



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA RİFAMPİSİN MOLEKÜLÜNÜN HİPOKSİK
SANTRAL SİNİR SİSTEMİ HASARINA ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet ALÇI

KAYSERİ-2022



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA RİFAMPİSİN MOLEKÜLÜNÜN HİPOKSİK
SANTRAL SİNİR SİSTEMİ HASARINA ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Hazırlayan
Dr. Mehmet ALÇI

Danışman
Prof. Dr. Kazım ÜZÜM
İkinci Danışman
Prof. Dr. Hüseyin PER

KAYSERİ-2022

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan, iyi bir çocuk hekimi olmam için emeklerini esirgemeyen, öğrencileri olmakla gurur duyduğum tüm hocalarıma; “vazgeçmemek” kelimesinin anlamını yaşantısıyla bana öğreten kıymetli hocam Prof. Dr. Kazım Üzüm’e, tecrübeleriyle bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin PER’e, uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma;

Tez çalışmamın deneysel bölümünü yürüttüğüm GEN-KÖK Hipoksi Laboratuvarında bana desteğini hiç esirgemeyen, tanımaktan onur duyduğum sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi K. Erdem Başaran’a, tez çalışmasına maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne,

Millette ve tüm insanlığa faydalı işler yapma idealini çocukluğumdan itibaren hayatımın gayesi haline getiren, desteklerini her zaman hissettiren babam Prof. Dr. Mustafa Alçı ve annem Nejla Alçı’ya,

Yoğun asistanlık sürecinde beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan kıymetli eşim Hatice Nur Alçı’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hipoksik SSS Hasarı.....	3
2.1.1 Hipoksik Beyin Hasarında Fizyopatoloji.....	5
2.1.1.a. Glia Hücreleri.....	6
2.1.1.b. Glia Hücrelerinin Aktivasyonu	7
2.1.2. Hipoksik SSS Hasarında Klinik Bulgular.....	8
2.1.3. Hipoksik Beyin Hasarında Tedavi.....	9
2.2. Rifampisin Molekülü ve Etki Mekanizması	10
2.2.1. Rifampisinin Antibiyotik Dışı Etkileri	11
2.2.1.a. Rifampisinin İmmünmodülatör Etkileri	12
2.2.1.b. Rifampisinin Nörolojik Etkileri	12
2.2.2. Rifampisin Kullanımının Kısıtlılığı, Rifampisine Direnç.....	18
2.2.3. Rifampisinin Farmakokinetiği	18
2.2.4. Tüberküloz Tedavisinde Rifampisin Kullanımı	19
2.2.5. Rifampisinin Potansiyel Yan Etkileri ve Olumsuz Yanları	19
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları	21
3.2. Deney Grupları ve İlaç Uygulamaları.....	22
3.3. Fizyolojik Ölçümler	22
3.3.1. Akut Sürekli Hipoksi Modeli Oluşturulması ve WBP Ölçüm Protokolü.....	23
3.4. Doku Perfüzyonu, Dokuların Çıkarılması ve Doku Kesitlerinin Alınması	24
3.5. Astrositlerin ve Mikrogliaların İmmunofloresan Etiketlenmesi ve Floresan Mikroskopunda Görüntüleme	26

3.6. Astrosit aktivasyonunun miktarının belirlenmesi	27
3.7. Mikroglia aktivasyonunun miktarının belirlenmesi	28
3.8. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇLAR	13
KAYNAKLAR	49



KISALTMALAR

αS	: α -sinüklein
AD	: Alzheimer Hastalığı
ASH	: Akut Sürekli Hipoksi
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
CP	: Serebral Palsi
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DAPI	: 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EPO	: Eritropoetin
fR	: Solunum frekansı
GABA	: Gama (γ) aminobütirik asit
HIE	: Hipoksik İskemik Ensefalopati
HIF-1α	: Hipoksi indüklenebilir faktör-1Alfa
HVD	: Hipoksik ventilatuar düşüş
HVR	: Hipoksik Ventilatuar Cevap
IL -1β	: İnterlökin bir beta
IL-6	: İnterlökin altı
IL-10	: İnterlökin on
IL-18	: İnterlökin on sekiz
IBA-1	: Anti-iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1 antikoru
LPS	: Lipopolisakkarit
μg/ml	: mikrogram/mililitre
μmol/L	: mikromol/litre
mg	: miligram
mg/kg	: milligram/kilogram
MMP	: Mitokondriyal Membran Potansiyeli
MS	: Multiple Skleroz
NF-KB	: Nükleer Faktör kappa B
NMDAR	: Glutamaterjik N-Metil-D-Aspartat Reseptör
NO	: Nitrik Oksit

NTS	: Nükleus Traktus Solitarius (veya nükleus solitari trakt)
OCT	: Optimum cutting temperature
PaO₂	: Arteriyel kan parsiyel oksijen basıncı
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PD	: Parkinson Hastalığı
PHD	: Prolil Hidroksilaz
post-HVR	: Post-Hipoksik Ventilatuvar Cevap (Hipoksik Ventilatuvar Cevap Sonrası)
SA	: Saline (Tuz)
SF	: Serum Fizyolojik
SSS	: Santral Sinir Sistemi
STP	: Kısa zamanlı potansiyelizasyon
TGF	: Transforming Growth Faktör
TLR2	: Tool Like Reseptör 2
TNF-�	: Tümör Nekroz Faktörü-�
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick-end etiketleme
Rif	: Rifampisin
RifQ	: Rifampisin kinon
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
V	: Ventilasyon
Vt	: Tidal volüm
WBP	: Tüm Vücut Pletismografisi

