

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİNOSİKLİN VE NİLVADİPİNİN TEKRARLAYAN
DÖRT DAMAR OKLÜZYON YÖNTEMİYLE BEYİN
İSKEMİSİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
DAVRANIŞSAL VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ERTUĞRUL KAYA

DANIŞMAN: PROF. DR. İZZETTİN HATİP

DENİZLİ – 2006

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİNOSİKLİN VE NİLVADİPİNİN TEKRARLAYAN
DÖRT DAMAR OKLÜZYON YÖNTEMİYLE BEYİN
İSKEMİSİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
DAVRANIŞSAL VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

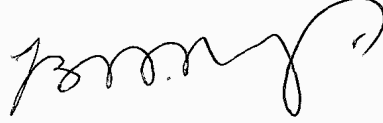
DR. ERTUĞRUL KAYA

DANIŞMAN: PROF. DR. İZZETTİN HATİP

DENİZLİ – 2006

İş bu çalışma jürimiz tarafından **FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda
TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. İzzettin HATİP



ÜYE: Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU



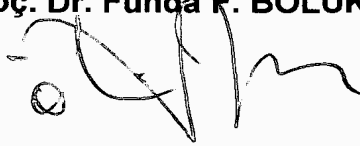
ÜYE: Doç. Dr. Osman GENÇ



ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Selim KORTUNAY



ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP

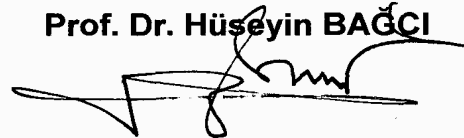


Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.

26/ 07 / 2006

DEKAN

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI



TEŐEKKÜR

Tez konumu belirlememe yardım edip her aşamada bana yol gsteren ve bana bilimi sevdiren Farmakoloji A.D. baŐkanımız sayın hocam Prof. Dr. İzzettin HATİP'e;

Farmakoloji Anabilim Dalımız hocalarından Sayın Yard. Doç. Dr. Selim KORTUNAY, Yard. Doç. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP ve asistan arkadaşlarım AraŐ. Gör. Dr. Emel YILMAZ, AraŐ. Gör. Dr. Z. Ceren GÜRDAL'a;

Biyokimyasal ölçümler konusunda bize yardımcı olan ve yol gsteren Biyokimya A.D. öğretim üyesi Doç. Dr. Süleyman DEMİR'e, biyokimyasal ölçümleri bizzat gerçekleŐtiren AraŐ. Gör. Dr. Feride SERT ve Uzm. Dr. Selahattin SERT'e;

İlaç temininde bize tüm kolaylıkları sağlayan Astellas Pharma Inc. (Japonya) yetkililerine;

Deney hayvanlarıyla ilgili işlemlerde yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Barbaros ŐAHİN'e; teŐekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

| | SAYFA NO |
|---|----------|
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. BELLEK BOZUKLUKLARI VE İNME | 2 |
| 2.1.1. İNME SONRASI BELLEK BOZUKLUĞU MEKANİZMALARI | 2 |
| 2.2. BELLEK BOZUKLUĞU İÇİN DENEYSEL MODELLER | 3 |
| 2.2.1. TÜM BEYİN İSKEMİSİ MODELLERİ | 3 |
| 2.2.1.1. BEYİN BESLEYEN ARTERLER | 4 |
| 2.2.1.2. DÖRT DAMAR OKLÜZYON YÖNTEMİ | 4 |
| 2.2.2. KOLİNERJİK FONKSİYON BOZUKLUĞU MODELLERİ | 5 |
| 2.2.3. NÖROTOKSİK MADDELERLE İLİŞKİLİ MODELLER | 5 |
| 2.2.4. TRANSGENİK MODELLER | 6 |
| 2.2.5. NÖROFİBRİLER YUMAKLARLA İLİŞKİLİ MODELLER | 6 |
| 2.2.6. PRESENİLİN İLE İLİŞKİLİ MODELLER | 7 |
| 2.2.7. YAŞLI PRİMATLAR ÜZERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR | 7 |
| 2.2.8. DİĞER YÖNTEMLER | 8 |
| 2.3. İSKEMİ-REPERFÜZYON ZEDELLENMESİ | 8 |
| 2.3.1. HÜCRESEL ZEDELLENME | 8 |
| 2.3.2. GERİ DÖNÜŞÜMLÜ-DÖNÜŞÜMSÜZ HÜCRE ZEDELLENMELERİ | 9 |
| 2.3.3. İSKEMİ-REPERFÜZYON ZEDELLENMESİ MEKANİZMALARI | 10 |
| 2.3.4. İSKEMİNİN NÖRONAL HİSTOPATOLOJİSİ | 12 |
| 2.4. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ | 12 |
| 2.5. İSKEMİDE BELLEK BOZUKLUĞUNUN DAVRANIŞSAL YÖNÜ | 14 |
| 2.5.1. DİĞER NÖROLOJİK DAVRANIŞ BOZUKLUKLARI | 14 |
| 2.6. MİNOSİKLİN | 15 |
| 2.6.1. FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLERİ | 15 |
| 2.6.2. MİNOSİKLİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ | 16 |
| 2.7. NİLVADİPİN | 17 |
| 2.7.1. FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLERİ | 18 |
| 2.7.2. NİLVADİPİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ | 19 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 20 |
| 3.1. SEKİZ KOLLU LABİRENT UYGULAMASI | 21 |
| 3.1.1. ÖN ALIŞTIRMA BÖLÜMÜ | 23 |
| 3.1.2. ÖĞRENME BÖLÜMÜ | 23 |
| 3.1.3. İSKEMİ SONRASI DEĞERLENDİRME BÖLÜMÜ | 23 |
| 3.2. DÖRT DAMAR OKLÜZYON YÖNTEMİ | 23 |
| 3.3. DENEY SONUNDA YAPILAN İŞLEMLER | 28 |
| 3.4. MALONDİALDEHİD DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ | 31 |
| 3.5. İLAÇ UYGULAMASI | 31 |
| 3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ | 32 |
| 4. BULGULAR | 33 |
| 4.1. SEKİZ KOLLU LABİRENT UYGULAMASI DEĞERLENDİRMESİ | 33 |
| 4.1.1. DOĞRU SEÇİMLER (DS) | 33 |
| 4.1.2. YANLIŞ SEÇİMLER (YS) | 34 |
| 4.2. MDA DÜZEYLERİ | 35 |
| 5. TARTIŞMA | 37 |
| 6. SONUÇLAR | 46 |
| 7. ÖZET | 47 |
| 8. YABANCI DİL (İNGİLİZCE) ÖZET | 49 |
| 9. KAYNAKLAR | 51 |

TABLolar DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Tablo-I: Reaktif Oksijen Türevleri | 13 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1: İskemi-reperfüzyon zedelenmesi, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi mekanizmaları | 10 |
| Şekil 2: Minosiklinin kimyasal yapısı | 15 |
| Şekil 3: Nilvadipinin kimyasal yapısı | 17 |
| Şekil 4: Deneyde kullanılan 8 kollu labirent aygıtı yandan (a) ve sınamaya sırasında üstten (b) görünümü | 21 |
| Şekil 5: Deneyde kullanılan operasyon masası | 24 |
| Şekil 6: Stereotaksi aygıtına sıçanın yerleştirilmiş görünümü | 24 |
| Şekil 7: Atlas ve aksis omurların açılmış görünümü | 26 |
| Şekil 8: Atlas ve aksis omurların faset eklemi arasından vertebral arterin koterlenişi | 26 |
| Şekil 9: Trakea yan tarafında ana karotis arterin açığa çıkarılışı | 27 |
| Şekil 10: Ana karotis arterin ipek iplikle gevşek düğüm atılmış durumu | 27 |
| Şekil 11: Ana karotis arterlere klemp takılışı | 29 |
| Şekil 12: Klemp sonrası düşerek yan yatmış bir sıçan | 29 |
| Şekil 13: Beyinden hipokampusun ayrılması sırasında çevredeki dokuların kaldırılması | 30 |
| Şekil 14: Çevre dokular kaldırıldıktan sonra hipokampusun görünümü | 30 |
| Şekil 15: Minosiklin ve nilvadipinin tüm beyin iskemisi modelinde sekiz kollu labirent DS sayılarına etkisi | 33 |
| Şekil 16: Minosiklin ve nilvadipinin tüm beyin iskemisi modelinde sekiz kollu labirent çalışması YS sayılarına etkisi | 34 |
| Şekil 17: Minosiklin ve nilvadipinin tüm beyin iskemisi modelinde hipokampus MDA düzeylerine etkisi | 35 |

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

- AH:** Alzheimer hastalığı
AMPA: α -Amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionik asid
ApoE: Apolipoprotein E
A β : Amiloid beta peptid
DS: Doğru seçim
ER: Endoplazmik retikulum
i.m.: İntramusküler
i.p.: İntraperitoneal
i.v.: İntravenöz
iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MDA: Malondialdehid
NMDA: N-Metil-D-aspartat
NO: Nitrik oksit
p.o.: Oral
ROS: Reaktif oksijen türevleri (*reactive oxygen species*)
s.c.: Subkutan
YS: Yanlış seçim

1. GİRİŞ

Bellek bozuklukları, serebrovasküler hastalıklar içinde, gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Özellikle tıptaki gelişmeler sonrası birçok hastalığın tedavi edilebilmesi sonucu toplumda yaşlılık ve buna bağlı olarak bellek bozuklukları artmaktadır. Bellek bozukluklarına yönelik tedavi edici özelliği olan ilaç araştırmaları gün geçtikçe değer kazanmaktadır (1).

Minosiklin, lipofilik özelliği yüksek, yarı sentetik, uzun etkili ikinci kuşak tetrasiklidir ve kan-beyin engelinden geçebilir. Bu ilaç tüm ve bölgesel beyin iskemisi, epilepsi, Huntington hastalığı, amyotrofik lateral skleroz, Parkinson hastalığı, multiple skleroz, travmatik beyin zedelenmesi ve omurilik zedelenmesi gibi bazı nörodejeneratif hastalık modellerinde nöroprotektif etkinlik göstermiştir (2).

Nilvadipin, hipertansiyon tedavisinde kullanılan güvenli ve etkili bir kalsiyum kanal blokeri ilaçtır. Nilvadipin merkezi sinir sistemine kolay geçer, iskemik beyinde infarksiyon alanını azaltır, serebral mikrosirkülasyonu iyileştirir. Nilvadipin tüm beyin iskemisi modelinde iskemi sonrası verildiğinde bellek bozukluğunu iyileştirici etki göstermiştir (1, 3).

Tekrarlayıcı, geçici tüm beyin iskemisi modeli, sekiz kollu labirent sınavında uzun süreli bellek bozukluğuna ve özellikle hipokampus CA1 bölgesinde seçici nöronal zedelenmeye neden olmuştur (4–6).

Bu çalışmamızda amaç, tekrarlayan geçici tüm beyin iskemisi modeli uygulanarak bellek bozukluğu oluşturulmuş sıçanlarda, profilaktik olarak minosiklin ve nilvadipin uygulanmasının belleğe olan etkilerinin davranışsal ve biyokimyasal olarak incelenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. BELLEK BOZUKLUKLARI VE İNME

İnsanda sosyal bir boyutu olan demans, bellek, yargılama, soyut düşünce ve konuşma gibi çoğul davranışsal bozukluk ve kişilik bozukluğuyla karakterizedir (7). Günümüzde yaklaşık 24 milyon insanın demans tanısı olarak bellek bozukluğu yaşadığı tahmin edilmektedir (11). İnme tanımı Dünya Sağlık Örgütü ölçütlerine göre ani gelişen, 24 saatten fazla süren ya da bu süre içinde ölüm ile sonuçlanan, damarsal nedenden başka bir açıklama getirilemeyen, bölgesel veya genel nörolojik bozukluk şeklinde yapılmaktadır. Avrupa'da 2000 yılında inme insidansının 1,1 milyon olduğu ve 2025 yılında 1,5 milyon olacağı hesaplanmıştır (8). İnme varlığı, bellek bozukluklarının sıklığını 4–12 kat artırmaktadır. İnme ile bellek bozukluğu arasındaki ilişki açık biçimde ortaya konmuştur. İnmeden sonra görülen bellek bozukluklarında iskemiye bağlı hücre zedelenmesi üzerinde durulmaktadır (9, 10). Bellek bozukluğuna birçok etken yol açmakla birlikte, son yıllarda damarsal kaynaklı olanlar ayrı bir sınıflandırma altında, damarsal kaynaklı bilişsel bozukluklar (*vascular cognitive disorders*) olarak adlandırılmaktadır. Damar kaynaklı bozuklukların önceden tanınması, önlenmesi ve tedavi edilebilmesi olası olduğundan inme ile oluşan bilişsel bozuklukların tanı ve tedavi olasılığı bulunmaktadır (12). Damarsal kaynaklı olmayan bellek bozukluğu yapan hastalık tiplerinde de inme sonrası bilişsel yeteneklerin azalması ve hastalığın ilerleyişinin hızlanması, açıkça damarsal problemlerin bellek bozukluğuna katkısını göstermektedir (13).

2.1.1. İNME SONRASI BELLEK BOZUKLUĞU MEKANİZMALARI

İnme ile bellek bozukluğu arasındaki ilişki çeşitli şekillerde olabilmektedir. İnme sonrası 3 ay içinde görülen bellek bozukluğu varsa nedensel bir ilişkiden bahsedilmektedir (10). İnme sonrası bellek bozukluğundan sorumlu olan önemli bir damarsal hastalık hipertansiyondur. Hipertansif hastalarda kan basıncının düşük olduğu zamanlarda beyindeki zayıf kollateral damarlanma gösteren alanlarda iskemi ortaya çıkarak küçük infarktlar oluşabilmektedir. Hipertansiyon ateroskleroz ile birlikte olarak büyük

ve küçük infarktlara neden olabilir. Beyin amiloid anjiyopatilerinde de infarktlar seyrek olarak görülebilmektedir. Atriyal fibrilasyon ve bazı kalp kapak hastalıkları beyinde infarktlara yol açabilirler. Tromboza neden olan kan hastalıkları, hiperkoagulasyon görülen durumlar, viskozitenin arttığı durumlar ve emboliye neden olan hastalıklar beyinde infarktlara yol açarak bellek bozukluğuna neden olabilmektedir (7).

2.2. BELLEK BOZUKLUĞU İÇİN DENEYSEL MODELLER

Bellek bozukluğu için yapılan deneysel modeller daha eskilere dayanmakla birlikte, son yıllarda Alzheimer hastalığı (AH) için yeni deneysel modeller de uygulanmaya başlanmıştır. Birçok hastalık modelinde olduğu gibi, inme, demans ya da AH olan bir insanda gözlenen bellek bozukluğunu tam olarak sergileyen bir hayvan modeli henüz geliştirilememiştir. Ancak, mevcut deneysel modeller bu hastalıkların bilişsel ve nöropatolojik zararlarını kısmen sergilemektedir. Bellek bozukluğunda kullanılan modellerin temellerini; tüm beyin iskemisi modelleri, kolinerjik fonksiyon bozukluğu modelleri, nörotoksik ajanlarla nöron zedelenmesi oluşturma, genetik patolojilerin benzerlerinin gerçekleştirilmesi oluşturur (14). Oldukça yaygın kullanılması, verilerimizin karşılaştırma olanağının olması ve oturmuş model olması nedeniyle çalışmamızda tekrarlayıcı geçici tüm beyin iskemisi modeli tercih edilmiştir.

2.2.1. TÜM BEYİN İSKEMİSİ MODELLERİ

Kemirgenlerdeki 3 ayrı tüm beyin iskemisi modeli günümüzde de en fazla kullanılan yöntemlerdir:

1- Sıçanlarda dört damar oklüzyon modeli: İki taraflı vertebral arterler kalıcı olarak koterize edilir, iki taraflı ana karotis arterler ise geçici olarak 10–30 dakika süreyle klemplenerek kapatılır (15).

2- Sıçanlarda iki damar oklüzyonu + hipotansiyon modeli: İki taraflı ana karotislerde geçici oklüzyon ve eş zamanlı olarak, kanın geri alınması yoluyla 50 mmHg düzeyinde hipotansiyon yapılır (16).

3- Gerbillerde iki damar oklüzyon modeli: Bu modelde vertebral arterler gelişmediğinden, her iki karotisin geçici oklüzyonu, Will's poligonunda

dolaşım yetersizliği oluşturarak beyin iskemisine neden olur (17). Yukarıda adı geçen üç modelde iskemi oluşumu, kan akımı ve metabolizma ölçümünün yanı sıra histopatolojik çalışmalar ile kanıtlanmıştır (15–18).

2.2.1.1. BEYİNİ BESLEYEN ARTERLER

Beyin iskemisi modellerinin anlaşılması için beynin damarlanmasını bilmek önemlidir. Kalp debisinin yaklaşık olarak beşte birini beyin dokusu alır ve dakikada 800 mL kadar kan akımı olur. Beyin temel olarak iki taraflı arteria karotis interna ve arteria vertebralis ile bunların oluşturduğu *circulus arteriosus cerebri*'den (Willis poligonu) ıkan arterler tarafından kanlandırılır. Arteria karotis interna boyun bölgesinde kanalis karotikustan geçerek kranium boşluğuna girer. Bu arter beyin içine bol miktarda dallar verir. Arteria vertebralis ise arteria subclavianın birinci parçasından çıkar. Altıncı servikal vertebradan itibaren processus transversuslardaki foramen transversarumların içinde yukarı doğru yükselir, foramen magnumdan geçerek kranyum boşluğuna girer. Özellikle beynin arka kısımlarını besleyen dallar verir. Kranyum içinde ponsun alt kenarı hizasında iki vertebral arter birleşerek arteria basillarisini oluşturur. Bu arter bir süre devam ettikten sonra cisterna interpedinkularis içinde iki taraflı arteria karotis internaların dallarıyla birleşerek Willis poligonunu oluşturur. Bu yapıyı oluşturan arterler, arteria cerebri anterior, arteria cerebri media, arteria cerebri posterior, arteria communicantes anterior, arteria communicantes posteriordur. Beyin damarlanması Şekil 1'de gösterilmiştir (19).

