinal Cord Injury. *J Korean Neurosurg Soc*. (49); 83–91, 2011.
- 143 Lee SM, Yune TY, Kim SJ, Park DW, Lee YK, Kim YC, Oh YJ, Markelonis GJ, Oh TH. Minocycline Reduces Cell Death And Improves Functional Recovery After Traumatic Spinal Cord Injury In The Rat. *J Neurotrauma*. (20); 1017–1027, 2003.
- 144 Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, Ramer MS, Tetzlaff W. Minocycline Treatment Reduces Delayed Oligodendrocyte Death, Attenuates Axonal Dieback, And Improves Functional Outcome After Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. (24); 2182–2190,

- 2004.
- 145 Saganová K, Orendáčová J, Čížková D, Vanický I. Limited Minocycline Neuroprotection After Balloon-Compression Spinal Cord Injury In The Rat. *Neurosci Lett.* (433); 246–249, 2008.
- 146 Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, Woodard EJ, Snyder EY, Eichler ME, Friedlander RM. Minocycline Inhibits Contusion-Triggered Mitochondrial Cytochrome C Release And Mitigates Functional Deficits After Spinal Cord Injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (101); 3071–3076, 2004.
- 147 Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA. Minocycline Neuroprotects, Reduces Microgliosis, And Inhibits Caspase Protease Expression Early After Spinal Cord Injury. *J Neurochem.* (97); 1314–1326, 2006.
- 148 Pinkernelle J, Fansa H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Prolonged Minocycline Treatment Impairs Motor Neuronal Survival And Glial Function In Organotypic Rat Spinal Cord Cultures. *PLoS One.* (8); e73422, 2013.
- 149 Casha S, Zygun D, McGowan D, Yong VW, Hurlbert RJ. Neuroprotection With Minocycline After Spinal Cord Injury. *Neurosurgery.* (65); 410–411, 2009.
- 150 Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, John Hurlbert R. Results Of A Phase II Placebo-Controlled Randomized Trial Of Minocycline In Acute Spinal Cord Injury. *Brain.* (135); 1224–1236, 2012.
- 151 Hains BC. Activated Microglia Contribute To The Maintenance Of Chronic Pain After Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* (26); 4308–4317, 2006.
- 152 Liu Z, Liang Y, Wang H, Lu Z, Chen J, Huang Q, Sheng L, Ma Y, Du H, Gong Q. LncRNA Expression In The Spinal Cord Modulated By Minocycline In A Mouse Model Of Spared Nerve Injury. *J Pain Res.* (10); 2503–2514, 2017.
- 153 Donnerer J, Liebmann I. Upregulation Of BDNF And Interleukin-1 $\beta$  In Rat Spinal Cord Following Noxious Hind Paw Stimulation. *Neurosci Lett.* (665); 152–155, 2018.

- 154 Rubiano AM, Carney N, Chesnut R, Puyana JC. Global Neurotrauma Research Challenges And Opportunities. *Nature*. (527); S193–S197, 2015.
- 155 Chhor V, Moretti R, Le Charpentier T, Sigaut S, Lebon S, Schwendimann L, Oré MV, Zuiani C, Milan V, Josserand J, Vontell R, Pansiot J, Degos V, Ikonomidou C, Titomanlio L, Hagberg H, Gressens P, Fleiss B. Role Of Microglia In A Mouse Model Of Paediatric Traumatic Brain Injury. *Brain Behav Immun*. (63); 197–209, 2017.
- 156 Helmy A, Carpenter KL, Menon DK, Pickard JD, Hutchinson PJ. The Cytokine Response To Human Traumatic Brain Injury: Temporal Profiles And Evidence For Cerebral Parenchymal Production. *J Cereb Blood Flow Metab*. (31); 658–670, 2011.
- 157 Kaindl AM, Zabel C, Stefovská V, Lehnert R, Sifringer M, Klose J, Ikonomidou C. Subacute Proteome Changes Following Traumatic Injury Of The Developing Brain: Implications For A Dysregulation Of Neuronal Migration And Neurite Arborization. *PROTEOMICS – Clin Appl*. (1); 640–649, 2007.
- 158 Moretti R, Leger P-L, Besson VC, Csaba Z, Pansiot J, Di Criscio L, Gentili A, Titomanlio L, Bonnin P, Baud O, Charriaut-Marlangue C. Sildenafil, A Cyclic GMP Phosphodiesterase Inhibitor, Induces Microglial Modulation After Focal Ischemia In The Neonatal Mouse Brain. *J Neuroinflammation*. (13); 95, 2016.
- 159 Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal Models Of Traumatic Brain Injury. *Nat Rev Neurosci*. (14); 128–142, 2013.
- 160 Bye N, Habgood MD, Callaway JK, Malakooti N, Potter A, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Transient Neuroprotection By Minocycline Following Traumatic Brain Injury Is Associated With Attenuated Microglial Activation But No Changes In Cell Apoptosis Or Neutrophil Infiltration. *Exp Neurol*. (204); 220–233, 2007.
- 161 Simon DW, Aneja RK, Alexander H, Bell MJ, Bayir H, Kochanek PM, Clark RSB. Minocycline Attenuates High Mobility Group Box 1 Translocation, Microglial Activation, And Thalamic Neurodegeneration After Traumatic Brain Injury In Postnatal Day 17 Rats. *J Neurotrauma*. neu.2017.5093, 2017.