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Deney grupları.....	22
Tablo 4.1.	Normoksik kontrol grubu ve hipoksik kontrol gruplarının deney öncesi ile sonrasında sakrifiye edilmeden önceki solunum frekansı (f_R), tidal volüm (V_t), ventilasyon (V) ve ventilasyon başına tüketilen karbondioksit oranı (V / V_{CO_2}) metabolizması değerlerinin karşılaştırması.....	30
Tablo 4.2.	Hipoksi sonrası 7 gün ve 14 gün rifampisin verilen grupların deney öncesi ile sonrasında sakrifiye edilmeden önceki solunum frekansı (f_R), tidal volüm (V_t), ventilasyon (V) ve ventilasyon başına tüketilen karbondioksit oranı (V / V_{CO_2}) metabolizması değerlerinin karşılaştırması.....	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 3.1.** Akut sürekli hipoksi modeli oluşturulan bütün vücut pletismografisi (WBP) sistemi. 23
- Şekil 3.2.** (A) İzofluran bulunan anestezi odasında ötenazi uygulaması. (B) Beyin dokusunun çıkarılması. 25
- Şekil 3.3.** Donduruculu karyostat ile 5 µM kalınlığındaki beyin doku kesitlerinin alınması..... 25
- Şekil 3.4.** İmmünofloresan antibodyler ile hücre çekirdeği, astrosit ve mikrogliaların işaretlenmesi 27
- Şekil 4.1.** Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grubun Frekans-Tidal Volüm- Ventilasyon grafiklerinin karşılaştırılması A. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının frekans değerlerinin grafiği B. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının tidal volüm değerlerinin grafiği C. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının ventilasyon değerlerinin grafiği. Anlamlılık (*) işareti ile gösterilmiştir..... 32
- Şekil 4.2.** Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grubun Frekans-Tidal Volüm- Ventilasyon grafiklerinin karşılaştırılması A. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının frekans değerlerinin grafiği B. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının tidal volüm değerlerinin grafiği C. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının ventilasyon değerlerinin grafiği. Anlamlılık (*) işareti ile gösterilmiştir..... 32
- Şekil 4.3.** Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup ile hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grubun Frekans-Tidal Volüm- Ventilasyon grafiklerinin karşılaştırılması A. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının frekans değerlerinin grafiği B. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının tidal volüm değerlerinin grafiği C. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının ventilasyon değerlerinin grafiği. Anlamlılık (*) işareti ile gösterilmiştir. 33
- Şekil 4.4.** Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup ve hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grubun CO₂

metabolizmasının göstergesi olan V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması A. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması B. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması C. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması. 33

Şekil 4.5. Beyin dokusundan alınan kesitlerde beyin dokusu korteks bölgesinde mikrogliya ve astrosit belirteçleri kullanılarak deney grupları karşılaştırılması..... 34

Şekil 4.6. (A) Beyin dokusundan alınan kesitlerde beyin dokusu korteks bölgesinde mikrogliya ve astrosit belirteçleri kullanılarak elde edilen görüntülerin birleştirilmesi. (B) Deney gruplarının GFAP ile verdikleri görüntünün istatistiksel olarak karşılaştırılması. (C) Deney gruplarının IBA-1 ile verdikleri görüntünün istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 35

Şekil 5.1. Rifampisin uygulamasının beyin dokusunda nöron ve glial hücreler üzerine etki mekanizmasının muhtemel hücrel sinyal yolağı şeması. ... 45

RATLARDA RİFAMPİSİN MOLEKÜLÜNÜN HİPOKSİK SANTRAL SİNİR SİSTEMİ HASARINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Giriş: Hipoksik beyin hasarı her yaşta görülebilen, özellikle yenidoğan döneminde neonatal asfiksi sonucunda ciddi morbidite ve mortalitesi olan bir durumdur. Hipoksik beyin hasarında mevcut tedavilerin etkinliği kısıtlıdır. Rifampisin çeşitli çalışmalarda nöroprotektif etkisi gözlenmiş olan bir moleküldür. Bu çalışmada rifampisinin hipoksik santral sinir sistemi hasarına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada deney hayvanları 4 gruba ayrıldı. Toplam 48 adet, 2 aylık *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney grupları için kullanılan her gruptan sıçanlar birer gün aralıklarla ikişer ikişer normobarik oda içerisindeki kafeslere konuldu. Deney gruplarından üçü %10 O₂ inspirasyonuna 15 dakika maruz bırakılarak akut sürekli hipoksi şartları oluşturuldu. Bütün vücut pletismografisi (WBP) ile ventilasyon (V), solunum frekansı (fR) ve tidal volüm (Vt) ölçümleri yapıldı. Sonraki günlerde hipoksiye maruz kalan gruplardan birisine 7 gün ve diğer gruba 14 gün intraperitoneal rifampisin enjeksiyonu yapıldı. Doku perfüzyonu sonrasında 5 µm kalınlığındaki beyin korteksi kesitlerinde glial hücre morfolojisindeki değişiklikler gösterildi. Mikroglia ve astrosit hücre etiketlemesi ile bu hücrelerin miktar tayininde immünofloresan boyama yöntemi kullanıldı. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9.2.0 (332) ile yapıldı. p<0.05 olan veriler anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Rifampisin uygulanan grupların rifampisin uygulanmayan hipoksi grubu ve normoksi grubu ile karşılaştırıldığında, bütün vücut pletismografisinde ventilasyon artışı ve immünofloresan boyamada astrosit aktivasyonunun baskılandığı görüldü.