2.2.1.2. DÖRT DAMAR OKLÜZYON YÖNTEMİ

Dört damar oklüzyon uygulamasında, hipokampus CA1 bölgesi nöronlarında seçici nöronal zedelenme görölür. Bu gelişme iskemiyi takiben 48–72 saat içinde olur ve gecikmiş nöronal ölüm ile sonlanır. Bu modelde gerbillerde 3 dakika, ratlarda 10 dakika iskemi uygulanmasıyla hipokampal zedelenme gelişir. Bu zedelenmenin, mikroglia ve astrositleri aktive ettiği gözlemlenmiştir. İskemiyi takiben 20–30 dakika içinde stratum ve kortekste de nöronal hasar görülebilir. Stratumdaki nöronal hasar temel olarak dorsolateral bölgede oluşur ve orta düzeyde dikensi striatal nöronları etkiler.

Kortekste esas olarak hasar 3. 5. ve 6. tabakada oluşur (20). Dört damar oklüzyon modelinde iskeminin süresinin yanı sıra, tekrarlamasının da nöronal zedelenmeyi artırdığı gösterilmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada 10 dakikalık iskemi süresi 2 ve 3 defa tekrarlanmıştır. Çalışma sonunda özellikle sekiz kollu labirent sınavında ikinci tekrarlamayla başarının düştüğü ve apopitozise bağlı hücre ölümünün geliştiği gösterilmiştir. Üçüncü tekrarlamayla ise fazladan başarının bozulmadığı görülmüştür. Bu veriler eşliğinde bir saat ara verilerek iki defa 10 dakikalık iskemi uygulanması, bellek bozukluğu için uygun bir model olarak kullanılmakta ve tekrarlayıcı geçici tüm beyin iskemisi tanımını almaktadır (4).

2.2.2. KOLİNERJİK FONKSİYON BOZUKLUĞU MODELLERİ

Kolinerjik sistemde nöronal zedelenme ve asetilkolin azalması ile bellek bozukluğu arasında pozitif bir ilişki söz konusudur. Bazal önbeyin kolinerjik nöronlarının zedelenmesi bellek bozukluklarıyla giden hastalıkların erken evrelerinde oluşur ve özellikle bilişsel fonksiyon kayıpları ile yakından ilişkilidir (21). Akut olarak kolinerjik nöronlara elektrokoagülasyon uygulanması, fimbria veya fornix çapraz kesisi, nonspesifik eksitotoksinlerin veya kolinotoksin ve AF64A gibi kolinerjik sisteme özel bazı toksinlerin verilmesi kolinerjik aktiviteyi belirgin ölçüde azaltır. Bu işlemlerin uygulandığı deney hayvanlarında demans ve AH'nin kolinerjik sistem ile ilişkili belirtilerinin taklit edilmesi olasıdır (14). Nöronal zedelenme çalışmaları için daha yeni bir yaklaşım özel sitotoksinlerin immün hedeflere uygulanmasıdır (22). Kemirgenlerin diyetlerine bir kolin türevi olan N-aminodeanol eklenmesi zamanla santral kolinerjik aktivasyonda azalmaya neden olur (23).

2.2.3. NÖROTOKSİK MADDELERLE İLİŞKİLİ MODELLER

Beyin içine amiloid beta peptidin (A β) akut enjeksiyonu veya sürekli infüzyonu, nörodejenerasyona ek olarak öğrenme ve bellek bozukluğu ile karakterize beyin fonksiyon bozukluklarına neden olur (24, 25). A β 'nin öğrenme ve bellek üzerine etkileri ilk olarak farelerde çalışılmıştır (26). Bunu izleyen birçok çalışmada da A β (1–40), A β (1–42) ve A β (25–35) peptid parçalarının kemirgenlerde öğrenme ve bellek kayıplarına neden olduğu

gösterilmiştir. A β 'nin in vivo nörotoksitesi ibotenik asit ile veya bir sistein proteaz inhibitörü olan *leupeptin* ile birlikte enjekte edildiğinde artar (27–30). Beyne A β enjeksiyonu, insanlardaki AH'de olduğu gibi kemirgenlerde de mikrogial aktivasyon ve inflamatuvar cevaplar oluşturur. AH'nin belli bir süreç içinde gelişimini taklit etmek için mini ozmotik pompa yardımı ile intraserebroventriküler olarak kontrollü ve sürekli A β infüzyonu tekniği de kullanılan yöntemler arasındadır (31–33). Beyne direk olarak A β verilmesiyle bellek bozukluğu oluşturma modeli halen laboratuvarımızda bir çalışma amacıyla uygulanmaktadır ve ilk denemelerde sıçanlarda davranışsal olarak yakın bellek bozukluğu görülmüştür.

2.2.4. TRANSGENİK MODELLER

Kalıtsal AH ile ilişkili amiloid prekürsör protein V717F mutasyonunu şifreleyen bir insan mini geni taşıyan fareler oluşturulmuştur. Bu farelerin beyinlerinde AH'de de gözlenen ekstrasellüler nitelikli tioflavin S-pozitif A β tortuları, nörotik plaklar, sinaptik kayıplar, astrositlerde ve mikrogialardaki zedelenmeler ortaya çıkmaktadır (34). A β tortularının oluşumunda Apolipoprotein E (ApoE) geninin rolünü incelemek için ApoE geni ortadan kaldırılmış fareler oluşturulmuştur. ApoE geni yokluğunda A β tortuları anlamlı ölçüde azalırken, amiloid prekürsör protein ekspresyonu veya A β oluşumu değişmemiştir. Bu durum amiloid tortularının oluşumunda ApoE geninin katkısına işaret etmektedir (35). Parkinsonizm ile ilişkili olan kromozom 17, tau geni ile de ilişkilidir. Özellikle farelerde tau geni mutasyona uğratılarak AH'nin bazı belirtilerini gösteren transgenik fare modelleri oluşturulmaya başlanmıştır. İnsan 17. kromozomunun ilgili birimini içeren mutant tau transgenik fareler ve insan doğal tip (*wild type*) tau transgenik fareler bunlara örnek gösterilebilir (36).

2.2.5. NÖROFİBRİLER YUMAKLARLA İLİŞKİLİ MODELLER

Nörofibriler yumaklara benzer nöropatoloji gösteren AH modelleri uygulamak için farmakolojik veya transgenik yöntemler kullanılmıştır. Nörofibriler yumak bir çift sarmal filament ile bununla ilişkili hiperfosforile edilmiş tau proteinlerinden oluşan düz filamentlerden ibarettir. Hiperfosforile

olmuş tau potansiyelize edilmiş kinaz aktivitesi aracılığıyla (37) veya inhibe edilmiş fosfataz aktivitesi aracılığıyla in vitro olarak indüklenebilir (38).

2.2.6. PRESENİLİN İLE İLİŞKİLİ MODELLER

Presenilin1 geninde oluşan mutasyonlar erken başlayan kalıtsal AH'nin %50 gibi yüksek bir oranında bulunur (39, 40). Transgenik farelerin insan mutant presenilin1 veya presenilin2 geni ile ileri ekspresyonu sonucu presenilinlerdeki bozukluklara bağlı AH belirtilerinin bazılarını sergileyen fare modelleri oluşturulmuştur (14). Mutant presenilin1 ile ileri gen ekspresyonu fare beyinde A β (1–42) düzeyinde belirgin artışlara neden olur. Presenilin1 ile ilgili A β (1–42) artışları doğal tip transgenik farelerde görülmezken (40), presenilin2 ile ilgili artışlar doğal tip farelere özgüdür (41).

2.2.7. YAŞLI PRİMATLAR ÜZERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Yukarıda anlatılan modeller sık kullanılmakla birlikte, özellikle hastalığın davranışsal boyutunun insanlardaki bellek bozukluğuna yakın ölçüde değerlendirilebilmesine olanak sağlamazlar. Buna karşın insana en yakın canlılar olan primatlar, bellek bozukluklarının gerek davranışsal gerekse nöropatolojik belirtilerini insandakine en yakın ölçüde sergiler (42, 43). Yaşlı Rhesus maymunların parahipokampal girus, hipokampus, inferior temporal korteks, ventromedial prefrontal korteks, medial talamus ve bazal ön beyin kolinerjik sistemlerinde oluşan zedelenmelere bağlı olarak ciddi bellek problemleri yaşadığı gözlenmiştir. Bu bölgelerden biri veya birkaçının genç maymunlarda lezyona uğratılması da benzer etkiye neden olmaktadır (44). Yaşlı maymunlar; senil plaklar, diffüz A β (1–40) ve A β (1–42) birikimleri, nörofibriler yumaklar ve nöron kayıplarını AH'dekine çok benzer şekilde sergilerler. Nöron kayıpları özellikle korteksin kolinerjik ve monoaminerjik sistemlerinde belirgindir. Yaşla orantılı olarak kolin asetiltransferaz aktivitesi azalmakta ve hem muskarinik hem de nikotinik reseptörlerin transmiyere bağlanma yetenekleri zayıflamaktadır (45). İnsana en yakın model olması kuşkusuz primat çalışmalarının önemini artırmaktadır. Ancak primatlar üzerinde araştırma yapmak kemirgenlere göre bazı olumsuzluklara da sahiptir. Oldukça düşük hızda üremeleri, beslenmelerinin ve yaşam

ortamlarının standardize edilebilmesinin çok daha zor ve pahalı olması ve özel yetiştirilmiş bakıcı ve uzmanlara gereksinim duyulması gibi nedenlerle primatlarla araştırma yapmak oldukça zordur (42).

2.2.8. DİĞER YÖNTEMLER

Alüminyum ile İntoksikasyon: AH hastalarının beyinlerinde oluşan senil plakların çekirdeklerinde alüminyum silikat birikintileri gözlenmiştir. Alüminyum, farelerin, sıçanların ve tavşanların içme sularına veya yemlerine eklenerek en az altı ay süre ile verildiğinde AH'nin bazı nöropatolojik ve davranışsal belirtileri ortaya çıkabilmektedir (46).

2.3. İSKEMİ-REPERFÜZYON ZEDELENMESİ

2.3.1. HÜCRESEL ZEDELENME

Hücre, değişen ortam şartlarına göre yapısını ve işlevini sürekli olarak değiştirebilir ve uyaran belli bir dereceye çıkana kadar normal dengesini koruyacak uyumu gösterebilir. Ancak uyum sınırlarını aşan veya yeterince uyum zamanı olmayan şiddetli ve ani uyaranlar olduğunda, hücrede zedelenme gelişmeye başlar. Hücresel zedelenme belli bir noktaya kadar geri dönüşümlüdür. Fakat uyarı devam ederse ya da şiddeti artarsa geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi olur ve hücre ölümüne ilerler. Hücresel zedelenmesinin en son aşaması hücre ölümüdür. Hücre ölümü iki tiptir:

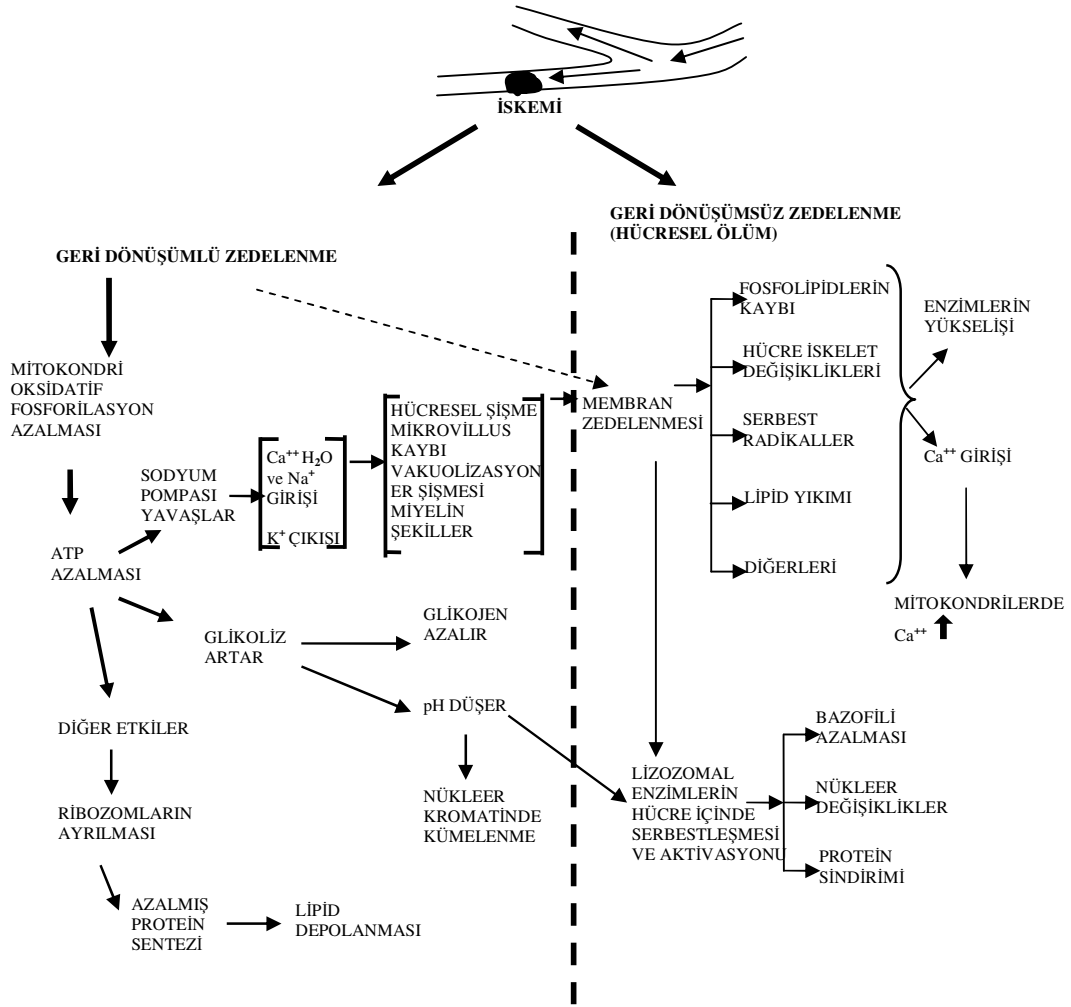
1—Nekroz; hücresel zedelenme sonucu en sık görülen kontrolsüz ölüm tipidir. Ölü hücre çevreye zararlı toksik maddeler ve sindirici enzimler yayar.

2—Apopitozis; hücre içi kontrol mekanizmaları ile hücrenin programlı ölümü sonucu gelişen ölüm tipidir. Çevreye zarar vermez. Apopitozis kısaca programlanmış hücresel ölüm olarak tanımlanmaktadır. Bu zedelenme mekanizması öncelikle iskemi olmak üzere birçok nöronal patolojide görülmektedir. Aslında bu olay normal fizyolojik bir durumken, birçok patolojide aşırı ve ölçüsüz boyutlara ulaşır. Nekrozla gerçekleşen hücre ölümü ise stres reaksiyonlarına bir yanıt niteliğindedir ve oldukça hızlı bir olaydır. Sonuçta ortaya çıkan uyarı, hücre ölümüne direk olarak neden olur. Nekroz, her zaman patolojik bir duruma ikincil olarak görülür ve hücrenin iskemi, travma, fiziksel ya da kimyasal zararlı etkenler gibi karşı

koyamayacağı kadar zararlı bir uyarı sonucunda görülür. Apoptozisin tersine nekrozda membran bütünlüğü erkenden kaybolmaktadır. Hücre zedelenmesinin ana nedenleri hipoksi, kimyasallar, mikroorganizmalar, fiziksel etkenler, immün mekanizmalar, genetik defektler, yaşlanma olarak sıralanabilir. Akut iskemik zedelenmeyi izleyen olaylar dizisi insanlarda, deney hayvanlarında, doku kültürlerinde incelenmiştir (47–49).

2.3.2.GERİ DÖNÜŞÜMLÜ-DÖNÜŞÜMSÜZ HÜCRE ZEDELENMELERİ

İskeminin hücreye en ciddi etkisi hipoksi oluşumudur. Hipokside hücrenin ilk etkilenen kısmı hücresele aerobik solunumdur. Hücrelerde oksijen azaldığında, oksidatif fosforilasyon kaybolur, ATP üretimi azalır ve sodyum pompası yavaşlar. Sodyum hücre içinde, potasyum hücre dışında birikir. Sodyum artışı osmolariteyi artırarak akut hücresele şişmeye neden olur. ATP azalmasının diğer sonucu olarak, enerji açığını kapatmak üzere oksijensiz solunum hızlandırılır. Glikolizin artmasıyla birlikte laktik asit ve inorganik fosfatlar artarak hücre içi pH'yı düşürürler. Daha sonra ribozomlar granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılarak protein sentezinin azalmasına neden olurlar. Hipoksinin devam etmesiyle hücrenin ana hatları bozulmaya başlar, mikrovilluslar kaybolur ve hücre yüzeyinde kabarcıklar oluşmaya başlar. Osmotik düzenleme kaybolduğundan mitokondri ve endoplazmik retikulum şişer. Bu aşamaya kadar gerçekleşen olaylar geri dönüşümlüdür ve tekrar oksijenlenme başlarsa bu bozulmalar düzelir. İskemi devam ederse geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Zedelenmenin geri dönüşümsüz oluşunda iki fikir ileri sürülür: a) Belirgin ATP azalmasına sebep olan mitokondriyel işlev bozukluğunun geri dönmemesi. b) Membran fonksiyonunda ileri derecede bozulmalar meydana gelmesi. Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinin patogeneğinde, sitoplazma membranının zedelenmesi ana olaydır. Bu membran zedelenmesine çeşitli biyokimyasal mekanizmalar katkıda bulunur. Sitoplazma membran bütünlüğünün kaybı, kalsiyumun hücre dışından hücre içine girmesine yol açar. Yeniden oksijenlenme sonrası, mitokondri tarafından daha fazla kalsiyum içeri alınır ve kalsiyumun toksik etkisiyle hücresele enzimler inhibe olur, proteinler denatüre olur. Kalsiyumun hücre içine girmesiyle mitokondri, lizozom ve diğer



Şekil 1: İskemi-reperfüzyon zedelenmesi, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi mekanizmaları (47).

membranların permeabilitesi değişir. Bunu enzimlerin sitoplazmaya sızması, bunu da asit hidrolazların aktivasyonu takip eder. Bu enzimlerin (RNAazlar, proteazlar, katepsinler) aktivasyonu, hücresel yapıların enzimatik sindirimine yol açar. Hücre zedelenmesindeki olaylar Şekil 1’de özetlenmiştir (47, 50).