- 162 Hanlon LA, Raghupathi R, Huh JW. Differential Effects Of Minocycline On Microglial Activation And Neurodegeneration Following Closed Head Injury In The Neonate Rat. *Exp Neurol.* (290); , 2017.
- 163 Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. Minocycline Reduces Traumatic Brain Injury-Mediated Caspase-1 Activation, Tissue Damage, And Neurological Dysfunction. *Neurosurgery.* (48); 1393-9; discussion 1399-401, 2001.
- 164 Scott G, Zetterberg H, Jolly A, Cole JH, De Simoni S, Jenkins PO, Feeney C, Owen DR, Lingford-Hughes A, Howes O, Patel MC, Goldstone AP, Gunn RN, Blennow K, Matthews PM, Sharp DJ. Minocycline Reduces Chronic Microglial Activation After Brain Trauma But Increases Neurodegeneration. *Brain.* (141); 459–471, 2018.
- 165 Baki SGA, Schwab B, Haber M, Fenton AA, Bergold PJ. Minocycline Synergizes With N-Acetylcysteine And Improves Cognition And Memory Following Traumatic Brain Injury In Rats. *PLoS One.* (5); e12490, 2010.
- 166 Haber M, James J, Kim J, Sangobowale M, Irizarry R, Ho J, Nikulina E, Grin'kina NM, Ramadani A, Hartman I, Bergold PJ. Minocycline Plus N-Acetylcysteine Induces Remyelination, Synergistically Protects Oligodendrocytes, And Modifies Neuroinflammation In A Rat Model Of Mild Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab.*0271678X1771810, 2017.
- 167 Sangobowale M, Grin'kina NM, Whitney K, Nikulina E, St. Laurent-Arriot K, Ho JS, Bazyan N, Bergold P. Minocycline Plus N-Acetylcysteine Reduce Behavioral Deficits And Improve Histology With A Clinically Useful Time Window. *J Neurotrauma.*neu.2017.5348, 2017.
- 168 Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms And Models. *Neuron.* (39); 889–909, 2003.
- 169 Le W, Rowe D, Xie W, Ortiz I, He Y, Appel SH. Microglial Activation And Dopaminergic Cell Injury: An In Vitro Model Relevant To Parkinson's Disease. *J Neurosci.* (21); 8447–55, 2001.
- 170 Radad K, Moldzio R, Rausch W-D. Minocycline Protects Dopaminergic Neurons Against Long-Term Rotenone Toxicity. *Can J Neurol Sci.* (37); 81–5,