Sonuç: Rifampisinin santral sinir sisteminde hipoksi modelinde inflamasyonu ve glial doku oluşumunu baskılaması, insanlarda hipoksik santral sinir sistemi hasarının tedavisi için umut olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Rifampisin, Hipoksi, Santral Sinir Sistemi Hasarı

**ERCIYES UNIVERSITY FACULTY OF MEDICINE, CHILD HEALTH AND
DISEASES, EVALUATION OF THE EFFECT OF RIFAMPICIN MOLECULE
ON HIPOXIC CENTRAL NERVOUS SYSTEM DAMAGE**

ABSTRACT

Aim: Hypoxic brain injury is a condition that can be seen at any age, especially in the neonatal period, and progresses with serious morbidity and mortality as a result of neonatal asphyxia. The efficacy of current treatments in hypoxic brain injury is limited. Rifampicin is a molecule whose neuroprotective effect has been observed in various studies. In this study, it was aimed to evaluate the effect of rifampicin on hypoxic central nervous system damage.

Materials and Methods: Experimental animals were divided into 4 groups in the study. A total of 48 2-month-old male Sprague Dawley rats were used. The rats from each group used for the experimental groups were placed in cages in the normobaric room in pairs at one-day intervals. Three of the experimental groups were exposed to 10% O₂ inspiration for 15 minutes and acute continuous hypoxia conditions were created. Ventilation (V), respiratory frequency (fR) and tidal volume (V_t) measurements were made with whole body plethysmography (WBP). In the following days, intraperitoneal rifampicin injection was given to one of the groups exposed to hypoxia for 7 days and to the other group for 14 days. Changes in glial cell morphology were demonstrated in 5 µm thick sections of cerebral cortex after tissue perfusion. Immunofluorescent staining method was used for microglia and astrocyte cell labeling and quantification of these cells. Statistical analyzes were performed with GraphPad Prism 9.2.0 (332). Data with p<0.05 were considered significant.

Results: When the rifampicin applied groups were compared with the hypoxia group without rifampicin and the normoxia group, it was observed that ventilation increased in whole body plethysmography and suppressed astrocyte activation in immunofluorescent staining.

Conclusion: The suppression of inflammation and glial tissue formation in the central nervous system in the hypoxia model of rifampicin has been a hope for the treatment of hypoxic central nervous system injury in humans.

Key Words: Hypoxia, Damage of Central Nervous System, Rifampicin



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hipoksi, hücrelerin ve dokuların metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için gerekli oksijenin karşılanamaması durumudur. Hipoksik hasar, bozulmuş doku perfüzyonundan (iskemi) ve/veya azalan arteriyel oksijen içeriğinden (hipoksemi) kaynaklanır. (1) Hipoksik santral sinir sistemi hasarı (SSS), santral sinir sisteminin ihtiyaç duyduğu oksijenin karşılanamaması sonucu gelişen klinik tabloyu ifade eder. Hipoksik SSS hasarı her yaşta görülebilir. (2) Yenidoğanın önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden olan neonatal asfiksi ise, hayatta kalan bebeklerde serebral palsy (CP) ve ağır nörolojik sekeller gelişmesine neden olabilir. (3) Hipoksi ve/veya iskeminin oluşturduğu geri-dönüşümsüz beyin hasarının minimize edilmesi ve geri döndürülebilirliği ile ilgili etkin bir tedavi yöntemi yoktur.

Arteriyel kan parsiyel oksijen basıncı (PaO_2) düşüşüne bağlı olarak orta ve şiddetli hipoksemi sonucu oluşan asfiksiye maruz kalan bebeklerde gözlenen ağır nörolojik hasar, yenidoğan yoğunbakım ünitelerinde hipoksik iskemik ensefalopatinin tedavisinde sıklıkla kullanılan hipoterminin yeterli olmadığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır. (4) Bu konuda monoterapi olarak ya da hipotermiye ek olarak çeşitli ilaçların hayvan deneyleri yapılmış olsa da klinikte net sonuç verecek tedavi arayışları ve net bir tedavi sürecinin ortaya çıkmasını sağlayacak çalışmalar devam etmektedir. Rifampisin, alzheimer, multiple skleroz ve parkinson gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde, özellikle hayvan deneyi modellerinde, inflamasyonun baskılanması etkisinin yanında nöroprotektif etkilerinin de gözlenmiş olması (5), hipoksiye maruz kalan beyinde de etkili olabileceği fikrini uyandırmıştır. Bu çalışmada akut hipoksiye maruz kalan

sıçanlarda rifampisin uygulamasının, beyin korteks bölgesinde glial hücre aktivasyonunun hipoksik beyin hasarına olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Sıçanların bütün vücut pletismografi (WBP) ile solunum parametrelerinin değerlendirilmesinin yanı sıra immünofloresan boyama yapılarak astrosit belirteci olan glial fibriler asidik protein (GFAP) ve mikrogliya belirteci olan anti-iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1 antikoru (IBA-1) kullanıldı ve hipoksik hasar sonrası astrosit ve mikoglia aktivasyonunda değişiklik olup olmadığının ortaya konulması hedeflendi.