2.3.3. İSKEMİ-REPERFÜZYON ZEDELLENMESİ MEKANİZMALARI

İskemik dokulara kan akımının tekrar sağlanması, geri dönüşümlü zedelenmeye uğramış hücrelerin iyileşmesiyle sonuçlanırken geri dönüşümsüz zedelenmeye uğramış olanları etkilemez. Bununla birlikte iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, çeşitli hücreler kan akımının

yeniden başlamasından sonra da ölüme gidebilir (47, 48). İskemi-reperfüzyon zedelenmesi için çeşitli fikirler ileri sürülmüştür:

1- ATP hücre içinde çoğu sentez ve indirgeyici reaksiyonlar için gereklidir. Membran transportu, protein sentezi, lipogenez ve fosfolipid dönüşümü için gerekli olan deasetilasyon-reasetilasyon olaylarında rol oynar. ATP, 2 yolla oluşur: a) Memelilerde esas yol, mitokondride elektron transport sistemiyle oksijen redüksiyonu sonucu, ADP oksidatif fosforilasyonudur. b) Glikolitik yol ile glikojenin hidrolizi sonucu veya vücutta bulunan glikozun kullanımıyla, oksijen yokluğunda ATP oluşturulmasıdır. ATP sentezinin azalması, iskemik ve toksik zedelenmesin genel sebebidir. Reperfüzyon sırasında ATP üretimi yetersiz kalır (48, 50).

2- Sitozol ve mitokondride kalsiyumun aşırı toplanması, reperfüzyon zedelenmesinde ileri sürülen önemli mekanizmalardan biridir. Sitolik serbest kalsiyum düzeyi ekstrasellüler düzeylerle karşılaştırıldığında oldukça düşük yoğunluktadır. İntrasellüler kalsiyumun çoğu mitokondride ve endoplazmik retikulumda tutulur. İskemi sırasında plazma zarından hücre içine kalsiyum geçişi artar. İskemi, mitokondri ve endoplazmik retikulumdan kalsiyumun salınımına yol açarak sitozolde kalsiyum yoğunluğunu erkenden artırır. Artmış olan kalsiyum, potansiyel olarak zararlı hücrel etkileri olan enzimleri aktive eder. Kalsiyum ile aktive olduğu bilinen enzimler fosfolipazlar (membran zedelenmesine yol açar), proteazlar (hem membranı hem de iskelet yapıda yer alan proteinleri yıkar), ATPazlar (ATP yıkımını artırır) ve endonükleazlardır (kromatini parçalar) (47, 50).

3- Reperfüzyon zedelenmesinin en önemli mekanizmalarından biri de oksijen kökenli serbest radikallerin birikimidir. Serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ile hücre membranında zedelenme oluşturur. Reoksijenasyon sırasında parankimal ve endotelial hücrelerden, bölgeye gelen lökositlerden ortaya çıkan bu serbest oksijen radikallerinin artmasıyla zedelenme daha da artabilir. Mitokondri permeabilitesi artar ve mitokondride enerji üretimi engellenir. Dolaşımdaki lökositler reperfüze dokuya toplanır ve sitokin üretirler. Bu inflamasyon daha fazla zedelenmeye neden olur. Hücrelerde, serbest radikalleri kaldırmak için birçok mekanizma gerçekleştirilmiştir. Serbest radikallerin inaktivasyonuna katkıda bulunan

maddeler içinde, antioksidanlar (E vitamini, askorbik asit, glutatyon) ve çeşitli enzimler (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz) yer alır (49).

4- Diğer mekanizma nitrik oksit (NO) yapımının ve endotel fonksiyonlarının bozulmasıdır. NO; endotel hücreler, makrofajlar ve diğer bazı hücreler tarafından salınan vasküler tonusu regüle eden önemli endojen vazodilatördür. İskemi-reperfüzyonda NO üretimi bozulur. İskemi sırasında oksijen yokluğunda NO sentezi engellenir. Azalmış NO üretiminin bölgesel kan akımında bozulmaya ve nekroza katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (47). Öte yandan yeniden oksijenlenme sonrasında dokuda NO yapımı artar. Bu artışın, hidroksil radikali yapımını artırarak serbest oksijen radikali kaynaklı hücresel zedelenmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu NO artışının doku kanlanmasını artırarak hücreleri zedelenmeden koruması üzerinde de durulmaktadır. Hücre zedelenmesinde NO'nun etkisi konusunda çelişkili görüşler vardır (49).

2.3.4. İSKEMİNİN NÖRONAL HİSTOPATOLOJİSİ

İskemik nöronal değişiklikler dört evrede incelenmektedir: 1. evre perikaryumda vakuollerin görüldüğü mikrovakuolizasyon dönemidir. Nükleus normal ya da hafif küçülmüş olup nükleolus normal görünümündedir. Hücre büyüklüğünde belirgin farklılık gözlenmez. Mikrovakuollerin çoğunluğu şişmiş mitokondrilerdir. Solunum ve oksidatif fosforilasyonundan sorumlu enzim kompleksleri mitokondride yer aldığından iskemide en erken etkilenen bölümlerdendir. 2. evrede hücre şişer, sitoplazmasında koyu boyanan protein içerikleri artar, nükleus üçgen şeklini alıp küçülerek kenara itilir. 3. evrede hücre gövdesinde ve hücrenin çevresinde boşluklar oluşur. Hücrede membran zedelenmesi gelişmiştir. 4. evrede nöron homojen bir görünüm alır parçalanır. İlerleyen dönemlerde fagosite edilerek ortadan kaldırılır (47, 49).

2.4. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş tek bir elektron bulunan kimyasal türevlerdir. Bu durumda radikal ileri derecede reaktiftir ve protein, lipid, karbonhidrat gibi organik ve inorganik kimyasal maddelerle, özellikle hücrede nükleik asitler ve membranlarla tepkimeye girer (47). Bugün

için serbest oksijen radikalleri yerine reaktif oksijen türevleri (*reactive oxygen species*: ROS) terimi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu terim hem süperoksit, hidroksil gibi oksijen içeren radikalleri hem de aslında radikal olmayan ancak tepkimeler sonucu oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen peroksit, ozon, hipoklorik asit gibi molekülleri içine almaktadır (51). Başlıca ROS'lar Tablo–1'de gösterilmiştir. ROS'lar termodinamik stabilite kazanmak için yakınında bulunan diğer moleküllerde elektron ya da hidrojen atomlarını serbestleştirmeye çalışarak bu molekülleri aktif radikal haline getirmektedir. Oluşan serbest radikaller, hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken hücre dışı kompartmana da geçerek uzak etkiler de oluşturabilmektedir (52). ROS'lar doğal oksijenden, Fenton veya Haber-Weis reaksiyonlarından, ksantin oksidaz enziminden, katekolaminlerden, NO'dan, eikasonoid metabolizması veya aktive olmuş lökositlerden ortaya çıkabilmektedir (53). ROS'lar dokuda doğrudan tayin edilebildiği gibi doku ve kanda ROS'ların oluşturduğu ürünler de ölçülebilir. ROS'lar yarı ömrü çok kısa ve kararsız bileşikler olduğundan dokuda kantitatif ölçümleri zordur. Elektron spin rezonans spektroskopisi, ROS'ların tayinine olanak veren tek direkt yöntemdir. Direkt ölçüm yöntemleri zor olduğundan daha çok reaksiyon ürünleri ölçülür veya inhibitör deneyleri tercih edilir. ROS'ları ölçmek amacıyla pek çok lipid türevleri ölçülebilir. Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak aldehidler (hekzanal, malondialdehid-MDA, 4-hidroksinonenal), tiobarbitürik asit reaktivitesi, konjuge dienler ve az miktarda oluşan etan ve pentan, ayrıca hidroperoksidler kullanılır. Bunlar içinde en sık MDA kullanılır ve asidik ortamda tiobarbitürik asitle renk oluşturmasından faydalanılır (54).

Tablo–1: Reaktif Oksijen Türevleri (51)

| Radikaller | Radikal Olmayanlar |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Süperoksit radikali (O_2^-) | Hidrojen peroksit (H_2O_2) |
| Hidroksil radikali (OH^-) | Lipid peroksit ($LOOH^-$) |
| Alkoksil radikali (RO^-) | Hipoklorik asit ($HOCl^-$) |
| Peroksil radikali (ROO^-) | Ozon (O_3) |

2.5. İSKEMİDE BELLEK BOZUKLUĞUNUN DAVRANIŞSAL YÖNÜ

Bellek bozukluğunun düzeyini sınamak amacıyla bazı davranışsal çalışmalar kullanılmaktadır. Davranışsal çalışmalar, tüm beyin iskemiyile davranışlar hiç etkilenmiş mi, seçici davranışsal yetenekler etkilenmiş mi, bu davranışsal bozukluklar geçici mi sorularına yanıt arar. Özellikle nöroproteksiyon çalışmalarında yapılan davranışsal çalışmaların morfolojik çalışmaları tamamladığı gösterilmiştir. Tüm beyin iskemisi, öğrenme ve bellek işlevlerinde bazı davranışsal bozukluklara yol açar. Öğrenme ve bellekteki bozukluklar oldukça uzun süreli görünürken bilinç, motor ve duysal kapasitedeki bozukluklar sadece 24–48 saat kadar etkilenir. Tüm beyin iskemisinin neden olduğu bellek bozukluğunu sınamak amacıyla en sık kullanılan yöntemler sekiz kollu labirent ve morris su tankı çalışmalarıdır (6).

Sekiz kollu labirent (*Eight arm radial maze*): Bu yöntemle uzak ve yakın bellek sınanabilir. Hayvan tek yem konulmuş yöntemde yem konulmamış kola girerse bu uzak bellek bozukluğunu gösterir. Yakın bellek bozukluğu ise, her kola yem konulan yöntemde daha önce girdiği kola tekrar girmesiyle oluşur (6). İskemik hayvanlar uzak ve yakın bellek bakımından önemli ölçüde hata yaparlar. Uzak bellek çalışmasında, iskemik ve kontrol hayvanlar arasında iskemi sonrası 70. günden sonra belirgin farklılık kalmamıştır. Yakın bellek için ise gruplar arasında farklılık geçerli kalmış gibi görünmektedir (55, 56). Korelasyon analizi yapıldığında, bellekteki hata sayısı ile hipokampus CA1 bölgesindeki piramidal hücre sayısı arasında ters ilişki görülür. (1, 6).

Morris su tankı (*Morris water maze*): Uzaysal (spatial) öğrenme ve bellekteki bozulmayı kolayca ölçebilen, nöronal zedelenmeyi azaltan nöroprotektif çalışmaların ayrıca fonksiyonel iyileşmeye yol açıp açmadığını araştırmada etkili yöntemlerden biridir (57).

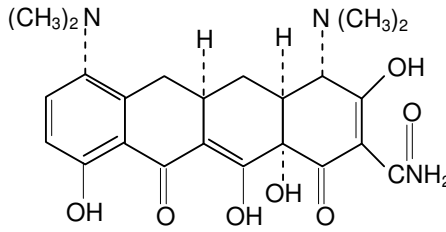
2.5.1. DİĞER NÖROLOJİK DAVRANIŞ BOZUKLUKLARI

Motor ve duysal fonksiyonları değerlendirmek için yapılan bir nörolojik skora yapılmıştır. Normal sıçanlar bu değerlendirmede 20 puan alırken, bir saatlik iskemiden sonra skor ortalama olarak %50 azalmıştır. İskemi

sonrası 3. saatte bu skorda belirgin azalma gözlenmiştir. İskemiden sonraki 1. 2. ve 3. günde iskemi öncesi skora göre bir farklılık kalmamıştır. Bu sonuçlar temel alındığında, kemirgenlerde tüm beyin iskemisi kalıcı motor ve duyuşsal nörolojik bozukluklara yol açmıyor gibi görünmektedir. (6, 58)

2.6. MİNOSİKLİN

Minosiklin ikinci kuşak yarı sentetik tetrasiklidir. Antibakteriyel etkinliği ile klinikte kullanılmaktadır. Lipofilik özelliği yüksektir (59, 60). Moleküler ağırlığı 493,94'tür. Minosiklinin kimyasal yapısı Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2: Minosiklinin kimyasal yapısı.

2.6.1. FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLERİ

Emilim: Minosiklinin oral biyoyararlanımı %95–100 arasındadır. Dozun artırılmasıyla biyoyararlanımda artma olmaz. 150 ve 300 mg'lık oral preparatlarının alınmasından ortalama 3 saat sonra maksimum serum konsantrasyonuna ulaşılr ve sırasıyla 2 ve 4 mg/L olur. 100 mg minosiklinin 12 saat arayla uzun süre kullanılması sonrasında kararlı durum konsantrasyonu 2,3 ile 3,5 mg/L arasında değişmektedir. Minosiklinin, sıçanlara 25 mg/kg dozunda i.v. verilmesinden 1 saat sonra beyinde saptandığı ve 2–4 saat arasında doruk (plazma düzeyinin %35'i) konsantrasyonuna ulaşarak, 8 saat boyunca birinci saatteki düzeyini koruduğu kaydedilmiştir. Minosiklinin insanlardaki beyin omurilik sıvısı konsantrasyonu da plazmanın %25-30'u kadardır (59–61).

Dağılım: Minosiklin yüksek lipofilik özelliğinden dolayı vücut dokularında oldukça iyi dağılır ve bu özelliğiyle en lipofilik tetrasiklin olarak bilinir. Dağılım hacmi 1,14–1,64 L/kg arasındadır ve plazma proteinlerine %70–80 oranında bağlanır (60, 61).

Metabolizma: Minosiklin büyük ölçüde karaciğerde biyotransformasyona uğrar. İdrarda ve feçeste üç tane inaktif metaboliti vardır. En önemli ve fazla bulunan metaboliti 9-hidroksi-minosiklin bileşiğidir. Diğer metabolitler ana molekülün 4. ve 9. pozisyonlarında demetilasyonlarıyla oluşurlar. Minosiklinin yarılanma ömrü 16–18 saattir (59, 60).

Atılım: Minosiklin ana bileşiğinin %8-12'si idrarla, %20-35'i fekal olarak atılır. Metabolitleri idrarla ve feçesle atılır. Minosiklinin renal klirensi 0,13 mL/dk/kg'dır. Minosiklinin toplam klirensi 1,05±0,2 mL/dk/kg'dır. Karaciğerde metabolize olduktan sonra kısmen safra içine atılır. Safra içerisindeki ilaç bileşikleri daha sonra intestinal lümenine ulaşırlar ve polivalent metal bileşikleriyle şelat oluşturarak inaktive olurlar. Bu şelat türevleri suda çözünmediğinden absorbe edilemezler ve feçesle atılırlar. İlacın atılımı yaş, cinsiyet, gebelik ve laktasyon, fizik egzersiz gibi durumlardan etkilenebilmektedir (59–61).

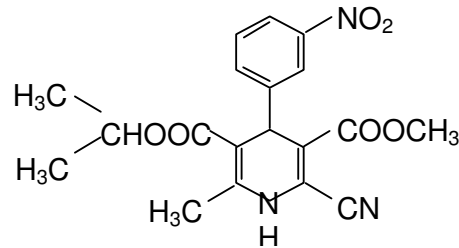
2.6.2. MINOSİKLİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ

Son yıllarda yapılan çalışmalar, minosiklinin antimikrobiyal etkilerinin dışında bazı nöroprotektif etkilerinin de olduğunu göstermiştir. Tüm beyin iskemili kobaylarda bu ilacın hipokampal nöronlarda nöroprotektif etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bölgesel beyin iskemili hayvanlarda infarkt alanında anlamlı bir küçülme gözlenmiştir. Minosiklin, hücre kültürlerinde glutamat aracılı nörotoksititeyi de azaltmıştır. Beyin iskemisinin bölgesel modelinde, minosiklin ve orta derecede hipotermiye kombine edildiği çalışmada, kombinasyon tedavisi daha fazla etkinlik göstermiştir. Kemirgenlerde neonatal hipoksik-iskemik beyin zedelenmesi modelinde nöroprotektif etkinlik elde edilmiştir (62–64). Minosiklin bazı epilepsi modeli uygulanan deney hayvanlarında da denenmiş ve antiepileptik etkinlik gösterdiği saptanmıştır (2). Minosiklinin, Huntington hastalığının R6/2 transgenik fare modelinde hastalığın daha yavaş seyretmesini sağladığı bildirilmiştir (65). Bunun aksine yine aynı modelde, minosiklin tedavisinin rotarod başarısına ya da huntingtin birikimine belirgin bir olumlu etkisi

olmadığı da iddia edilmiştir (66). Minosiklin, Parkinson hastalığı modelinde mikrogliyal aktivasyonu belirgin olarak inhibe etmiş, NO aracılı nörotoksititeyi direkt olarak inhibe etmiş ve dopaminerjik nöronlar üzerine nöroprotektif etkinlik göstermiştir (67, 68). Deneysel travmatik beyin zedelenmesi modelinde de nöronları ölümden korumuştur (69). Omurilik zedelenmesi oluşturulan farelerde, minosiklin nöronal doku zedelenmesini önleyerek, belirgin olarak aksonal bütünlüğü ve davranışsal yetenekleri korumuştur (70). Minosiklin, yine omurilik zedelenmesi sonrası mitokondriyal sitokrom-c salınımını inhibe etmiş ve zedelenmeye bağlı oluşan işlev yetersizliğini azaltmıştır (71). Nöron kültürlerinde düşük doz iyonize radyasyon verilerek oluşturulan apoptotik süreçte, bu ilacın nöronları apoptozisten koruduğu kaydedilmiştir (72).