- 2010.
- 171 Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. Minocycline Prevents Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration In The MPTP Model Of Parkinson's Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (98); 14669–74, 2001.
- 172 Diguët E, Fernagut P-O, Wei X, Du Y, Rouland R, Gross C, Bezard E, Tison F. Deleterious Effects Of Minocycline In Animal Models Of Parkinson's Disease And Huntington's Disease. *Eur J Neurosci.* (19); 3266–3276, 2004.
- 173 Yang L, Sugama S, Chirichigno JW, Gregorio J, Lorenzl S, Shin DH, Browne SE, Shimizu Y, Joh TH, Beal MF, Albers DS. Minocycline Enhances MPTP Toxicity To Dopaminergic Neurons. *J Neurosci Res.* (74); 278–285, 2003.
- 174 Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi D-K, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade Of Microglial Activation Is Neuroprotective In The 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model Of Parkinson Disease. *J Neurosci.* (22); 1763–71, 2002.
- 175 Peng J, Xie L, Stevenson FF, Melov S, Di Monte DA, Andersen JK. Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration In The Weaver Mouse Is Mediated Via Neuroinflammation And Alleviated By Minocycline Administration. *J Neurosci.* (26); 11644–51, 2006.
- 176 He Y, Appel S, Le W. Minocycline Inhibits Microglial Activation And Protects Nigral Cells After 6-Hydroxydopamine Injection Into Mouse Striatum. *Brain Res.* (909); 187–193, 2001.
- 177 Quintero EM, Willis L, Singleton R, Harris N, Huang P, Bhat N, Granholm A-C. Behavioral And Morphological Effects Of Minocycline In The 6-Hydroxydopamine Rat Model Of Parkinson's Disease. *Brain Res.* (1093); 198–207, 2006.
- 178 Cronin A, Greal M. Neuroprotective And Neuro-Restorative Effects Of Minocycline And Rasagiline In A Zebrafish 6-Hydroxydopamine Model Of Parkinson's Disease. *Neuroscience.* (367); 34–46, 2017.
- 179 NINDS NET-PD Investigators. A Pilot Clinical Trial Of Creatine And

- Minocycline In Early Parkinson Disease. *Clin Neuropharmacol.* (31); 141–150, 2008.
- 180 Smith DL, Woodman B, Mahal A, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Lowden PAS, Bates GP, Hockly E. Minocycline And Doxycycline Are Not Beneficial In A Model Of Huntington's Disease. *Ann Neurol.* (54); 186–196, 2003.
- 181 Stack EC, Smith KM, Ryu H, Cormier K, Chen M, Hagerty SW, Del Signore SJ, Cudkowicz ME, Friedlander RM, Ferrante RJ. Combination Therapy Using Minocycline And Coenzyme Q10 In R6/2 Transgenic Huntington's Disease Mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* (1762); 373–380, 2006.
- 182 Ryu JK, Choi HB, McLarnon JG. Combined Minocycline Plus Pyruvate Treatment Enhances Effects Of Each Agent To Inhibit Inflammation, Oxidative Damage, And Neuronal Loss In An Excitotoxic Animal Model Of Huntington's Disease. *Neuroscience.* (141); 1835–1848, 2006.
- 183 Bonelli RM, Hödl AK, Hofmann P, Kapfhammer H-P. Neuroprotection In Huntington's Disease: A 2-Year Study On Minocycline. *Int Clin Psychopharmacol.* (19); 337–42, 2004.
- 184 Huntington Study Group. Minocycline Safety And Tolerability In Huntington Disease. *Neurology.* (63); 547–9, 2004.
- 185 Thomas M, Ashizawa T, Jankovic J. Minocycline In Huntington's Disease: A Pilot Study. *Mov Disord.* (19); 692–695, 2004.
- 186 Huntington Study Group DOMINO Investigators. A Futility Study Of Minocycline In Huntington's Disease. *Mov Disord.* (25); 2219–24, 2010.
- 187 Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science.* (256); 184–5, 1992.
- 188 Finch CE, Cohen DM. Aging, Metabolism, And Alzheimer Disease: Review And Hypotheses. *Exp Neurol.* (143); 82–102, 1997.
- 189 Griffin S, Sheng J, Mrak R. Progress In Pathology Glial Cytokines In Alzheimer ' S Disease : Review And Pathogenic Implications. *Hum Pathol.* (26); 816–823, 1995.
- 190 Fan R, Xu F, Previti ML, Davis J, Grande AM, Robinson JK, Van Nostrand WE. Minocycline Reduces Microglial Activation And Improves Behavioral