Sonuç olarak, rifampisinin hipoksi modelinde etkili olması halinde klinikte neonatal asfiksi başta olmak üzere hipoksinin etyolojide rol oynadığı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipoksik SSS Hasarı

Hipoksik santral sinir sistemi hasarı, santral sinir sisteminin ihtiyaç duyduğu oksijenin karşılanamaması sonucu gelişen klinik tabloyu ifade eder. (1)

Hipoksi, hücrelerin ve dokuların metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için gerekli oksijenin karşılanamaması durumudur. Hipoksik hasar, bozulmuş doku perfüzyonundan (iskemi) ve/veya azalan arteriyel kan oksijen basıncı (PaO_2) düşüşünden (hipoksemi) kaynaklanır. (1)

Yenidoğan dönemi dışında SSS hasarının en sık nedeni kardiyak arrest sonrası gelişen iskemi ve hipoksidir. Diğer nedenler olarak; kan kayıpları, şoka bağlı serebral kan akımının azalması, solunum yolu obstrüksiyonları, karbon monoksit intoksikasyonu, solunum kaslarında paraliziye neden olan hastalıklar, yaygın SSS hasarı oluşturan ve özellikle medulla oblongatayı etkileyen hastalıklar, hipertermi, asidoz, hipoglisemi ve hiperkapni gibi nedenler sayılabilir. (2)

Hipoksik SSS hasarı her yaşta görülebilir ise de neonatal asfiksi önemli morbidite ve mortalite nedeni olup hayatta kalan bebeklerde CP ve ağır nörolojik sekeller gelişir. (3) Yenidoğan hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), yüksek gelirli ülkelerde 1000 canlı doğumda yaklaşık 3-5 çocuğu ve düşük ve orta gelirli ülkelerde 1000 canlı doğumda 12 yenidoğanı etkiler. Sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesine rağmen prevalans aynı

kalmaktadır (4, 6-8). Yenidoğan HiE aynı zamanda dünya çapında yenidoğan ölümlerinin beşte birinden sorumludur (4,6,9).

Neonatal asfiksi, santral sinir sisteminde oluşan hasarın derecesine göre değişen bir spektrumda kliniğe yansır.

Hipoksi ve/veya iskeminin oluşturduğu geri-dönüşümsüz beyin hasarının minimize edilmesi ve geri döndürülebilirliği ile ilgili etkin bir tedavi yöntemi yoktur. (4). HiE' nin doğumdan önce, doğum sırasında veya doğumdan sonra ortaya çıkabilecek birçok nedeni vardır (4,9). Neonatal ensefalopati, kafa içi kanama, hipoglisemik olay veya uzamış hiperbilirubinemi nedeniyle oluşabilen nörolojik bir sendromdur; ancak, en sık nedeni hipoksik iskemik hasardır. (4,10).

Beyin oksijene yüksek oranda duyarlı bir organ olup asfiksidede geri-dönüşümsüz hasar gelişimi için uzun süreli bir hipoksi dönemi gerekmemekte, kısa süreli bir hipoksi de ağır ve geri-dönüşümsüz hasar için yeterli olabilmektedir. İskelet kası hücreleri 30 dakikalık hipoksiden sonra tamamen iyileşebilirken, beyin hücrelerinde, özellikle de nöronlarda sadece 4-6 dakikalık benzer hipoksik stresten sonra geri dönüşü olmayan hasar meydana gelebilmektedir. (11)

Hipoksi sonucu çok sayıdaki hücrenin ölümü ile ortaya çıkan nekroz temel sorunu oluşturmaktadır. Nekroza beynin cevabı paradoksiktir. Ölen hücrelerin bütünlüğünün bozulması sonrası ortaya çıkan hücre içeriği “akut inflamasyon” a sebep olmaktadır. Akut İnflamasyonun amacı her ne kadar ölü hücreleri uzaklaştırmak olsa da, inflamasyon beyin hücrelerine zarar vererek inflamatuvar remodellinge neden olmaktadır. İnflamasyondaki ilk tepki eosonofili artışıdır (Hematoksilen-eozin pozitif boyanırlar), takiben makrofajlar ve inflamatuvar hücreler gelir ve myelin figürlerinde ağır bir bozulma ortaya çıkar. Uzun dönemde ortaya çıkan ve hipoksiye kısmen dirençli olan glial hücreler myelinizasyonun etkilendiği bölgelerde gliosis tablosu oluşumunda rol oynar.

Hipoksik hücre hasarına katkıda bulunan hücresel mekanizmalar arasında ATP' nin tükenmesi ve adenosin molekülüne kadar indirgenmesi, hücre içi asidoz gelişimi, artan metabolik yan ürün konsantrasyonları, oksijen radikallerinin oluşumu ve membran

fosfolipidlerinin yıkılması yer alır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artışı da hücre iskeletine doğrudan hasar ve apoptoza katkıda bulunan genlerin indüksiyonu gibi çeşitli mekanizmalar yolu ile hücrel hasara katkıda bulunur. (11)

Hipoksi ayrıca nötrofilik infiltrasyonla karakterize enflamatuar reaksiyonu da indükler, böylece sitokin mediyatörlerinin, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) salınması yoluyla hücrel hasarı artırır ve mikrosirkülasyonun bozulmasına bağlı iskemiye yoğunlaştırır. (11)

2.1.1. Hipoksik Beyin Hasarında Fizyopatoloji

Hipoksiye nöronlar, glial hücrelerden daha duyarlıdır. Ağır hipoksi ve iskemilerde global bir hasar oluşurken, hafif iskemilerde, hasar öncelikle sulanma alanlarına uzakta olan periventriküler bölgeler ile hipoksiye daha hassas olan nöronların bulunduğu hipokampus ve neokorteks bölgelerinde oluşmaktadır.