2.7. NİLVADİPİN

Nilvadipin [5-Isopropyl 3-metyl (4*RS*)-2-cyano-1,4-dihidro-6-metyl- 4-(3-nitrophenyl) pyridine-3,5-dicarboxylate], dihidropiridin yapısında kalsiyum kanal blokeridir. Moleküler ağırlığı 358,58'dir. Kalsiyum kanallarından L-tipi olanlara seçici ilgi gösterir. Damar düz kaslarında bu etkisiyle vazodilatasyon yapar. Kalsiyum kanal blokeri grubu antihipertansif olarak kullanılmaktadır. Terapötik doz aralığında kalbin ileti sistemi üzerine belirgin bir etkisi yoktur. Deneysel çalışmalarda damar sertliğinden koruyucu özelliğinin olduğu gösterilmiştir (73). Nilvadipin 4, 8, 12, 16 ve 20 mg oral olarak tek doz verildiğinde herhangi bir yan etki görülmemiştir (74).



Şekil 3: Nilvadipinin kimyasal yapısı.

2.7.1. FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLERİ

Emilim: Yoğun ilk geçiş metabolizması nedeniyle, solüsyon halindeki nilvadipinin mutlak biyoyararlanımı %14–19 arasındadır. Değiştirilmiş salınımlı mikropellet kapsülün göreceli biyoyararlanımı ise %10–13 kadardır. Emilimi sıfır derece kinetiğine göre gerçekleşir. 6 gün boyunca günde 2 defa p.o. olarak 4 mg alındığında, plazma kararlı düzeyi 1,0 ng/mL olarak bulunmuştur. Plazmada optik enantiomerleri saptanmıştır. Sirozu olan hastalarda nilvadipinin ilk geçiş metabolizması önemli derecede azaldığından, bu hastalardaki biyoyararlanımı 2–3 kat artabilmektedir. Hafif ve orta dereceli karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması ile tedavi sürdürülebilir (73–78).

Dağılım: Yüksek lipid/su partitasyon katsayısı nedeniyle nilvadipin dokulara hızlı ve iyi dağılır. Tek doz uygulamasında dağılım hacmi 1 L/kg iken, tekrarlanan dozlardan sonra bu değer 3,9 L/kg'dır. 8 günlük kullanım sonrasında kararlı durum konsantrasyonu değeri 8 mg dozunda 2,2–2,9 ng/ml, 16 mg dozunda 6,5–10,6 ng/ml'dir. Kararlı plazma düzeylerine 4–5 günlük kullanım sonrasında ulaşılır. Nilvadipin plazmada HDL, LDL ve okside LDL'ye nonspesifik olarak bağlanır. Hayvan deneylerinde nilvadipinin plasenta ve beyin-omurilik sıvısına geçtiği gösterilmiştir (74, 79–81).

Metabolizma: Nilvadipinin tamamına yakını dihidropiridin halkasının oksidasyonu olmak üzere, karaciğerde farmakodinamik açıdan inaktif metabolitlere yıkılır. Yarı ömrü 15–20 saattir. Nilvadipin doza bağlı lineer farmakokinetik özellik gösterir. Kinetiğinde cinsiyet farkı gözlenmemiştir. Karaciğerde metabolize olduğundan dolayı, mikrozomal enzim indüksiyonu yapan ilaç ve maddelerle nilvadipinin biyoyararlanımının düşmesi beklenmektedir. Bir çalışmada CYP3A4 indüksiyonu yapan rifampisin ile birlikte kullanıldığında, nilvadipinin biyoyararlanımı düşmüştür (73, 79, 82).

Atılım: Nilvadipinin %70–80'i idrar, geri kalanı feçes yoluyla atılır. Oral dozun tamamına yakını metabolize edildiğinden, aktif formu feçes ve idrarda ancak %0,2 oranında saptanır. Sistemik klirensi 10,6±1,2 mL/dak/kg'dır. Hafif

ve orta şiddetli böbrek yetmezliğinde nilvadipinin farmakokinetiği belirgin oranda etkilenmez (73, 79, 83).

2.7.2. NİLVADİPİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ

Nilvadipin nöroprotektif etkinliği hakkında bir süredir yoğun olarak deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Beyin iskemisi modellerinde nilvadipin hipokampal apoptozisi (1), ve beyinde infarkt alanını ve ödemi (84) anlamlı derecede azaltmıştır. Ayrıca nilvadipin iskemide görülen mikrotübül associated protein-2 (MAP2) doza bağlı olarak inhibe ederek, anlamlı derecede nöroprotektif etkinlik göstermiştir (85). Nilvadipin, selektif olarak hipokampus CA1 bölgesi nöronlarının yavaş ve hızlı akımlı L-tipi kalsiyum kanallarını bloke etmiştir (86) ve aynı etkiyi hipokampal nöron hücre kültürlerinde de göstermiştir (87). Nilvadipinin hipokampustaki yaşlanmaya neden olan mekanizmaları bozarak, yaşlanmaya bağlı gelişen bellek bozukluğunu düzelttiği öne sürülmüştür (88). Nilvadipinin beyin kan damarlarının düz kaslarındaki kalsiyum kanallarını da inhibe etmesiyle, tek doz (89) ve kronik kullanımı ile (3) beyin kan akımını artırdığı gözlenmiştir. Nilvadipin bazı başka nöronal hastalıklarda denenmiş ve migren hastalarında profilaktik olarak kullanıldığında faydalı bulunmuştur (90). Ayrıca şizofreni tedavisinde de bazı iyileşmelere neden olduğu görülmüştür (91).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın davranışsal bölümü Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Davranışsal Farmakoloji Laboratuvarı'nda, deneysel bölümü Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Laboratuvarı'nda, biyokimyasal ölçümler ise Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan 27.09.2004 tarihinde 2004/63 sayılı etik kurul onayı alınmıştır ve tüm çalışma süresince deney hayvanları çalışma etiğine uyulmuştur.

Çalışmamızda 4–6 aylık, 220-300g ağırlığında 44 Wistar erkek sıçan kullanıldı (Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi), ancak seçim ve operasyonlar sonrasında toplam 29 sıçan deneye alındı. Sıçanlar kafeslere 5'erli gruplar halinde yerleştirildi. Deney hayvanlarının tamamı çalışma boyunca 22 ± 2 °C oda ısısında, 50 ± 5 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü bulunan bir ortamda takip edildi.

Deneye alınacak her sıçana sekiz kollu labirent yöntemi uygulanarak, sıçanlar rastgele olarak dört gruba ayrıldı:

1) Sham grubu (n=8): Operasyon öncesi 7 gün boyunca salin ($0,9\%$ NaCl) verilip vertebral arter koterizasyonu yapılarak, iki taraflı ana karotis arterleri etrafında gevşek bir düğüm atılan ancak arter klempini kullanılmayan grup.

2) İskemi-kontrol grubu (n=7): Operasyon öncesi 7 gün boyunca salin verilerek bu süre sonunda operasyon günü deneysel dört damar oklüzyon yöntemiyle tüm beyin iskemisi modeli uygulanan grup.

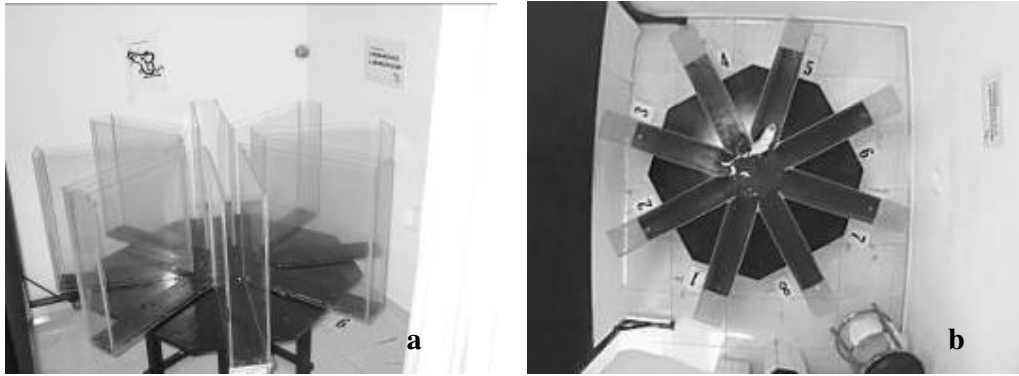
3) Minosiklin grubu (n=7): Operasyon öncesi 7 gün boyunca minosiklin verilerek bu süre sonunda operasyon günü deneysel dört damar oklüzyon yöntemiyle tüm beyin iskemisi modeli uygulanan grup.

4) Nilvadipin grubu (n=7): Operasyon öncesi 7 gün boyunca nilvadipin verilerek bu süre sonunda operasyon günü deneysel dört damar oklüzyon yöntemiyle tüm beyin iskemisi modeli uygulanan grup.

3.1. SEKİZ KOLLU LABİRENT UYGULAMASI

Deneydeki kullanılan sıçanların tamamına sekiz kollu labirent çalışması, tüm işlemlerden önce uygulandı. Bu çalışma için kullanılan aygıt daha önce belirtilen şekilde yapılmıştır (1).

Bu aygıt 24 cm çapında bir sekizgen tablanın tüm kenarlarına eklenmiş toplam sekiz adet kola sahiptir. Her kolun genişliği 10 cm, uzunluğu 50 cm'dir. Tüm kolların ve merkezdeki sekizgen tablanın tabanı siyah renkli suntalam malzemedен yapılmıştır. Zemin yarı mat, orta kayganlıktadır. Tüm kolların etrafı, 50 cm yüksekliğinde saydam-plastik (*pleksiglas*) duvarla çevrilmiştir. Bu haliyle tüm aygıt, 1 m çapında sekizgen bir tabla üzerine yerleştirilerek yerden 50 cm yükseltilmiştir. Her kola sırayla 1–8 arası numara verilmiştir. Her kolun uç kısmının ortasında, 3 cm çapında 1 cm yüksekliğinde metal, siyah renkli yem kapları konulmuştur (Şekil 4a).



Şekil 4: Deneyde kullanılan 8 kollu labirent aygıtı yandan (a) ve sinama sırasında üstten (b) görünümü.

Çalışmanın yapıldığı odaya, sıçanların görebileceği şekilde, sınama aygıtının kenarlarından 50 cm uzağa, görsel cisimler yerleştirilmiştir. Bu amaçla 20x30 cm boyunda 2 adet resim duvara monte edilmiş ve büyük bir tabure, bir dolap ve koyu renkli büyük bir paravan aygıtın yakınına yerleştirilmiştir. Aydınlatma olarak 4 adet 50 cm boyundaki floresan ışık aygıttan 2 m yukarıdan kullanılmıştır. Tüm çalışmalar boyunca bu çevre düzeni ve aydınlatma hiç değiştirilmemiştir. Tüm çalışmalar saat 09.00—13.00 arası yapılmıştır (Şekil 4b).

Sınama süresince sıçanlara kısıtlı yem verme yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle göre önce her sıçanın günlük tükettiği yem miktarı hesaplanmıştır. Bu miktar %10–15 azaltılarak, sıçanların günlük tartı takipleri de yapılarak, çalışma süresince sıçanların % 10–15 düzeyinde tartı kaybetmesi sağlanmıştır. Bu uygulama etik kurallarda belirtilen %20 yem kısıtlaması sınırının altındadır. Deney boyunca su kısıtlaması yapılmamıştır.

Tüm çalışma süresince her çalışmaya başlamadan önce, her kolun uç kısmındaki yem kaplarına 50–60 mg tek parça olarak, sıçanların severek yedikleri kahverengi şeker bırakılmıştır. Aynı şeker ön alıştırma bölümü süresince sıçanların kafeslerindeki yemleri arasına her hayvan başına 1 g olacak şekilde eklenmiştir.

Cihazdan 2m yukarıya, bir web kamera yerleştirilerek, tüm çalışma görüntüleri bilgisayara aktarıldı ve sıçanların her kolu ziyaretlerini “zaman - seçim sayısı – girilen kol numarası” üçlüsü olarak kayıt yapan bir yazılım (Amonra Stop Watch) kullanılarak veriler kaydedildi.

Sıçanların her kola girişleri bir seçim olarak kaydedildi. Her kola ilk girişleri doğru seçim (DS), herhangi bir kola ikinci ve daha sonraki tekrar girişleri ise yanlış seçim (YS) olarak değerlendirildi. Her çalışma turu 10 dakika ile sınırlandırıldı. Bir sıçan her 8 kolu da ziyaret ettiğinde 10 dakika beklenmeden, sınama başarılı olduğu sonlandırıldı. Sıçanların ilk 8 seçimi bu yöntemle değerlendirildi. Sekiz kollu labirent uygulaması, ön

alıştırma bölümü, öğrenme bölümü ve post operatif değerlendirme bölümü olmak üzere 3 bölüm olarak yapıldı.

3.1.1. ÖN ALIŞTIRMA BÖLÜMÜ

Bu bölümün amacı temel olarak deney hayvanlarının sınama aygıtına ve çevreye uyumunu sağlamaktır. Bu amaçla 3 gün boyunca her gün, günde 3 defa birer saat arayla, sıçanlar 5'li gruplar halinde aygıtta bırakıldılar. Bu işlemin her birine bir tur denildi. Her turda süre 10 dakika ile sınırlandırıldı. 3 günlük ön alıştırma bölümü bitiminde 1 gün ara verilerek öğrenme bölümüne geçildi.

3.1.2. ÖĞRENME BÖLÜMÜ

Bu bölümün amacı sıçanların çalışmayı öğrenmesidir. Bu amaçla 14 gün boyunca her sıçana tek tek, hergün günde 3 tur olarak birer saat arayla sınama uygulandı. Ondördüncü gün sıçanların seçimi yapıldı. Seçim günü herhangi bir turda ilk sekiz seçimi içinde 7 veya 8 DS yapan hayvanlar öğrenmiş olarak deneye seçildi. Bu özelliği sağlayamayan hayvanlar deneye alınmadı. Seçim günü verileri operasyon sonrası verileri ile karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı. Seçim sonrası bir gün ara verilerek deneysel beyin iskemisi modeli için operasyon uygulandı.

3.1.3. İSKEMİ SONRASI DEĞERLENDİRME BÖLÜMÜ

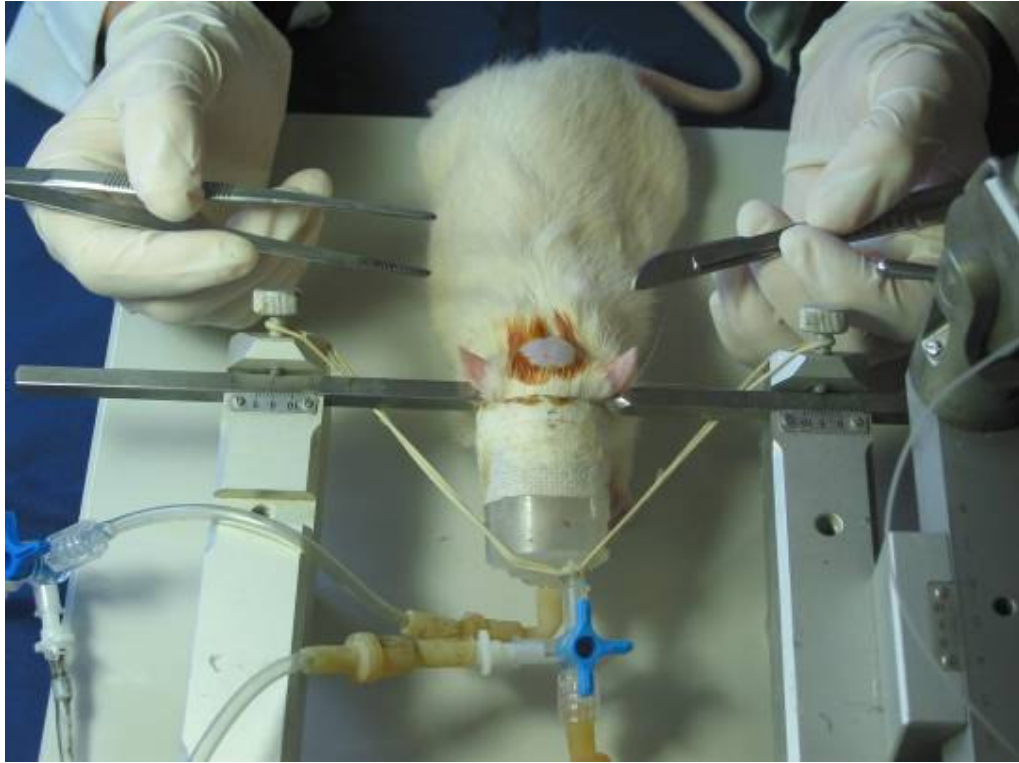
Bu bölüm hayvanların belleğini değerlendirmek amacıyla uygulandı. Bu amaçla deneysel beyin iskemisi sonrası yedinci gün tüm hayvanlara tek tur olarak sınama uygulandı. Bu sınama öğrenme bölümündeki aynı özelliklere göre uygulanıp, ilk sekiz seçimleri değerlendirildi.