- Deficits In A Transgenic Model Of Cerebral Microvascular Amyloid. *J Neurosci.* (27); 3057–3063, 2007.
- 191 Seabrook TJ, Jiang L, Maier M, Lemere CA. Minocycline Affects Microglia Activation, Abeta Deposition, And Behavior In APP-Tg Mice. *Glia.* (53); 776–82, 2006.
- 192 Choi Y, Kim H-S, Shin KY, Kim E-M, Kim M, Kim H-S, Park CH, Jeong YH, Yoo J, Lee J-P, Chang K-A, Kim S, Suh Y-H. Minocycline Attenuates Neuronal Cell Death And Improves Cognitive Impairment In Alzheimer's Disease Models. *Neuropsychopharmacology.* (32); 2393–2404, 2007.
- 193 Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression In Mammalian Cells. *Mol Cell.* (6); 1099–1108, 2000.
- 194 Taylor SS, Haste NM, Ghosh G. PKR And EIF2 $\alpha$ : Integration Of Kinase Dimerization, Activation, And Substrate Docking. *Cell.* (122); 823–825, 2005.
- 195 Chen A, Muzzio IA, Malleret G, Bartsch D, Verbitsky M, Pavlidis P, Yonan AL, Vronskaya S, Grody MB, Cepeda I, Gilliam TC, Kandel ER. Inducible Enhancement Of Memory Storage And Synaptic Plasticity In Transgenic Mice Expressing An Inhibitor Of ATF4 (CREB-2) And C/EBP Proteins. *Neuron.* (39); 655–669, 2003.
- 196 Cuello AC, Ferretti MT, Leon WC, Iulita MF, Melis T, Ducatenzeiler A, Bruno MA, Canneva F. Early-Stage Inflammation And Experimental Therapy In Transgenic Models Of The Alzheimer-Like Amyloid Pathology. *Neurodegener Dis.* (7); 96–8, 2010.
- 197 Friedlander RM, Brown RH, Gagliardini V, Wang J, Yuan J. Inhibition Of ICE Slows ALS In Mice. *Nature.* (388); 31–31, 1997.
- 198 Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. Functional Role Of Caspase-1 And Caspase-3 In An ALS Transgenic Mouse Model. *Science.* (288); 335–9, 2000.
- 199 Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BYS, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS,

- Friedlander RM. Minocycline Inhibits Cytochrome C Release And Delays Progression Of Amyotrophic Lateral Sclerosis In Mice. *Nature*. (417); 74–8, 2002.
- 200 Kriz J, Nguyen MD, Julien J-P. Minocycline Slows Disease Progression In A Mouse Model Of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol Dis*. (10); 268–278, 2002.
- 201 Van Den Bosch L, Tilkin P, Lemmens G, Robberecht W. Minocycline Delays Disease Onset And Mortality In A Transgenic Model Of ALS. *Neuroreport*. (13); 1067–70, 2002.
- 202 Tikka TM, Vartiainen NE, Goldsteins G, Oja SS, Andersen PM, Marklund SL, Koistinaho J. Minocycline Prevents Neurotoxicity Induced By Cerebrospinal Fluid From Patients With Motor Neurone Disease. *Brain*. (125); 722–731, 2002.
- 203 Yáñez M, Matías-Guiu J, Arranz-Tagarro J-A, Galán L, Viña D, Gómez-Pinedo U, Vela Á, Guerrero A, Martínez-Vila E, García AG. The Neuroprotection Exerted By Memantine, Minocycline And Lithium, Against Neurotoxicity Of CSF From Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis, Is Antagonized By Riluzole. *Neurodegener Dis*. (13); 171–179, 2014.
- 204 Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, Hilton JF, Spitalny GM, MacArthur RB, Mitsumoto H, Neville HE, Boylan K, Mozaffar T, Belsh JM, Ravits J, Bedlack RS, Graves MC, McCluskey LF, Barohn RJ, Tandan R, Western ALS Study Group. Efficacy Of Minocycline In Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Phase III Randomised Trial. *Lancet Neurol*. (6); 1045–53, 2007.
- 205 Keilhoff G, Lucas B, Fansa H, Fansa H. Selected Gene Profiles Of Stressed NSC-34 Cells And Rat Spinal Cord Following Peripheral Nerve Reconstruction And Minocycline Treatment. *Exp Ther Med*. (11); 1685–1699, 2016.
- 206 Yew Chin T, Sze Kiat S, Faizul HG, Wu W, Abdullah JM. The Effects Of Minocycline On Spinal Root Avulsion Injury In Rat Model. *Malaysian J Med Sci*. (24); 31–39, 2017.