Beynin hipoksik iskemik hasarının histopatolojik bulguları genelde üç dönem içermektedir; hipoksik hasardan kaynaklanan birincil enerji yetmezliği, reoksijenasyon ve reperfüzyonun bir sonucu olan ikincil bir faz ve son olarak, önceki olayların kötüleşebileceği ve inflamasyonun kronikleşebileceği üçüncül bir faz ile sonuçlanmaktadır (12). Hipoksik-iskemik hasar meydana geldiğinde, oksidatif fosforilasyondaki azalma nedeniyle ATP'nin hızlı bir şekilde tükenmesi söz konusudur. Hücre anaerobik metabolizma kullansa da, bu enerjik olarak verimsizdir ve ATP'ye bağımlı Na / K pompasının arızalanmasına ve laktik asit ve hipoksantin gibi metabolitlerin birikmesine neden olur. Daha sonra, hücre dışı tarafta aşırı uyarıcı amino asit birikiminin yanı sıra hücreye aşırı su, sodyum ve kalsiyum girişi ile ilerleyici bir membran depolarizasyonu meydana gelir. Tüm bu birincil süreçler hücrel ödeme ve erken hücre ölümüne yol açar. İkinci aşama reoksijenasyon ve reperfüzyon ile ilgilidir. Oksidatif metabolizmanın kısmi geri kazanımı, radikal oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artmasını, daha yüksek hücre içi kalsiyum seviyelerini ve mitokondriyal disfonksiyonu tetikler. Pro-inflamatuar genlerin ekspresyonunda ve geç hücre ölümünde de bir artış vardır. Son olarak, daha önce bahsedilen zararlı süreçler, günlerden aylara kadar sürebilen üçüncül aşamada daha da şiddetlenebilir. Nörogenez, sinaptogenez ve

aksonal büyüme azalırken, inflamasyon ve epigenomik değişiklikler artar ve zararlı beyin hasarına yol açar (12).

2.1.1.a. Glia Hücreleri

Glia hücreleri santral sinir sistemindeki homeostazı korumakla görevli, ortak özelliklere sahip astrositleri, mikrogial hücreleri, oligodentrositleri ve ependimal hücreleri tanımlayan genel addır (13). SSS'nin nöronal olmayan hücre popülasyonlarının her biri, nöronal işlevi desteklemek için dikkat çekici şekilde adapte olmuştur.

Astrositler, SSS'nin iyonik ve nörotransmitter homeostazını sürdürür, sinaptik bağlantıları iyileştirir ve nöronal metabolik substratlar sağlar. Astrositlerin akut hasarlanmadan sonra nöronal hayatta kalmayı ve işlevi desteklemesi için hastalıkta uygun astrosit-mikroglia çapraz etkileşimi gereklidir. Oligodendrositler, miyelinli nöritik segmentleri koruyan ve besleyen miyelin kılıflarını geliştirir. Ependimal hücreler, beyin omurilik sıvısını oluşturan koroid pleksusun yapısına katılır. Mikrogial hücreler, sinaptik elementleri indükleyerek veya çıkararak nöronal aktiviteyi modüle eder. Mikroglia hücreleri, ekstrasellüler boşluğu temizleyen ve enflamatuvar bir yanıt sırasında sitokinleri serbest bırakan temizleyiciler olarak bilinmektedir (14). Normal zamanlarda dinlenme durumunda bulunurlar. Santral sinir sistemi ortamında bağışıklık ve patolojik sinyaller açısından tarama yaparlar. Bir kez aktive olduklarında, mikrogial hücreler yavaş yavaş santral sinir sisteminin normal işlevini geri yüklemeyi amaçlayan ameboid, fagositik bir forma dönüşürler (15). Mikrogial hücreler, nöronal destek, sinaptik modülasyon, nöronal devrenin yeniden düzenlenmesi ve önemli miktarda antimikrobiyal peptit üretimi gibi çok çeşitli işlevleri de yerine getirirler.

Canlıların ısı değişimleri, hipoksi gibi stres oluşturan faktörlere karşı tepkisini ve toleransını geliştirme yeteneği aklimatizasyon olarak adlandırılır. Dayanıklılığın göstergesi olarak tanımlanabilir. Tadmouri ve ark, glia hücrelerinin aklimatizasyon için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Gözlemler, hipoksiye duyarlı Nucleus Traktus Solitari (NTS)'de, glial aktivasyon sürecinin astrositlerde hipoksi başlangıcından 1 saat kadar sonra başladığını göstermektedir (16). Lokal hasara yanıt olarak, astrosit ağından salınan ATP'nin mikrogliaya da yayılabileceği ve mikroglianın proliferasyona ve lokal hasara göç etmesine izin verdiği gösterilmiştir (16-18). Glial hücreler, nötrofilleri ve

monositleri beyne toplayan inflamatuvar kemokinleri serbest bırakarak hipoksi/iskemi kaynaklı inflamasyonun başlatılmasında ve yayılmasında önemli bir rol oynar. Bu inflamatuvar araçlar, sadece nöroinflamasyonun indüklenmesinde değil, aynı zamanda sinapsların yeniden şekillenmesinde de kritik bir rol oynarlar (16,19,20)