3.2. DÖRT DAMAR OKLÜZYON YÖNTEMİ

Deneydeki sham grubu dışındaki tüm sıçanlara dört damar oklüzyon yöntemiyle yapılan 'deneysel tekrarlayıcı geçici tüm beyin iskemisi modeli' daha önceden belirlenmiş protokole uygun olarak yapıldı (1).



Şekil 5: Denedeyde kullanılan operasyon masası.



Şekil 6: Stereotaksi aygıtına sıçanın yerleştirilmiş görünümü.

Bu modelde tüm hayvanlara operasyon öncesi inhale anestezi uygulandı. İn hale anestezi için izofluran (Isoflurane, Rhodia Organique Fine Ltd., Baltimore İngiltere) kullanıldı, öncelikle %4–5 lik izofluran inhalasyonu ile indüksiyon yapıldı, sürdürme dozu olarak % 2–3 oranında izofluran kullanıldı.

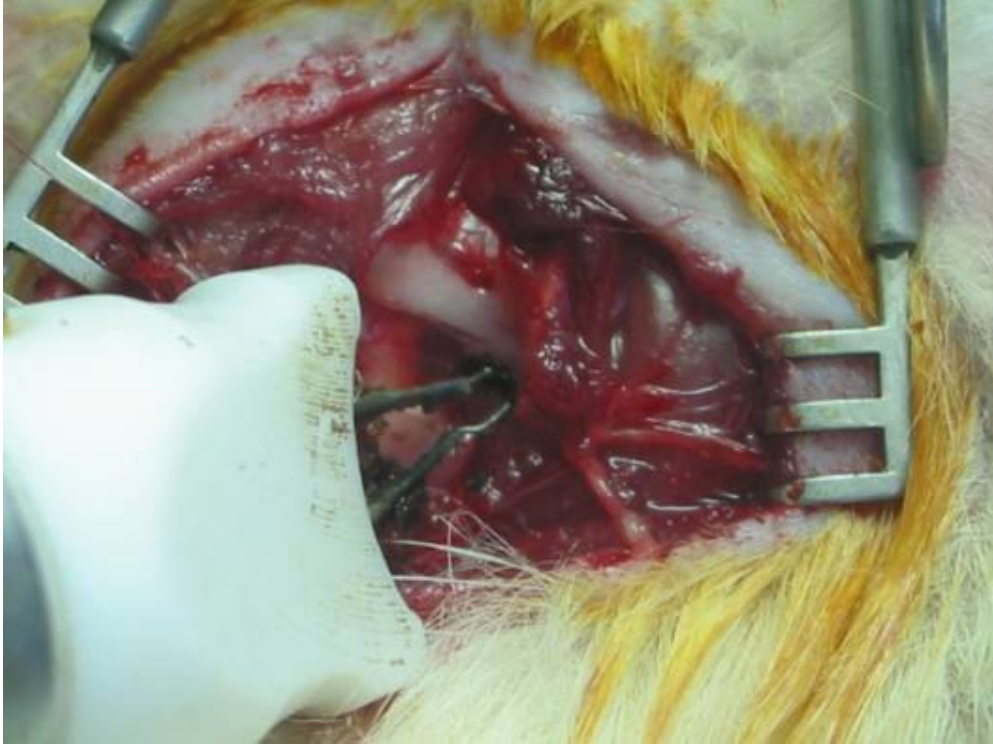
İndüksiyon 2L cam fanus içinde gerçekleştirildi, sürdürme dozunda nazal-oral maske kullanılarak operasyona devam edildi (92). Oksijen tüpünden 0,5L/dak hacimde %100'lük gelen oksijenin itici gücü kullanılarak, vaporizörden izofluranın oranı ayarlandı. Deneyde kullanılan operasyon sistemi Şekil 5'te gösterilmiştir.

Anestezi indüksiyonu uygulanmış sıçanlar anestezi maskesi takılarak stereotaksi aygıtına *interaural* çubuklar ile yerleştirilip, *incisor* çubuk yerleştirilmeden, kafası hiperfleksiyona getirilerek atlanto-aksiyal eklemin açılması sağlandı (Şekil 6). Daha sonra birinci (atlas) ve ikinci (aksis) servikal omur kemiğinin *prosesus spinosus*ları palpe edilerek, her iki omurun *prosesus transversus*'una palpasyonla ulaşıldı. Her iki *prosesus transversus* arasındaki omurga kaslarına yaklaşık 0,5 cm sagittal kesi yapıldı. Atlas ve aksis lateral faset eklemi açığa çıkarıldı (Şekil 7). Penset yardımıyla eklem 1 mm kadar açılarak, vertebral arter bipolar koagülatör (FST 18000–00, Fine Science Tools, Tokyo, Japonya) kullanılarak koterlendi. Bu işlem her iki tarafta yapılarak baziller arteri besleyen her iki vertebral arterin kalıcı olarak kapatılması sağlandı (Şekil 8). Ardından kaslar ve cilt ipek iplikle dikilerek kapatıldı.

Operasyonun ikinci aşamasında, sıçan stereotaksiden çıkarılarak sırtüstü sabitlendi. Bir makas yardımıyla sternum üst ucundan başlayıp boyuna doğru uzanan orta hatta yaklaşık 2 cm cilt kesisi yapılarak trakeaya ulaşıldı. Trakea arka yan tarafında arteria karotis - nervus vagus damar sinir paketine ulaşıldı (Şekil 9). İnce uçlu penset ve eğri biz ile nervus vagus ve çevre dokular ana karotis arterinden ayrıldı ve bu damarın altından 1 mm kalınlıkta pamuk iplik geçirilerek, etraf dokulardan ayırmak amacıyla 1 cm



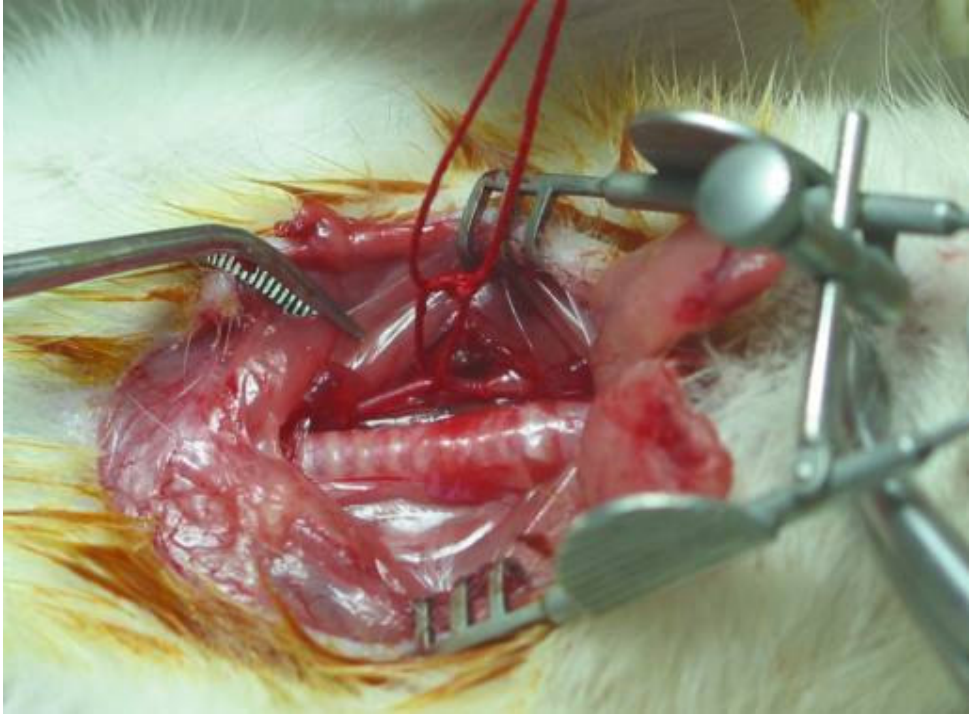
Şekil 7: Atlas ve aksis omurların açılmış görünümü.



Şekil 8: Atlas ve aksis omurların faset eklemi arasından vertebral arterin koterlenişi.



Şekil 9: Trakea yan tarafında ana karotis arterin açığa çıkarılması.



Şekil 10: Ana karotis arterin ipek iplikle gevşek düğüm atılmış durumu.

çaplı gevşek bir düğüm atıldı (Şekil 10). Bu işlemler her iki tarafta da tekrarlandı. Daha sonra iplerin uçları kasların üzerine yerleştirilerek ipek iplikle sadece cilt dikişi yapıldı. Tüm sıçanlara operasyon sonrası sıvı kaybını yerine koymak amacıyla 4 mL saline s.c. verildi. Bu aşamada operasyon sonlandırılarak sıçanlar anesteziden çıkarıldı ve ısı kaybını önlemek için ısı battanitesi ve ışık kullanılarak uyanmaya bırakıldı.

Operasyondan bir gün sonra sıçanlara iskemi uygulandı. İskemi uygulamasında sıçanlar anestezisi yapılmaksızın sırt derisinden sıkıca tutularak sabitlendi. Operasyonda boyun derisine atılan sütürler bir bistüri ile dikkatlice açıldı. Yüzeyde bulunan pamuk iplik uçları çekilerek ana karotis arterler yüzeye çıkarıldı ve 100 g'lık arter klemleri kullanılarak 10 dakika boyunca her iki arteria karotis kommunisler kapatıldı (Şekil 11).

Klemp takılınca hayvanlar serbest bırakıldı. Tüm beyin damarları kapatıldığı için hayvanların klemp sonrası 10 dakika içinde yere düşmesi beklendi (Şekil 12). Yere düşmeyip tamamen eski hareketlerine devam eden sıçanlar, damarların tam kapatılmadığı düşünülerek deneyden çıkarıldı. 10 dakika sonunda klemler çıkarıldı. 1 saat ara verilerek aynı klemp işlemi tekrarlandı. 2. klemler de 10 dakika sonra çıkarılarak, pamuk iplikler kesildi ve boyun derisi ipek iplikle dikildi. Operasyon sonrası 3 gün boyunca, iskemi uygulanan tüm sıçanlara sıvı kaybını yerine koymak amacıyla günde 3 mL saline s.c. olarak verildi.

3.3. DENEY SONUNDA YAPILAN İŞLEMLER

Operasyon sonrası yedinci gün tüm sıçanlara sekiz kollu labirent sınaması uygulandıktan sonra, derin eter anestezisi uygulandı. Anestezisi altındaki bu sıçanlar dekapite edildi. Hızlı bir şekilde, ince uçlu bir pens yardımıyla kafatası foramen magnumdan başlayarak önce orta hattın, sonra yanlara doğru açılarak beyin açığa çıkartıldı. Beyin tabanında bulunan sinirler, önden arkaya doğru kesildikten sonra serbest kalan beyin bir lam üzerine alınarak hemen -20 °C'de donmaya bırakıldı.



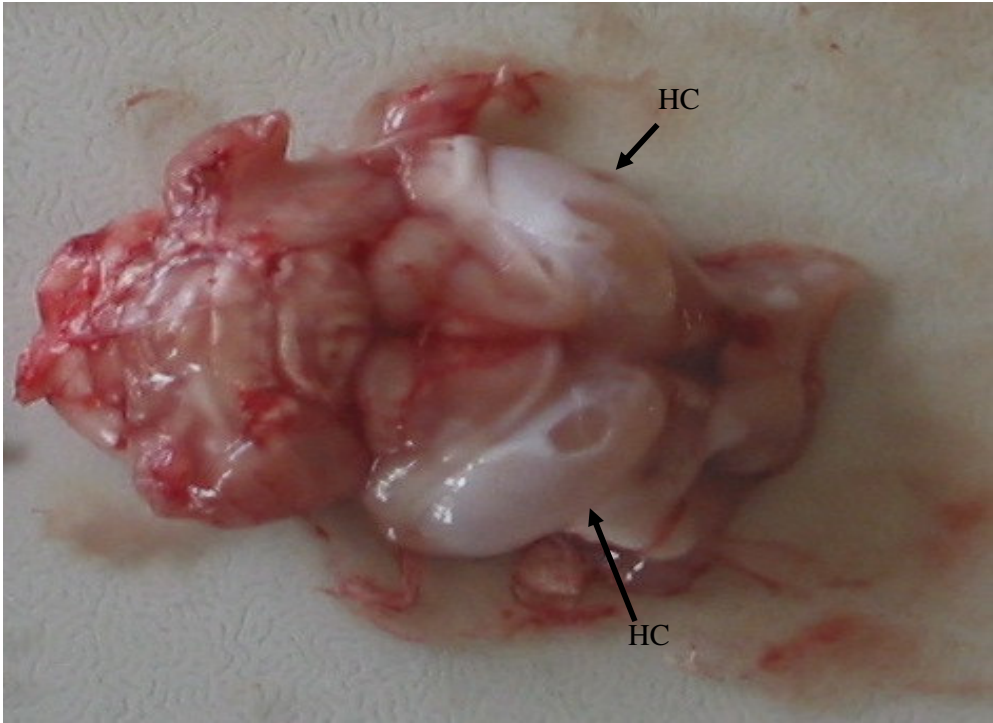
Şekil 11: Ana karotis arterlere klemp takılışı.



Şekil 12: Klemp sonrası düşerek yan yatmış bir sıçan.



Şekil 13: Beyinden hipokampusun ayrılması sırasında etraf dokuların kaldırılması.



Şekil 14: Etraf dokular kaldırıldıktan sonra hipokampusun (HC) görünümü.

Dondurulmuş beyinlerin biyokimyasal ölçüm öncesi hipokampusları ayrıldı. Bu işlem sırasında koronal düzlemde beyin ön kısmının 5 mm arkasında bregmaya denk gelen bölgeden bir bistüri ile koronal kesi yapıldı. Bu kesiler hipokampus ön bölümü görünene kadar ince kesitler halinde beyin arkasına doğru tekrarlandı. Hipokampus ön bölümü görüldüğünde ince bir penset yardımıyla üstte kalan korteks kaldırılarak, görünür hale gelen hipokampusun tamamı ikik taraflı olarak ince penset yardımıyla beyinden ayrıldı (Şekil 13 ve 14).

3.4. MALONDİALDEHİD DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Deneydeki tüm sıçanların hipokampuslarında MDA düzeyi ölçüldü. Bu ölçüm, MDA'nın asidik ortamda thiobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemi uygulanarak yapıldı (93).

Bu yöntemde kısaca; 0,5 mL doku homojenatı üzerine %8,1 sodyum dodesil sülfat 0,2 mL, pH'sı 3,5 olan %20 asetik asit 1,5 mL ve %0,8 thiobarbitürik asit solüsyonu 1,5 mL eklenerek 95 °C'de 60 dakika boyunca ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak çizilen ölçüleme grafiğinde numunedeki MDA miktarı hesaplandı ve nmol/g-doku olarak ifade edildi (94).

3.5. İLAÇ UYGULAMASI

Minosiklin (Wako Pure Chemical Industries Ltd. Osaka, Japonya) distile suda çözülerek, profilaktik olarak 7 gün boyunca 45 mg/kg/gün dozunda verildi. Nilvadipin (Astellas Pharma Inc. Osaka, Japonya) profilaktik olarak 7 gün boyunca, birkaç damla etil alkolde çözülerek distile su içerisinde seyreltilmiş olarak 3,2 mg/kg/gün dozunda uygulandı. İlaçlar ve salin 1 mL/kg hacimle i.p. olarak uygulandı.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

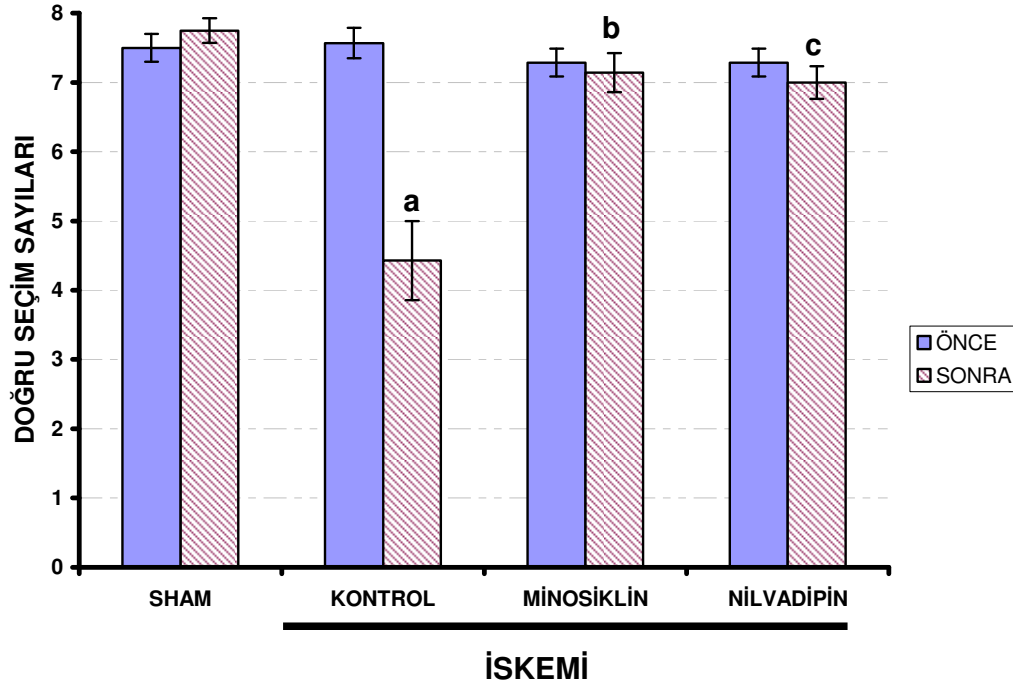
Sıçanların sekiz kollu labirent başarıları iskemi öncesi ve sonrası gruplar arası karşılaştırıldı. İskemi-kontrol grubu sham grubuyla karşılaştırıldı. Minosiklin ve nilvadipin grupları ise iskemi-kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Ayrıca her grupta, grup içi iskemi öncesi ve sonrası karşılaştırması da yapıldı. MDA verileri operasyon sonrası gruplar arası olarak karşılaştırıldı. Bu çalışmada istatistiksel değerlendirme tek yönlü ANOVA analizi kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. SEKİZ KOLLU LABİRENT UYGULAMASI DEĞERLENDİRMESİ

4.1.1. DOĞRU SEÇİMLER (DS)

Operasyon öncesindeki DS sayısı sham grubunda $7,50 \pm 0,20$; iskemi-kontrol grubunda $7,57 \pm 0,22$; minosiklin grubunda $7,29 \pm 0,20$; nilvadipin grubunda $7,29 \pm 0,20$ olarak bulundu. Bu değerler karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık görülmedi.