- 207 Kitayama M, Ueno M, Itakura T, Yamashita T. Activated Microglia Inhibit Axonal Growth Through RGMA. *PLoS One*. (6); e25234, 2011.
- 208 Kuroda A, Fuchigami T, Fuke S, Koyama N, Ikenaka K, Hitoshi S. Minocycline Directly Enhances The Self-Renewal Of Adult Neural Precursor Cells. *Neurochem Res*. (43); 219–226, 2018.
- 209 Giri PK, Lu Y, Lei S, Li W, Zheng J, Lu H, Chen X, Liu Y, Zhang P. Pretreatment With Minocycline Improves Neurogenesis And Behavior Performance After Midazolam Exposure In Neonatal Rats. *Neuroreport*. (29); 153–159, 2018.
- 210 WILKINS A, NIKODEMOVA M, COMPSTON A, DUNCAN I. Minocycline Attenuates Nitric Oxide-Mediated Neuronal And Axonal Destruction In Vitro. *Neuron Glia Biol*. (1); 297–305, 2004.

## **10-ETİK KURUL ONAYI**



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.35856  
Konu : Etik Kurulu Kararı

06/10/2017

**Sayın Doç. Dr. Burak YULUĞ**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “In Vitro Aksotomi Modelinde Minosiklinin Nörorejenerasyon Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) 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 FF52078AXD kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık 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	60		Doç. Dr. Burak YULUĞ

“İn Vitro Aksotomi Modelinde Minosiklinin Nörorejenerasyon Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.
<b>Etik Onay Geçerlilik Süresi:</b> 12 ay

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 Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.45809  
Konu : Etik Kurulu Kararı

15/10/2018

**Sayın Prof. Dr. Burak YULUĞ**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06/10/2017 tarihli ve 60 karar no ile onay verilen "İn Vitro Aksotomi Modelinde Minosiklinin Nörorejenerasyon Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" isimli araştırma başvurunuzun Etik Onay süresinin "31/12/2018" tarihine kadar uzatılması isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

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

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 15.10.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 0FDCDBDX2 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>	Merve	<b>Soyadı</b>	Alökten
<b>Doğum Yeri</b>	Kırklareli	<b>Doğum Tarihi</b>	03.02.1992
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>TC Kimlik Numarası</b>	-
<b>E-posta</b>	mervealokten@gmail.com	<b>Tel.</b>	-

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurum</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Lise</b>	Remzi Yapıcı Anadolu Öğretmen Lisesi	2010
<b>Lisans</b>	İstanbul Bilim Üniversitesi	2014
<b>Lisans</b>	Tampere Ammatikorkeakoulu (Finlandiya)	2014 (3 ay)

### İş Deneyimi

<b>Görev</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>
Stajyer Fizyoterapist	Tammenlehvakeskus (Finlandiya)	2013-2014
Stajyer Fizyoterapist	Florence Nightingale Hastaneleri	2014
Stajyer Fizyoterapist	Temas Çocuk Merkezi	2014
Fizyoterapist	Özel Avrupa Tıp Merkezi	2014-2015
Fizyoterapist	Özel Tepe Tıp Merkezi	2015-2017

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi
İspanyolca	Orta	Zayıf	Zayıf

#### **Yabancı Dil Sınavı Notu**

<b>YDS</b>	70,00
------------	-------

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES</b>	79,31738	81,43058	72,45639

#### **Bilgisayar Bilgisi**

<b>Programlar</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
Microsoft Word	Çok iyi
Microsoft Excel	İyi
Microsoft Powerpoint	Çok iyi
ImageJ	Çok iyi