Astrositler baskın olarak gliotransmitter salınımına bağlı hücre içi kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) dalgalanmaları yoluyla sinyal verir (21). Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP), astrosit hücre iskeletini oluşturan ara filamentler oluşturduğundan, GFAP ekspresyonundaki bir artış, morfolojinin değişmesine ve hücrelerin dallanmasının artmasına neden olur. Genellikle, yüksek GFAP ekspresyonu ve dallanmış morfoloji, astrosit aktivasyonunun göstergesi olarak kabul edilir. (21). GFAP, ilk 24 saat boyunca, hipoksi koşulları altında NTS'de artar (21). İlginç bir şekilde, mikrogial aktivasyonun minosiklin ile bloke edilmesi, hipoksi ile indüklenen GFAP değişikliklerini azaltır, bu da NTS'deki bu iki glial hücre tipi arasındaki iletişimi gösterir (21).

Aktif mikrogia ve reaktif astrosit, nöroinflamasyonda karşılıklı iletişim ve işbirliği yoluyla immün optimizasyonu sağlayabilir. Mikrogia ve astrositler arasındaki inflamasyon sinyalleri, sadece mikrogial aktivasyonun kendi kendine geri bildirim döngüsü ile değil, aynı zamanda bağışıklık ağındaki astrositlerin benzersiz anatomik yapısı ile de güçlendirilebilir (22,23). Astrositler ayrıca nörotrofik desteğe sahiptir, sinaptik aktivitenin oluşumunu, iletimini ve sürdürülmesini sağlarlar (24).

2.1.1.b. Glia Hücrelerinin Aktivasyonu

Hipoksik iskemik hasarlanma sırasında, nöronlardan glia hücrelerini aktive edebilen nörotransmitterler salınır (25). Nöronlar tarafından salınan nöromodülatörler arasında glutamat, adenosin ve noradrenalin bulunur (14). Glutamat, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarında artışa neden olan astrositler üzerindeki astrositik metabotropik glutamat reseptörlerini bağlayabilir ve aktive edebilir (14). Glia hücreleri ayrıca nöronların postsinaptik terminalleri tarafından salınan glutamatın öncüsü olan dopamin, asetilkolin ve GABA ile aktive edilebilmektedir (26). Aktive edildikten sonra, glia hücreleri, çevredeki diğer glia hücrelerini aktive etmek için sinyal yayan Ca^{+2} , glutamat, ATP, prostaglandinler veya nitrik oksit gibi gliotransmitterler salınır (14). Aktif mikrogliadan salınan ATP, astrositleri ve daha fazla mikrogia'yı aktive edebilir (16,27).

Enflamatuar bir yanıt sırasında, aktifleştirilmiş mikrogliya ayrıca enflamatuar sitokinleri serbest bırakarak astrositler ile iletişim kurmaktadır: tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interleokinler (IL) -1 β ve IL-6. IL-1 β ' ya yanıt olarak, daha fazla sayıda astrosit, uyarımı gösteren artmış kalsiyum dalgaları göstermekte ve astrositler tarafından nöromodulatorler salınmaktadır (14).

Mikroglial hücreler, nöronlar ile nörotransmitter reseptörleri, purinoreseptörler ve iyon kanalları aracılığıyla iletişim kurar. Aktive edilmiş mikrogliya ve reaktif astrositler, nöroinflamasyonda önemli rol oynar. Mikrogliya ve astrositlerin fenotipik değişiklikleri, belirli aşamalarda zararlı veya yararlı karakterlerini belirler (28). Astrositler ve mikrogliya içeren reaktif glia, akut doku hasarından sonra IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18, TGF ve IL-10 gibi sitokinleri eksprese edebilir ve salgılayabilir (29). Reseptör ekspresyonuna bağlı olarak, sitokinler hem otokrin hem de parakrin şekilde işlev görür. Sitokinler bazen fizyolojik süreçlerde de anahtar rol oynarlar (30).

Farelerde yapılan bir modelleme, mikrogliyanın, fagositoz ile ölü hücelere ve çevreye zarar veren bölgelere aktivasyon ve hızlı katılım gösteren bir ilk savunma hattı oluşturduğunu göstermektedir (31). Mikroglial reaksiyona ikincil olarak, mikrogliaya sinyal veren iltihaplanma araçları salgılayan astrositlerin aktivasyonu vardır. Reaktif astrositler GFAP'ı yukarı düzenler ve morfolojik değişikliklere uğrarlar ve bu da etkilenen bölgede hasarı sınırlayabilen glial skar oluşumuna yol açar (32).

2.1.2 Hipoksik SSS Hasarında Klinik Bulgular

Hipoksik SSS hasarı her yaş grubunda görülebilir. Kardiyak hastalıklar, kan kayıpları, septik veya travmatik şoka bağlı olarak serebral kan akımında azalma, solunum yolu obstrüksiyonları, karbon monoksit intoksikasyonu, solunum kaslarında paraliye neden olan hastalıklar, yaygın SSS hasarı oluşturan ve özellikle medulla oblongatayı etkileyen hastalıklar gibi durumlarda, ayrıca asfiktik doğumlarda görülebilmektedir (2). Doğum eylemi sırasında hipoksiye maruz kalan bebeklerde gelişen hipoksik ensefalopati, mor doğan ve doğumdan sonra ağlamayan bebeğin yaşamın ilk günlerinde öncelikle nörolojik fonksiyonlarının etkilendiği, takiben tekrarlı nöbetlerin ortaya çıktığı; çoklu organ etkileniminin de hipoksi düzeyine bağlı olarak eklenebildiği bir klinik spektrumu ifade eder (33). Klinik tabloda minimal nörolojik defisitten, hafif veya derin komaya

kadar değişkenlik gösteren hipoksik iskemik SSS hasarının patolojisinde selektif nöronal nekroz, fokal, multifokal iskemik nekroz, periventriküler lökomalazi, parasagital beyin hasarı ve status marmoratus bulunabilir. (33,34)