Şekil 15: Minosiklin ve nilvadipinin tüm beyin iskemisi modelinde sekiz kollu labirent DS sayılarına etkisi.

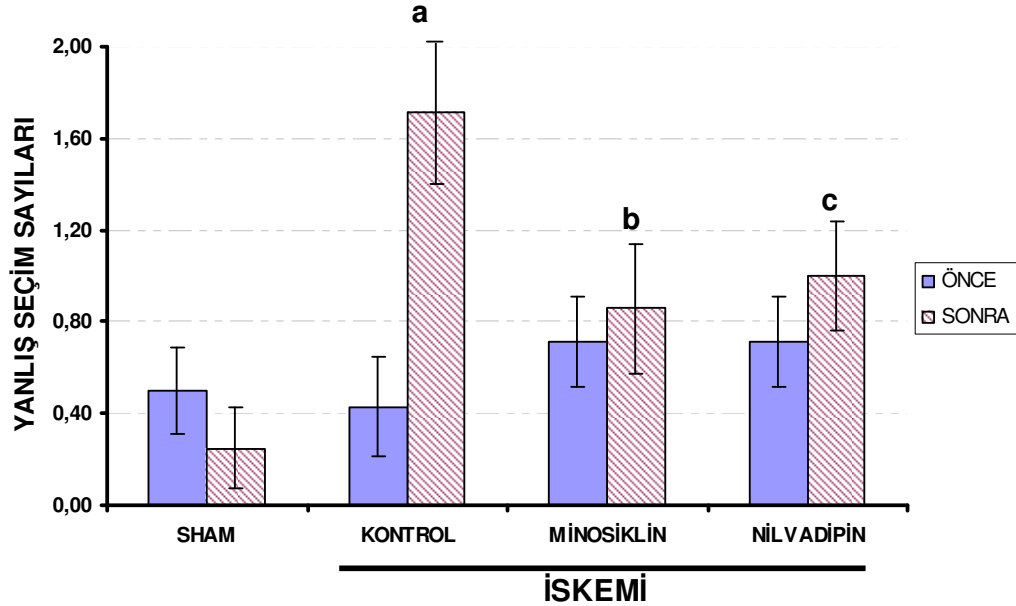
İstatistiksel önemli fark (tek yönlü ANOVA): ^a $p < 0,0002$ iskemi-kontrol sham'a karşı; ^b $p < 0,001$, ^c $p < 0,002$ minosiklin ve nilvadipin iskemi-kontrol'a karşı.

Operasyon sonrası bütün grupların DS sayıları karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı fark bulundu ($p < 0,001$). Sham grubunda DS $7,75 \pm 0,17$ değerindeydi. Bu değer operasyon öncesindeki farklı değildi. İskemi-

kontrol grubunda uygulanan iskemi DS'yi anlamlı olarak ($p<0,0002$; aynı grup iskemi öncesine göre $p<0,002$) $4,43\pm0,57$ 'ye düşürdü. Öte yandan Minosiklin bu azalmayı anlamlı olarak düzelterek ($p<0,001$), $7,14\pm0,28$ düzeyine çıkardı. Nilvadipin de iskemi-kontrol grubunda görülen azalmayı düzelterek DS sayısını $7,00\pm0,24$ 'e kadar yükseltti ($p<0,002$). Minosiklin grubu ile nilvadipin grupları iskemi sonrası DS sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 15). Ayrıca her iki grupta iskemi sonrası artan DS sayısı iskemi öncesinden farklı değildi.

4.1.2. YANLIŞ SEÇİMLER (YS)

Operasyon öncesindeki YS sayısı sham grubunda $0,50\pm0,19$; iskemi-kontrol grubunda $0,43\pm0,22$; minosiklin grubunda $0,71\pm0,20$ ve nilvadipin grubunda $0,71\pm0,20$ olarak bulundu. Bütün grupların operasyon öncesi YS sayıları karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir anlamlı farklılık görülmedi.

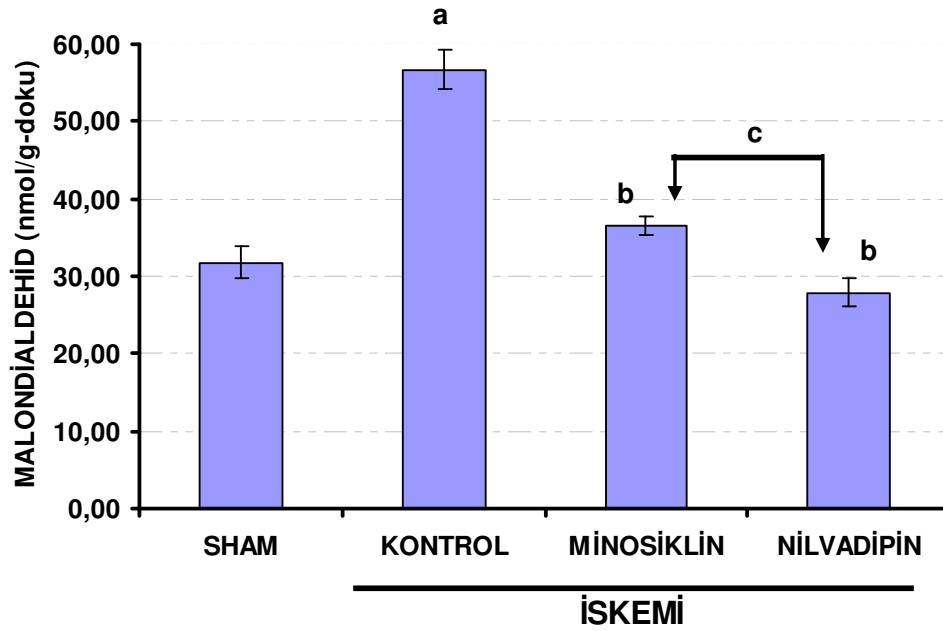


Şekil 16: Minosiklin ve nilvadipinin tüm beyin iskemisi modelinde sekiz kollu labirent çalışması YS sayılarına etkisi.

İstatistiksel önemli fark (tek yönlü ANOVA): ^a $p<0,001$ iskemi-kontrol sham'a karşı; ^b $p<0,04$, ^c $p<0,05$ minosiklin ve nilvadipin iskemi-kontrol'a karşı.

Operasyon sonrası bütün grupların YS sayıları karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı fark bulundu ($p<0,006$). Sham grubunda YS sayısı $0,25\pm0,17$ oldu. Bu değer operasyon öncesinde farklı değildi. İskemi-kontrol grubunda uygulanan iskemi YS'yi anlamlı olarak ($p<0,001$; aynı grup iskemi öncesine göre $p<0,01$) $1,71\pm0,31$ 'e yükseltti. Öte yandan minosiklin bu artışı anlamlı olarak düzelterek ($p<0,04$) $0,86\pm0,28$ 'e düşürdü. Nilvadipin de iskemi-kontrol grubunda görülen YS artışını anlamlı olarak ($p<0,05$) $1,00\pm0,24$ 'e düşürdü. Minosiklin grubu ile nilvadipin grupları iskemi sonrası YS sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Ayrıca her iki grupta da iskemi sonrası YS sayısı, iskemi öncesinde farklı değildi.

4.2. MDA DÜZEYLERİ



Şekil 17: Minosiklin ve nilvadipinin tüm beyin iskemisi modelinde hipokampus MDA düzeylerine etkisi.

İstatistiksel önemli fark (tek yönlü ANOVA): ^a $p<0,0004$ iskemi-kontrol sham'a karşı; ^b $p<0,0001$, minosiklin ve nilvadipin iskemi-kontrol'a karşı; ^c $p<0,01$ nilvadipin minosikline karşı.

Tüm gruplar arasında MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı derecede fark bulundu ($p<0,001$). Sham grubu ile iskemi-kontrol

grubunun MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, sham grubunda $31,77 \pm 2,05$ nmol/g olan değer in iskemi-kontrol grubunda $56,70 \pm 2,49$ nmol/g'a yükselerek anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0,0004$).

Minosiklin bu değeri $36,50 \pm 1,25$ nmol/g'a düşürerek iskemi-kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma sağladı ($p < 0,0001$). Nilvadipin de iskemi-kontrol grubundaki MDA düzeyi artışını anlamlı olarak azaltarak $27,88 \pm 1,86$ nmol/g düzeyine indirdi ($p < 0,0001$). Nilvadipin MDA düzeyini minosikline göre daha fazla ($p < 0,01$) düşürdü (Şekil 17).

5. TARTIŞMA

Deneyde uygulanan dört damar oklüzyon modelinde, ana karotis arterlere klemp takılmasından hemen sonra bazı sıçanlarda yaklaşık olarak yarım dakika kadar süren aktivasyon (zıplama, yuvarlanma, düzensiz vücut ve kuyruk hareketleri gibi) görülmüştür. Klemp takılmasından yaklaşık olarak bir dakika sonra tüm sıçanlarda denge kaybı ve düşerek yan yatma görülmüştür. On dakikalık süre sonunda klempler çıkarıldıktan yaklaşık olarak yarım dakika sonra sıçanlar tekrar ayağa kalkarak normal postürlerini kazanmışlardır. Bu durum iskemi uygulamasının başarısının da bir göstergesi olarak görülmektedir. Aynı modelin uygulandığı başka çalışmalarda da aynı davranış değişikliği görülmüştür. Bu açıdan deneyimiz bu çalışmalarla uyumludur (1, 4).

Çalışmamızda uygulanan iskemi modeli, sekiz kollu labirent testinde DS sayılarını azaltmıştır. Bu durum, sıçanların yakın belleklerinin bozulduğunun bir göstergesidir. Aynı modelin uygulandığı benzer çalışmalarda iskemiyle birlikte DS sayıları azalmıştır. Bu çalışmalarda ortalama olarak DS sayıları 5 ± 1 dolaylarındadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarda elde edilen rakamların alt sınırındadır ve söz konusu çalışmalarla uyumludur (1, 4, 5).

Çalışmamızda YS sayıları iskemi uygulamasıyla birlikte artmıştır. Bu durum da sıçanların yakın belleklerinin bozulduğunun bir göstergesidir. Diğer çalışmalarda YS sayıları 7 ± 2 olarak kaydedilmiştir. Çalışmamızdaki YS sayısı artışı ise bu sayıya oranla oldukça düşüktür. Bunun nedeni; bu yayınlarda on dakika içindeki tüm YS'lerin dikkate alınmış olmasıdır (1, 4, 5). Çalışmamızda ise sadece ilk sekiz seçimdeki YS'ler dikkate alınmıştır. Her iki sonuç da birbirini desteklemekle birlikte, ilk sekiz seçimdeki YS sayısı artışının değerlendirilmesi deneyin daha sağlıklı sonuçlandırılması açısından uygun bir yöntem olabilir. Bu yöntemin olumsuz yanı ise, sayılar çok küçük kaldığından bazı durumlarda YS sayısı artışının fark edilemeyeşidir. Ancak

deneyimizde böyle bir durumla karşılaşılınmamış, gruplar arasındaki YS sayısı artışı anlamlı olarak belirlenmiştir.

AH ve hafif kognitif bozukluk gibi bellek bozukluğuna neden olan hastalıklardaki hücresele zedelenmede ROS'un etkisini araştırmak üzere bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla otopsi sonrası hipokampal ROS ürünlerinin ölçüldüğü bir çalışmada, süproksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz gibi enzimlerin bu hastalarda arttığı gözlenmiştir (95). Yine otopsi sonrası yapılan bir araştırmada, AH olan bireylerin hipokampal nöronlarında, çekirdek ve mitokondri DNA'sında ROS'a bağlı bozulma olduğu gösterilmiştir (96). Hafif kognitif bozukluk tanısı alan hastaların hipokampus nöronlarında da otopsi sonrası ROS'a bağlı benzer değişiklikler görülmüştür (97). Benzer bir çalışmada aynı hastalıkta hipokampus, amigdala ve entorinal kortekste lipit peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir (98). Konu hakkında yapılan çalışmaların artmasıyla birlikte, ROS'a bağlı gen ve protein bozukluklarının bellek bozukluğunun ilerlemesinde etkili olduğu fikri ileri sürülmüş ve bu konuda bazı kanıtlar elde edilmiştir (99, 100)

Bazı başka bellek bozukluğu görülen hastalık modellerinde hipokampusta ROS ürünleri ölçülmüştür. Bu amaçla yapılan bir çalışmada kolşisin verilerek hücre kültüründe AH'nin histopatolojik modeli uygulamasında, NO, ROS ürünü olan laktat dehidrojenaz ve hücre ölümünün arttığı görülmüştür (101). Tün bu bilgiler, bellek bozukluğu ile sonuçlanan hücresele zedelenme mekanizmalarında ROS'ların yeri olduğunu düşündürmekte ve gün geçtikçe konu hakkında yapılan araştırmalar artmaktadır.

Beyinde hipoksiye en duyarlı bölgelerden birisi, bellek işlevinin düzenlenmesinde önemli yeri olan hipokampustur. Hipokampusta nöron ölümünün görüldüğü hemen her durumda bellekte bozulma görülmektedir. Daha önce yapılmış birçok çalışmada geçici iskemi uygulanmasıyla hipokampusta seçici hücre ölümü gerçekleştiği gösterilmiştir (4, 6, 15).

İskemi sonrası görülen nöron ölümünde temel nedenlerden birisi ROS'a bağlı ölümdür. Dokudaki MDA düzeyi bu nedenle oluşan hücre ölümünün bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda iskemi uygulanmasıyla hipokampustaki MDA düzeyinde sham grubuna göre belirgin olarak artış görülmüştür. Benzer bir çalışmada da hipokampal MDA düzeylerinin arttığı görülmüştür. Ancak sham grubundaki düzeyler ve ayrıca iskemi nedeniyle gözlenen artışlar benzer oranlarda değildir (102).

Farklı iskemi modeli uygulamalarının sonucu hipokampus MDA düzeyleri incelendiğinde, tüm çalışmalarda iskemi sonrası bu düzeyin anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Tüm bu çalışmaların sonuçları incelendiğinde hipokampus MDA düzeylerinin 10–120 nmol/g-doku arasında değişen seviyelerde olduğu görülmektedir. Çalışmamızda bu değerler 30-60 nmol/g-doku arasındadır. Ayrıca bazı yayınlarda birimler de nmol/mL, μ mol/mg-protein, nmol/g-doku gibi farklı olarak kullanılmıştır (94, 103, 104). Bu farklılığın laboratuvarlar arasındaki bazı ufak yöntem ve standart değişiklikleri nedeniyle olduğu düşünülebilir. Her durumda sonuçta varılan çıkarımlar değişmemektedir. Bu sorunu aşmak üzere bazı yayınlarda sham grubuna göre MDA artışı oranı verilmiştir (105)

İskemiyeye ek olarak A β 'nin beyin içine verildiği bir çalışmada, A β 'nin iskemideki bellek bozukluğunu daha da kötüleştirdiği görülmüştür. Aynı çalışmada iskemi hipokampal asetilkolin salınmasını azaltmıştır fakat bu azalma anlamlı olarak bulunmamıştır. Asetilkolin düzeyini yükselten ilaç ile tedavi sırasında ise, DS sayısının anlamlı olarak artmasına karşın, YS sayısındaki azalma anlamlı olarak bulunmamıştır. Bu sonuca göre, sekiz kollu labirent çalışmasında DS sayısı üzerinde olan ilaç etkisinin daha anlamlı olduğu düşünülebilir (106).

İskemide görülen nöron ölümünün diğer bir nedeni de apoptozistir. İskemiyeye bağlı olarak gelişen apoptoziste, glutamat reseptörlerinden AMPA alt türünün etkisinin daha belirgin olduğu görülmüştür. NMDA ve AMPA reseptör antagonistlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, iskemiden bir hafta

sonra görülen apoptotik hücre ölümünü sadece AMPA reseptör antagonistinin engellediği bulunmuştur (4).

İskeminin neden olduğu hücre ölümünde hem erken dönem nekrozda, hem de geç dönem apoptoziste kalsiyum iyonunun hücre içinde ve mitokondride birikimi önemlidir. Hücre içinde biriken kalsiyum iyonu, hücre dışından veya hücre içi kaynaklardan gelir. Hücre dışından kalsiyum girişinde bir yol AMPA ve NMDA tipi glutamat reseptörleridir. Diğer bir yol ise postsinaptik uçta bulunan L ve T tipi kalsiyum kanallarıdır. Hücre içinde kalsiyum iyonu artışıyla lipid ve proteinlerin yıkılması, DNA zedelenmesi ve mitokondriyal elektron taşınmasının bozulması görülür (49).

Sonuçlarımız, iskemiye bağlı özellikle ROS'tan kaynaklanan hipokampus hücre ölümünün, yakın bellek bozukluğuna neden olduğunu düşündürmektedir. Deneyimizde uygulanan tekrarlayıcı geçici tüm beyin iskemisi modelinde başarılı olunmuş ve yeterli derecede yakın bellek bozukluğu sağlanmıştır.

Minosiklinin antibiyotik etkisinin yanı sıra, penisilinle epilepsi oluşturulan sıçanlarda hipokampus nöronlarının ölümünü azalttığı bildirilmiştir (2). Ayrıca son dönemde yapılan bazı çalışmalarda minosiklinin iskemiye bağlı nöron zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda minosiklin, tüm beyin iskemisi modelinde ilk defa uzun süreli profilaktik olarak kullanılmış ve sekiz kollu labirent sınavı yapılmıştır. Çalışmamızda minosiklin uygulanmasıyla iskemi grubuna göre DS sayıları artmış, YS sayıları ise azalmıştır. Bu sonuçlara göre, minosiklin iskeminin neden olduğu bellek bozukluğunu iyileştirici etki göstermiştir.

Daha önce yayınlanmış bir çalışmada gerbillerde uygulanan tüm beyin iskemisi modelinde iskemiden 12 saat önce minosiklin 45 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulanmış ve iskemiden sonra da 90 mg/kg/gün dozunda günde iki defa uygulamaya devam edilmiştir. Aynı çalışmada başka bir gruba iskemiden 30 dakika sonra 90 mg/kg/gün dozunda günde 2 defa minosiklin

i.p. olarak uygulanmıştır. Her iki grupta 36 saat sonra doz 45 mg/kg/gün olarak azaltılmıştır. Söz konusu çalışmada tedavi toplam 6 gün devam etmiştir. Deney sonuçlarında profilaktik olarak uygulanan minosiklin ile iskemide %10,5 düzeyine inen hipokampal hücre sayısı, %76,7 düzeyine yükselmiştir. İskemi sonrası uygulandığında ise minosiklin hipokampal hücre sayısını %71,4 düzeyine yükselterek iskemiye oranla belirgin bir artış yapmıştır. Bu çalışmada minosiklinin iskemik hipokampal nöron ölümünde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (63). Çalışmamızda sıçanlarda görülen bellek bozukluğunun iyileşmesinde de, minosiklinin nöroprotektif etkinliğinin rolünün olduğu düşünülebilir.

Minosiklin tüm beyin iskemisinin dışında başka bazı nörodejeneratif hastalık modellerinde kullanılarak, sekiz kollu labirent sınaması yapılmıştır. Down sendromundaki bellek bozukluğunu araştırmak üzere yapılan bir çalışmada, transgenik fareler kullanılmış ve bu farelerde minosiklinin yakın ve uzak bellek üzerine etkileri araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada minosiklin 10 mg/kg/gün dozunda kullanılmış ve sekiz kollu labirent çalışmasında DS sayılarını artırıp, YS sayılarını azaltarak bellekte iyileşme sağlamıştır. Aynı çalışmada ilaç etkisi ile bazal önbeyin kolinerjik nöronlarının ölümünde azalma görülmüştür (107).

Bellek bozukluğunun araştırıldığı başka bir çalışmada ise bazal önbeyin kolinerjik nöronlarına özel bir immünotoksin verilerek nöronal zedelenme oluşturulmuş farelerin bellek bozukluğuna minosiklinin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada da minosiklin tedavisi ile DS sayıları artmış ve YS sayıları azalmıştır ve ayrıca hücre sayım çalışmasında da kolinerjik nöronlarda nöroprotektif etkinlik gösterilmiştir (108). Bizim elde ettiğimiz DS ve YS sayıları üzerine minosiklinin etkisi, yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Minosiklinin kullanıldığı çalışmalarda MDA düzeyi ölçümüne rastlanmamıştır. Çalışmamızda hipokampusta bu düzey ölçüldüğünden,

bulgularımız bu dokudaki lipid peroksidasyonu sonucu oluşan nöron ölümünü minosiklinin azalttığını düşündürmektedir.

Minosiklinin ROS'a bağlı hücrel zedelenmedeki etkisi bazı çalışmalarda araştırılmıştır. 6-hidroksidopaminle nöronal zedelenme oluşturulan nöron hücre kültüründe, minosiklinin ROS zedelenmesi ürünlerini azaltarak nöron ölümünü azaltmıştır (109). Ayrıca minosiklin retinal gangliyon hücre kültüründe, NMDA ile oluşturulan hücrel zedelenmede, ROS ürünlerini azaltarak hücreleri ölümden korumuştur (110). Çalışmamızdan elde ettiğimiz lipid peroksidasyonu azalması, bu çalışmalarla uyumludur ve minosiklinin ROS'a bağlı ölümden hücreleri koruduğu fikrini desteklemektedir. Minosiklinin ROS'a bağlı ölümden hücreleri koruduğu fikrini desteklemektedir. Minosiklinin ROS'a bağlı ölümden hücreleri koruduğu fikrini desteklemektedir. Minosiklinin ROS'a bağlı ölümden hücreleri koruduğu fikrini desteklemektedir. Minosiklinin ROS'a bağlı ölümden hücreleri koruduğu fikrini desteklemektedir.

Minosiklinin glutamat gibi nöronal ölüme neden olan bazı ajanlara karşı koruyucu etkinlik göstermiştir. Bir NMDA analogu olan ibotenik asitin beyin içine uygulanmasına bağlı oluşan nöronal zedelenme, minosiklin tarafından azaltılmıştır (111). Minosiklinin iNOS mRNA düzeyini azalttığı ve iNOS aktivitesini inhibe ettiği, in vitro çalışmalarda ortaya konmuştur (112). In vivo olarak da gliyal iNOS ekspresyonunu dolaylı ve/veya NO aracılı nörotoksititeyi direk olarak inhibe etmiştir (68). Minosiklin, omurilik nöron hücre kültüründe, eksitotoksinlere bağlı olarak artan NO metabolitleri ve interlökin-1 β salınımını azaltarak antiinflamatuvar etkinlik göstermiştir (113).

Minosiklinin bellek iyileştirici etkisinde; ROS'a bağlı hücre zedelenmesini azaltması, glutamat antagonizması, antiinflamasyon ve NO inhibisyonunun payı olduğu düşünülebilir.

Nilvadipin antihipertansif olarak klinikte kullanım alanı olan kalsiyum kanal blokeri bir ilaçtır. Son yıllarda bu ilacın nöroprotektif etkinliği üzerinde durulmaktadır. Çalışmamızda nilvadipin tüm beyin iskemisi modelinde ilk defa uzun süre profilaktik olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda nilvadipin kullanımıyla sekiz kollu labirent sınavında iskemi grubuna göre DS sayıları artmış, YS sayıları da azalmıştır. Bu durum, bellek bozukluğunun nilvadipin ile düzeldiği anlamına gelmektedir. Çalışmamızda ayrıca ilaç uygulanmasıyla hipokampusta MDA düzeyi iskemi grubuna göre azalmıştır. Bu durum nilvadipin kullanımı ile hipokampustaki ROS'a bağlı hücrel ölümün azaldığını düşündürmektedir.

Daha önce yapılmış bir çalışmada aynı iskemi modeli kullanılarak, nilvadipin iskemiden hemen sonra aynı dozda kullanılmıştır. Bu çalışmada DS sayıları ilaçla belirgin derecede artmış ve YS sayıları azalmıştır. Bu çalışmadaki nilvadipin kullanımı ile DS sayısı artışı çalışmamızdaki bulgular ile uyumlu olmakla birlikte, YS sayısı azalması çalışmamızda daha az olarak görülmektedir. Bunun nedenine daha önce değinilmiştir ve sadece ilk sekiz seçimin değerlendirilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı çalışmada ilaç uygulanmasıyla apoptotik nöron ölümünün azaldığı da gösterilmiştir. Yine bu çalışmada nilvadipin uygulanmasıyla hipokampusta apoptozise bağlı mRNA, bax ve kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı, apoptotik hücre ölümünün azaldığı gösterilmiştir (1).

Başka bir çalışmada ise orta serebral arter oklüzyonu yöntemiyle bölgesel beyin iskemisi oluşturulan sıçanlarda nilvadipin profilaktik olarak 3 mg/kg/gün dozunda yedi ve ondört gün boyunca kullanılmıştır. Bu çalışmada iskemiden bir gün sonra infarksiyon alanının küçüldüğü gösterilmiştir. Ondört gün kullanımı ile yedi gün kullanıma göre daha fazla küçülme olduğu görülmüş, ayrıca bu grupta iskemi alanında ödem de azalmıştır (84).

Gerbillerde çalışılan bir başka geçici beyin iskemisi çalışmasında ise, 1 ve 10 mg/kg/gün dozlarında uygulanan nilvadipinle, mikrotübül associated protein-2 düzeyindeki azalma inhibe edilerek, anlamlı derecede nöroprotektif etkinlik saptanmıştır (85).

Nilvadipinin hipokampal CA1 bölgesi nöronlarına olan seçici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bölgedeki nöronların kalsiyum kanallarına olan

etkisi gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, nilvadipin seçici olarak söz konusu nöronlardaki yavaş ve hızlı akımlı L-tipi kalsiyum kanallarını bloke etmiştir. Bu etkiye serebral vazodilatör etkisi de eklenince, ilacın iskemide belirgin hipokampal nöroprotektif etkinlik gösterdiği ve bellek bozulmasını düzelttiği bildirilmiştir (86). Nilvadipinin aynı etkisi hipokampal nöron hücre kültürlerinde de çalışılmış ve yine bu hücrelerde de L-tipi kalsiyum kanallarını seçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (87).

Hipokampustaki yaşlanmaya bağlı olarak gelişen değişikliklere olan etkisi araştırıldığında nilvadipin, farelerin hipokampus CA1 bölgesinde doza bağlı olarak ubiquitin immünoreaktif nöron sayısı artışını azaltmıştır. Yine bu farelerde uygulanan ilaç hipokampus CA1 bölgesinde S100 β immünoreaktif hücre sayısı artışını anlamlı derecede azaltmıştır. Sözü edilen immünoreaktif mekanizmalar yaşlanmayla artan bir şekilde hipokampusda nöronal hücre ölümüne neden olduğundan, nilvadipinin bu mekanizmaları inhibe ederek yaşlanmaya bağlı gelişen bellek bozukluğunu düzelttiği öne sürülmüştür (88).

Nilvadipinin nöronlardaki kalsiyum kanallarının yanı sıra, serebral kan damarlarındakileri de inhibe etmesi sebebiyle serebral kan akımını artırır. Klinik bir çalışmada, kronik serebral infarktli 7 hastada tek doz oral olarak 4 mg verilen nilvadipin ile serebral kan akımının arttığı gözlenmiştir (89). Başka bir klinik denemede ise hipertansiyona ek olarak kronik major serebral arter oklüzyonu olan hastalarda ilaç kronik olarak 3 ay kullanılmış ve serebral kan akımının anlamlı derecede arttığı görülmüştür (3).

Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda nilvadipinin L tipi kalsiyum kanallarının inhibe ederek (87) iskemi sırasında bu iyonla ilgili olarak gelişen hücre ölümünü önlediği; beyin damarlarında vazodilatasyon yaparak iskemiden hücreleri koruduğu (3), apoptozisi engelleyerek geç hücre ölümünü azalttığı (1) söylenebilir. Nilvadipin bu mekanizmalar ile nöroprotektif etkinlik göstermektedir. ROS'a bağlı hücre ölümünü nilvadipinin engellediğine yönelik çalışma yoktur. Benzer başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak hücre ölümünde tek bir mekanizmadan söz etmek kesin olarak

olası değildir. Genel olarak tüm mekanizmaların hücrel zedelenmeye katkısı olduğu düşünülür. Bu açıdan bakıldığında, diğer mekanizmaların yanı sıra nilvadipinin ROS'a bağlı nöron ölümünü de azalttığı deney sonuçlarımıza göre düşünülebilir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada minosiklin ve nilvadipinin dört damar oklüzyon yöntemiyle geçici, tekrarlayıcı tüm beyin iskemisi oluşturulmuş sıçanlarda, davranışsal ve biyokimyasal etkileri incelenmiştir.

Uygulanan iskemi modeli sıçanların sekiz kollu labirent testi başarılarını bozmuştur. Minosiklin ve nilvadipin bu bozulmayı düzeltmiştir ve bu iki ilaç arasında farklılık görülmemiştir.

İskemi uygulanmasıyla hipokampusta MDA düzeyi artmıştır. Minosiklin ve nilvadipin bu düzeyi azaltarak iyileştirici etki göstermiştir. Bu iki ilaç karşılaştırıldığında nilvadipin anlamlı olarak daha fazla azalma sağlamıştır.

Minosiklinin bu etkisinde glutamat reseptörleri ve NO üzerindeki inhibitör özelliğinin ve ROS'a bağlı ölümü engelleyerek MDA düzeyini düşürmesinin rolü olduğu düşünülebilir. Nilvadipinin etkisinde ise hücre içindeki artan kalsiyum nedeniyle görülen hücre zedelenmesini, kalsiyum kanallarını inhibe ederek engellemesi ve ek olarak beyin damarlarında vazodilatasyon yaparak hücreleri iskemiden ve ROS'a bağlı zedelenmeden koruması düşünülebilir.

Sonuç olarak uyguladığımız iskemi modelinde bir hafta profilaktik olarak kullanılan minosiklin ve nilvadipin, hipokampusta hücre ölümü üzerine koruyucu etki göstererek bellek bozukluğunu düzeltmişlerdir. Aralarında inmenin de bulunduğu bellek bozukluğu yapan birçok nöronal hastalıkta, minosiklinin ve nilvadipinin nöroprotektif bir ilaç olarak profilaktik şekilde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Ancak bu amaca yönelik olarak daha fazla deneysel ve klinik çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Sağlık kalitesinin artmasıyla yaşlılık ve buna bağlı olarak bellek bozuklukları artmaktadır. Minosiklin ve nilvadipin farklı nöronal hastalık modellerinde nöron koruyucu etki gösteren iki farklı gruptan ilaçlardır. Dört damar oklüzyon modeliyle oluşturulan tekrarlayıcı, geçici tüm beyin iskemisi modeli, deney hayvanlarında seçici hipokampal nöron zedelenmesi ve sekiz kollu labirent sınavında bellek bozukluğuna neden olmaktadır. Dokudaki reaktif oksijen türevleri nedeniyle oluşan hücre ölümünün bir göstergesi olarak malondialdehid (MDA) düzeyi ölçümü kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, profilaktik olarak kullanılan minosiklin ve nilvadipinin, tekrarlayıcı geçici tüm beyin iskemisi oluşturulan sıçanlardaki bellek bozukluğuna olan davranışsal etkisinin ve hipokampal malondialdehid düzeyine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 230-280 g ağırlıkta olan 29 adet erkek Wistar sıçan deneye alındı. Dört damar oklüzyon iskemisi modeli uygulaması için, vertebral arterler kalıcı olarak koterize edilip, ana karotis arterler ise iki taraflı olarak 60 dakika arayla 10 dakika süreyle 2 defa klemplenerek geçici olarak kapatıldı. Bellek işlevi sekiz kollu labirentte doğru seçim (DS) ve yanlış seçimleri (YS) ölçerek değerlendirildi. İskemiden bir hafta sonra tribarbitürik asit yöntemiyle hipokampusta MDA düzeyleri ölçüldü. Çalışmamızda sham (n=8), iskemi-kontrol (n=7), minosiklin (n=7) ve nilvadipin (n=7) olmak üzere 4 grup kullanıldı. Minosiklin ve nilvadipin, iskemi öncesi 7 gün boyunca i.p. olarak sırasıyla 45 mg/kg/gün ve 3,2 mg/kg/gün dozunda verildi. Çalışma sonrası denekler dekapite edilerek hipokampal MDA düzeyleri ölçüldü.

İskemisi, DS'leri azalttı ve YS'leri arttırdı ($p<0,001$), böylece yakın belleği bozdu. Minosiklin DS'leri artırdı ($p<0,001$) ve YS'leri azalttı ($p<0,04$), böylece yakın bellek bozukluğunu iyileştirdi. Nilvadipin de DS'leri artırıp ($p<0,002$), YS'leri azaltarak ($p<0,05$) yakın bellek bozukluğunu düzeltti. Öte yandan iskemi MDA düzeylerini artırdı ($p<0,001$). Minosiklin ($p<0,001$) ve nilvadipin

($p < 0,001$) bu artışı azalttı. Nilvadipin minosikline göre daha fazla azalma sağladı ($p < 0,01$)

Sonuç olarak, profilaktik minosiklinin ve nilvadipinin, dört damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu yakın bellek bozukluğunu iyileştirdiği ve hipokampal MDA artışını azalttığı bu çalışmada kanıtlanmıştır. Minosiklin ve nilvadipinin riskli gruplarda profilaktik kullanımı, hipokampal hücre ölümünü azaltarak iskemiyeye bağlı olarak oluşabilecek bellek bozukluğunu engelleyebilir.

8. SUMMARY

Minocycline is a second generation tetracycline that has high lipophilic property. Recently, it has been found that, this drug could provide neuroprotection in animal models of global brain ischemia and other neurological disorders. Nilvadipine is a dihydropyridine derivative antihypertensive drug with emanating neuroprotective properties. Repeated four vessel occlusion ischemia induces memory impairment and selective hippocampal degenerative changes. This study aimed at investigating the prophylactic effect of minocycline and nilvadipine on memory impairment and biochemical changes caused by four vessel occlusion ischemia in rats.

In this study, we used Wistar male rats (n=29) weighing 230-280 g. For four vessel occlusion ischemia induction, the vertebral arteries were cauterized, and the common carotid arteries were twice occluded bilaterally for 10 minute at 60 minute interval. At the end of the experiments, the rats were decapitated and the hippocampus was dissected out. The memory was evaluated by measuring the correct and error choices in 8-armed radial maze. The ischemia-reperfusion-induced damage was evaluated by measuring level of malondialdehyde (MDA) in the hippocampus using thiobarbituric acid method.