2.1.3. Hipoksik Beyin Hasarında Tedavi

Günümüzde hipoksik beyin hasarında etkinliği kanıtlanmış nöroprotektif bir tedavi henüz tanımlanamamıştır. Yoğun bakım ünitesi destek tedavisi ile terapötik hipotermi, orta ve şiddetli hipoksik iskemik ensefalopatiden etkilenmiş yenidoğanlar için onaylanmış tek yöntemdir. Destek tedavisi, solunum yönetimi, dolaşım yönetimi, sıvı ve elektrolit yönetimi, böbrek yönetimi, hematolojik yönetim ve perfüzyon takibini içerir. Bununla birlikte, birçok bebeğin hala ciddi beyin hasarından muzdarip olduğu göz önüne alındığında, bu tedavilerin etkinliği de yeterli görünmemektedir. (4, 35-37). Ne yazık ki, bu yöntem şiddetli hipoksik iskemik olaylarda yeterince etkili değildir (4,9,35)

Neonatal asfiksili bebeklerin erken dönem tedavisi ve nörolojik sekellerin önlenmesine yönelik potansiyel nöroprotektif tedaviler üzerine çalışmalar devam etmektedir. Örnek olarak, eritropoietin, interferon beta, azitromisin, N asetil sistein, leptin, melatonin, N-metil D-aspartat reseptör (NMDAR) antagonistleri, antioksidan ajanlar, topiramate, monosialoganglioside, allopurinol, asal gazlardan ksenon ve argon ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. (4)

Eritropoetin (EPO), eritropoezin uyarılması için hayati önem taşıyan endojen bir glikoprotein olup, deneysel çalışmalarda hipoksik iskemik beyin hasarında nöroprotektif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. EPO ayrıca bir beyin yaralanmasını takiben astrositlerdeki nöronal ve glial dokuda da sentezlenmektedir (4,38,39). EPO uygulamasının tek başına (4,40,41) veya hipotermi tedavisi ile kombinasyon halinde (4,42) umut verici sonuçları olmuştur.

N asetil sistein, hipotermi ile birlikte uygulandığında, hipoksiye maruz kalan yenidoğan sıçanlarda beyin enfarktüsü hacminin azalması ve lokomotor aktivitenin artması gibi açılardan iyi sonuçlar sergilemiştir (4,43).

Makrolid bir antibiyotik olan azitromisinin yenidoğan sıçanlarda nöroprotektif etkisi bildirilmiştir (4,44).

Leptin, esas olarak adipositler tarafından üretilen ve hipotalamustaki iştah merkezlerini baskılayan peptid hormonudur (4,45). Leptin, antiapoptotik işlev ve nörotrofik özellikler sergiler ve beyin gelişiminde rol oynar (4,46,47).

Epifiz bezinden salgılanan ve sirkadiyen ritmi düzenleyen melatonin antiapoptotik ajan olarak nöroprotektif etkiler gösterir, inflamasyonu azaltır (4, 48-51). Melatonin ile bilişsel yeteneklerde iyileşme ile enfarktüs hacminde önemli azalma gösterilmiştir (4,52).

Hipotermi tedavisi ile birlikte allopurinol verildiğinde sıçanlarda enfarktüs hacminde bir azalma olduğu gösterilmiş (4,53) olsa da, yenidoğanlarda, allopurinol ile yapılan klinik çalışmalar, mortalitede veya nörogelişimsel yetersizliklerde herhangi bir azalma göstermemiştir (4,54,55).

Mevcut durumda destekleyici tedavi ile terapötik hipotermi, HİE'li bebekler için onaylanmış tek tedavi olma özelliğini devam ettirmektedir.

2.2. Rifampisin Molekülü ve Etki Mekanizması

Rifamisin ilaç grubu rifampin, rifapentin ve rifabutin alt gruplarını içeren bir antibiyotik kümesidir. Rifamisinler ilk olarak 1957'de Streptomyces mediterranei (daha sonra Nocardia mediterranei olarak adlandırılmıştır) nin fermentasyon kültüründen izole edilmiştir. Rifampin, yarı sentetik bir rifamisin türevidir olup, rifampisin olarak da bilinir. Klinikte en çok kullanılan rifamisin türevidir. 1963'te İngiltere'de ve 1964'te Amerika Birleşik Devletleri'nde patent almıştır. Rifampisin tüberküloz dahil olmak üzere mikobakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde diğer ajanlarla kombinasyon halinde ilk basamak tedavide kullanılır. Ayrıca invazif stafilokok enfeksiyonlarında da kombinasyon tedavisinin bir parçası olarak kullanılmaktadır (56).

Rifampisin, bakteriyel Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) bağımlı Ribo Nükleik Asit (RNA) polimerazı inhibe ederek hücrel RNA'nın doğrudan bloke edilmesini

sağlayarak etki gösterir (57). DNA bağımlı RNA polimeraz inhibisyonu doğrudan doz bağımlıdır ve hücre içi komponentleri olan bir süreçtir (58).