Ischemia impaired memory performance by decreasing the correct choices and increasing the error choices ($p < 0,001$). Minocycline improved the performance by increasing the correct choices ($p < 0.001$) and decreasing the error choices ($p < 0.04$). Nilvadipine improved the performance by increasing the correct choices ($p < 0.002$) and decreasing the error choices ($p < 0.05$) On the other hand, ischemia elevated MDA level ($p < 0.001$), whereas minocycline ($p < 0.001$) and nilvadipine ($p < 0.001$) decreased the elevated MDA. However, nilvadipine-induced reduction of MDA was greater ($p < 0, 01$) than that obtained with minocycline.

In conclusion, prophylactic treatment with minocycline and nilvadipine, improves memory impairment and decreases hippocampal MDA increment caused by four vessel occlusion in rats.

9. KAYNAKLAR

1) Iwasaki K, Mishima K, Egashira N, Al-Khatib IH, Ishibashi D, Irie K, Kobayashi H, Egawa T, Fujiwara M. Effect of nilvadipine on the cerebral ischemia-induced impairment of spatial memory and hippocampal apoptosis in rats. *J Pharmacol Sci* 2003; 93:188–196.

2) Yilmaz I, Adiguzel E, Akdogan I, Kaya E, Hatip-Al-Khatib I. Effects of second generation tetracyclines on penicillin-epilepsy-induced hippocampal neuronal loss and motor incoordination in rats. *Life Sci* 2006; 79:784-790.

3) Ogasawara K, Noda A, Yasuda S, Kobayashi M, Yukawa H, Ogawa A. Effect of calcium antagonist on cerebral blood flow and oxygen metabolism in patients with hypertension and chronic major cerebral artery occlusion: a positron emission tomography study. *Nucl Med Commun* 2003; 24:71–76.

4) Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Hatip-Al-Khatib I, Mishima K, Egawa T, Irie K, Fujiwara M. Non-NMDA mechanism in the inhibition of cellular apoptosis and memory impairment induced by repeated ischemia in rats. *Brain Res* 2004; 995:131–139.

5) Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Mishima K, Fujiwara M. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3, but not caspase-1, prevents apoptosis and improves spatial memory of rats with twice-repeated cerebral ischemia. *Life Sci* 2004; 75:1967–1978.

6) Block F. Global ischemia and behavioral deficits. *Prog Neurobio.* 1999; 58:279–295.

7) Roman GC, Sachdev P, Royall DR, Bullock RA, Orgogozo JM, Lopez-Pousa S, Arizaga R, Wallin A. Vascular cognitive disorder: A new

diagnostic category updating vascular cognitive impairment and vascular dementia. *J Neurol Sci* 2004; 226:81–87.

8) Ferri CP, Martin P, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M. Demansın global prevalansı: Bir Delphi konsensus çalışması. *Türkçe Lancet* 2006; 4:263–268.

9) Truelsen T, Piechowski-Jozwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogousslavsky J, Boysen G. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol* 2006; 13:581–598.

10) Bakar M. Post strok demans (epidemioloji ve risk faktörleri). *Demans* 2003; 1:15–20.

11) Pohjasvaara T, Erkinjuntti T, Vataja R, Kaste M. Dementia three months after stroke. Baseline frequency and effect of different definitions of dementia in the Helsinki Stroke Aging Memory Study (SAM) cohort. *Stroke* 1997; 28: 785–792.

12) Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A.. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: Association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 1995; 6985:970–973.

13) Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slioter AJ, van Harskamp F, Van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 1997; 349:151–154.

14) Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther* 2000; 88:93–113.

15) Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11:491–498.

16) Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 1984; 69:385–401.

17) Yanagihara T. Experimental stroke in gerbils: Correlation of clinical, pathological and electroencephalographic findings and protein synthesis. *Stroke* 1978; 9:155–159.

18) Duhaime AC, Ross DT. Degeneration of hippocampal CA1 neurons following transient ischemia due to raised intracranial pressure: Evidence for a temperature-dependent excitotoxic process. *Brain Res* 1990; 512:169–174.

19) Taner D. Fonksiyonel nöroanatomi. Üçüncü baskı, Ankara: ODTÜ geliştirme vakfı yayıncılık ve iletişim A.Ş. METU Press yayınları 2002.

20) Gehrman J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Oschlies U, Dux E, Hossmann KA, Kreutzberg GW. The microglial reaction in the rat hippocampus following global ischemia: Immuno-electron microscopy. *Acta Neuropathol* 1992; 84:588–595.

21) Cleeg A, Bryant J, Nicholson T, McIntyre L, Broe SD, Gerard K, Waugh N. Clinical and cost effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine for AD: A rapid and systematic review. *Health Technol Assess* 2001; 5:137–138.

22) Bigl V, Schliebs R. Simulation of cortical cholinergic deficits: A novel experimental approach to study pathogenetic aspects of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 1998; 54:237–247.

23) Russell RW, Jenden DJ, Booth RA, Lauret SD, Rice KM, Roch M. Global in vivo replacement of choline by N-aminodeanol. Testing a hypothesis about progressive degenerative dementia: II. Physiological and behavioral effects. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 37:811–820.

24) Giovannelli L, Scali C, Fausone-Pellegrini MS, Pepeu G, Casamenti F.: Long-term changes in the aggregation state and toxic effects of beta-amyloid injected into the rat brain. *Neurosci* 1998; 87:349–357.

25) Frautschy SA, Baird A, Coleo GM. Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:8362–8366.

26) Flood JF, Morley JE, Roberts E. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer Disease. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:3363–3366.

27) Iwasaki K, Hatip-Al-Khatib I, Egashira N, Akiyoshi Y, Arai T, Mishima K, Takagaki Y, Inui K, Fujiwara M. Ovariectomy combined with amyloid beta (1-42) impairs memory by decreasing acetylcholine release and alpha 7nAChR expression without induction of apoptosis in the hippocampus CA1 neurons of rats. *Neurotox Res* 2004; 6:299–309.

28) Maurice T, Su TP, Privat A. Sigma1 receptor agonists and neurosteroids attenuate 25–35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* 1998; 83:413–28.

29) Morimoto K, Yoshimi K, Tonohiro T, Yamada N, Oda T, Kaneko I. Co-injection of beta-amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 1998; 84:479–487.

30) Frautschy SA, Horn DL, Sigel JJ, Harris-White ME, Mendoza JJ, Yang F, Saido TC, Cole GM. Protease inhibitor coinjection with amyloid-beta

protein results in enhanced deposition and toxicity in rat brain. *J Neurosci* 1998; 18:8311–8321.

31) Netland EE, Newton JL, Majocha RE, Tate BA. Indomethacin reverses the microglial response to amyloid-beta protein. *Neurobiol Aging* 1998; 19:201–204.

32) Giulian D, Haverkamp LJ, Yu J, Karshin W, Tom D, Li J, Kazanskaia A, Kirkpatrick J, Roher AE. The HHQK domain of beta-amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1998; 273:29719–29726.

33) Nag S, Fai Tang F. The effect of age on the response of the rat brains to continuous beta-amyloid infusion. *Brain Res* 2001; 889:303–307.

34) Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT. Aβ deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 1997; 17:7053–7059.

35) Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM. Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:15233–15238.

36) Götz J: Tau and transgenic animal models. *Brain Research Reviews* 2001; 35:266–286.

37) Lovestone S, Reynolds CH. The phosphorylation of tau: A critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 1997; 78:309–324.

38) Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem* 1995; 270:4854–4860.

39) Hardy J: Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trend Neurosci* 1997; 20:154–159.

40) Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's Disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996; 17:1005–1013.

41) Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grunberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y. Mutant presenilin 2 transgenic mouse: Effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J Neurochem* 1998; 71:313–322.

42) Presty SK, Bachevalier J, Walker LC, Struble RG, Price DL, Mishkin M, Cork LC. Age differences in recognition memory of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Neurobiol Aging* 1987; 8:435–440.

43) Buckmaster CA, Eichenbaum H, Amaral DG, Suzuki WA, Rapp PR. Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. *J Neurosci* 2004; 24:9811–9825.

44) Braak H, Braak E. Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus. *Acta Neuropathol* 1991; 81:261–268.

45) Wagster MV, Whitehouse PJ, Walker LC, Kellar KJ, Price DL. Laminar organization and age-related loss of cholinergic receptors in temporal neocortex of rhesus monkey. *J Neurosci* 1990; 10:2879–2885.

46) Florence AL, Gauthier A, Ponsar C, Van den Bosch de Aguilar P, Crichton RR. An experimental animal model of aluminium overload. *Neurodegeneration* 1994; 3:315–323.

47) Cotran RS, Kumar V, Robbins S. Çeviri editörü: Çevikbaş U. *Robins Temel Patoloji* 2003.

48) Van Wijk SJ, Hageman GJ. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2005; 39:81–90.

49) İşlekel H, İşlekel S, Güner G: Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *Norol Bil D* 2000; 17:2.

50) Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115:2656–2664.

51) Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991; 281:9–19.

52) Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1–15.

53) Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: The 2001 Willis lecture. *Stroke* 2001; 32:2712–2716.

54) Freitas I, Griffini P, Bertone V, Bertone R, Fenoglio C, Milliery R, Vairetti M. In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide

production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast. *Exp Gerontol* 2002; 37:591–602.

55) Davis HP, Tribuna J, Pulsinelli WA, Volpe BT. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiol Behav* 1986; 37:387–392.

56) Kiyota Y, Miyamoto M, Nagaoka A. Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1991; 538:295–302.

57) D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36:60–90.

58) Capdeville C, Pruneau D, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Model of global forebrain ischemia in the unanesthetized rat. *J Pharmacol* 1986; 17:553–560.

59) Wilson RC, Kitzman JV, Kemp DT, Goetsch DD. Compartmental and noncompartmental pharmacokinetic analyses of minocycline hydrochloride in the dog. *Am J Vet Res* 1985; 6:1316–1318.

60) Saivin S, Houin G. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clinical Pharmacokinetics* 1988; 15:355–366.

61) Liu Y, Ramamurthy N, Marecek J, Lee HM, Chen JL, Ryan ME, Rifkin BR, Golub LM. The lipophilicity, pharmacokinetics, and cellular uptake of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). *Curr Med Chem* 2001; 8:243–252.

62) Wang CX, Yang T, Noor R, Shuaib A. Delayed minocycline but not delayed mild hypothermia protects against embolic stroke. *BMC Neurol* 2002; 2:1–4.

63) Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:15769–15774.

64) Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen 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* 1999; 96:13496–13500.

65) 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's disease. *Nat Med* 2000; 6:797–801.

66) 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* 2003; 4:186–196.

67) He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 2001; 909:187–193.

68) 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* 2001; 98:14669–14674.

69) Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* 2001; 48:1393–1399.

70) Wells JE, Hulbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 2003; 126:1628–1637.

71) 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. *PNAS* 2004; 101: 3071–3076.

72) Tikka T, Usenius T, Tenhunen M, Keinanen R, Koistinaho J. Tetracycline derivatives and ceftriaxone, a cephalosporin antibiotic, protect neurons against apoptosis induced by ionizing radiation. *J Neurochem* 2001; 78:1409–1414.

73) Rosenthal J. Nilvadipine: Profile of a new calcium antagonist. An overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; 24:92–107.

74) Cheung WK, Woodward DL, Shin K, Hibberd M, Pearse S, Desjardins RE, Yacobi A, Silber BM. Pharmacokinetics of nilvadipine after single oral doses in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Res* 1988; 8:299–305.

75) Terakawa M, Tokuma Y, Shishido A, Noguchi H. Pharmacokinetics of nilvadipine in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 1987; 27:111–117.

76) Hirasawa N, Ishise S, Miyata H, Danjo K. Application of nilvadipine solid dispersion to tablet formulation and manufacturing using crospovidone and methylcellulose as dispersion carriers. *Chem Pharm Bull* 2004; 52:244–247.

77) Terakawa M, Tokuma Y, Shishido A, Yasuda K, Noguchi H. Effect of two different meals on bioavailability of nilvadipine in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 1987; 27:293–296.

78) Takata Y, Yoshizumi T, Ito Y, Kikuchi M, Ueno M, Tsukashima A, Kobayashi K, Fujishima M. Elevated plasma nilvadipine concentration after single and chronic oral administration to patients with chronic liver disease. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 42:475–479.

79) Tokuma Y, Sekiguchi M, Niwa T, Noguchi H. Pharmacokinetics of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in mice, rats, rabbits and dogs. *Xenobiotica* 1988; 18:21–28.

80) Mohamed NA, Kuroda Y, Shibukawa A, Nakagawa T, El Gizawy S, Askal HF, El Kommos ME. Binding analysis of nilvadipine to plasma lipoproteins by capillary electrophoresis-frontal analysis. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 21:1037–1043.

81) Kawamura S, Yasui N. In vivo effects of the Ca²⁺ entry blocker nilvadipine on brain surface microvessels in rats. *Neurol Med Chir* 1994; 34:663–667.

82) Saima S, Furuie K, Yoshimoto H, Fukuda J, Hayashi T, Echizen H. The effects of rifampicin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of orally administered nilvadipine to healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53:203–206.

83) Belal F, Abdine H, Zoman N. Voltammetric determination of nilvadipine in dosage forms and spiked human urine. *J Pharm Biomed Anal*. 2001; 26:585–592.

84) Kawamura S, Li Y, Shirasawa M, Yasui N, Fukasawa H. Effects of treatment with nilvadipine on cerebral ischemia in rats. *Tohoku J Exp Med* 1998; 185:239–246.

85) Kuwaki T, Satoh H, Ono T, Shibayama F, Yamashita T, Nishimura T. Nilvadipine attenuates ischemic degradation of gerbil brain cytoskeletal proteins. *Stroke* 1989; 20:78–83.

86) Ishibashi H, Murai Y, Akaike N. Effect of nilvadipine on the voltage-dependent Ca²⁺ channels in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res* 1998; 813:121–127.

87) Tsukuda E, Matsuda Y. Effect of benidipine on depolarizing stimulation-induced increase of intracellular calcium concentration in cultured mouse hippocampal neurons. *Jpn J Pharmacol* 1999; 81:401–403.

88) Himeda T, Kanbara S, Oki C, Kato H, Araki T. Effects of chronic administration with nilvadipine against immunohistochemical changes related to aging in the mouse hippocampus. *Metab Brain Dis* 2005; 20:141–153.

89) Kobayashi S, Yamaguchi S, Okada K, Suyama N, Bokura K, Murao M, Tsunematsu T. Effect of single oral administration of nilvadipine on cerebral blood flow in chronic cerebral infarction. *Angiology* 1992; 43:801–809.

90) Kihara M, Takahashi M. The potency of migraine prophylaxis with nilvadipine: Eight cases reported with further consideration. *Pathophysiology* 2001; 8:129–131.

91) Yamada K, Kanba S, Ashikari I, Ohnishi K, Yagi G, Asai M. Nilvadipine is effective for chronic schizophrenia in a double-blind placebo-controlled study. *J Clin Psychopharmacol* 1996; 16:437–439.

92) Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: Mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Research Protocols* 2002; 9:112–121.

93) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351–358.

94) Demir S, Özkurt S, Köseoğlu M, Enli Y, Aslan D, Gümüşsu N. Sigara içenlerde plazma lipid peroksidasyonu. *Solunum* 2001; 3:57–59.

95) Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45:1594–1601.

96) Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2005; 93:953–962.

97) Wang J, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *J Neurochem* 2006; 96:825–832.

98) Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA, Morrow JD. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2005; 58:730–735.

99) Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 22:223–232.

100) Mohmmad Abdul H, Sultana R, Keller JN, St Clair DK, Markesbery WR, Butterfield DA. Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative stress mediated by amyloid beta-peptide (1-42), HO and kainic acid: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2006; 96:1322–1335.

101) Yüksel M, Haklar G, Yalçın AS. Deneysel Alzheimer hastalığı modelinde reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit düzeyleri. *Geriatry* 2002; 5:39–43.

102) Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Safranal, a constituent of crocus sativus (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 22:394–399.

103) Maia FD, Pitombeira BS, Araujo DT, Cunha GM, Viana GS. I-Deprenyl prevents lipid peroxidation and memory deficits produced by cerebral ischemia in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2004; 24:87–100.

104) Gupta S, Sharma SS. Neuroprotective effects of trolox in global cerebral ischemia in gerbils. *Biol Pharm Bull* 2006; 29:957–961.

105) Liao Y, Wang R, Tang XC. Centrophenoxine improves chronic cerebral ischemia induced cognitive deficit and neuronal degeneration in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25:1590–1596.

106) Iwasaki K, Egashira N, Hatip-Al-Khatib I, Akiyoshi Y, Arai T, Takagaki Y, Watanabe T, Mishima K, Fujiwara M. Cerebral ischemia combined with beta-amyloid impairs spatial memory in the eight-arm radial maze task in rats. *Brain Res* 2006; 1097:216–223.

107) Hunter CL, Bachman D, Granholm AC. Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome. *Ann Neurol* 2004; 56:675–688.

108) Hunter CL, Quintero EM, Gilstrap L, Bhat NR, Granholm AC. Minocycline protects basal forebrain cholinergic neurons from mu p75-saporin immunotoxic lesioning. *Eur J Neurosci* 2004; 19:3305–3316.

109) Lin S, Wei X, Xu Y, Yan C, Dodel R, Zhang Y, Liu J, Klaunig JE, Farlow M, Du Y. Minocycline blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and free radical production in rat cerebellar granule neurons. *Life Sci* 2003; 21:1635–1641.

110) Shimazawa M, Yamashima T, Agarwal N, Hara H. Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage. *Brain Res* 2005; 1053:185–194.

111) Dommergues MA, Plaisant F, Verney C, Gressens P. Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for neuroprotection. *Neuroscience* 2003; 121:619–628.

112) Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB. A novel mechanism of action of tetracyclines: Effects on nitric oxide synthases. *Proc. Natl Acad Sci* 1996; 93:1401–14019.

113) Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21:2580–2588.