Rifamisin ilaç gurubu, hücre içi etki mekanizmalarının dışında sitokrom P450 enzim sistemi (özellikle CYP3A4) üzerinden metabolize edilen ilaçların temel indükleyicileri arasında yer alır. Rifampisin, P-glikoprotein (P-gp) çoklu ilaç dışı akış taşıyıcılarını da indüklemektedir, çeşitli mekanizmalarla hücre içi veya metabolik süreçleri de tetikleyebilmektedir (59). İzah edilen etkilerinden dolayı bir antibiyotik olmanın ötesinde çeşitli biyolojik etkileri de olan bir tedavi ajanıdır.

Rifampisinin hücre içi penetrasyonu son derece yüksektir ve hücre içi patojenlerin tedavisi için son derece etkili bir ajandır (56). Mycobacterium tuberculosis tedavisinde ekseri suşlara karşı etkin hücre içi ve bakterisidal aktivite sergilediği için diğer ajanlarla birlikte combine olarak kullanılır (56,59).

Rifampisinin, pek çok enfeksiyon ajanına karşı da geniş spektrumlu bir etkisi vardır. M. tuberculosis, diğer tüberküloz suşları, S. aureus, koagülaz negatif stafilkoklar, Streptococcus pyogenes, Chlamydia spp ve Legionella spp, Brucella spp, Streptococcus pneumoniae, streptococcus viridans ve menenjit etkenleri olan Listeria monocytogenes, H. influenzae, Haemophilus ducreyi, N. meningitidis, Neisseria gonorrhoeae de dahil bir çok farklı etkenin bir çok farklı dokuda oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır (60).

2.2.1 Rifampisinin Antibiyotik Dışı Etkileri

Rifampisin antibiyotik etkileri dışında, çeşitli immünmodülatör etkilerinin, antienflamatuar etkilerinin, antiviral etkilerinin ve nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Etkin doku geçişi ve proliferative – protektif mekanizmalarının gösterilmesi ile popüler bir ajan haline gelmiştir. Rifampisin ile ilgili deneysel çalışmalarda ratlarda romatolojik ve nörolojik hastalık modellerinde olumlu etkileri gösterilmiştir.

2.2.1.a. Rifampisinin İmmünmodülatör Etkileri

Bellahsene A ve ark.(61) 1980 yılında rifampisin hücre içi ve dışı yollar üzerinden humoral ve hücreli bağışıklığı baskılayarak kalp allogreftlerinin hayatta kalma süresini uzattığını göstermişlerdir (61). Pahlevan A ve ark. (62) 2002 yılında rifampisin içinde bulunduğu rifamidlerin TNF ile indüklenen Nükleer Faktör Kappa B (NF-KB) aktivasyonunu inhibe etme potansiyelini göstermişlerdir (62). H. M. Zılgam ve ark. (63) 2004 yılında rifampisin, insan monositleri tarafından salgılanan sitokinlerin salgılanmasını değiştirme kapasitesi sayesinde immünomodülatör etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda rifampisin monositlerden IL-6 ve IL-10 salınımını artırırken TNF-a ve IL-1B salınımını baskıladığını göstermişlerdir (63).

Seung Keun Kim ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada rifampisin NF-kappaB'nin DNA bağlama aktivitesinin baskılanması yoluyla Toll Like Reseptör 2(TLR2)'yi inhibe etmesinin, rifampisin immün baskılayıcı etkilerinin yeni bir mekanizması olabileceğini belirtmişlerdir. (64)

Tsiskarishvili N ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada psöriaziste rifampisin kullanımının T hücre fonksiyonları üzerine etkileri olduğunu göstermişlerdir (65). Yine karpal tünel sendromu gibi immün paterni olabilen mekanik hastaların tedavisinde dahi potansiyel bir immünomodülatör olarak değerlendirilmesini sağlayan bir yazı yayınlanmıştır (66). Bu immün etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber tüm bu çalışmalar bu molekülün farklı etkileri olabileceğini düşündürmüştü ve yeni çalışmaların başlamasını sağlamıştır.

2.2.1.b. Rifampisinin Nörolojik Etkileri

1992'de McGeer ve ark. (67) uzun süreli tedavi alan lepralı hastalarda demans prevalansının önemli ölçüde azalmış olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmadan sonra rifampisin nörolojik etkileri üzerine yoğunlaşmış ve konu ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır.

Namba ve ark. (68) demansı olmayan lepralı hastaların beyin dokularını incelemiş ve demansı olmayan 140 Japon yaşlı denekte nörofibriler yumakları ve senil plakları

immünohistokimyasal boyama yoluyla karşılaştırmışlardır. Yıllarca rifampisin tedavisi gören demans gelişmeyen yaşlı lepralı hastaların, aynı yaştaki kontrollere kıyasla beyinlerinde senil plak olmadığını rapor etmişlerdir.

Yulug B. ve ark. (69) 2004 yılında yaptıkları çalışma ile geçici ve kalıcı fokal serebral iskemi sonrası rifampisinin nöroprotektif etkisini göstermişlerdir. Çalışmada, orta serebral arterleri kalıcı veya geçici tıkanıklığa tabi tutulmuş farelere; kalıcı iskemiden hemen önce ve 30 dakikalık geçici iskemiden hemen sonra rifampisin uygulanmıştır. 5 mg/kg rifampisin uygulanan, 20 mg/kg rifampisin uygulanan ve rifampisin uygulanmayarak 0.3 ml %10 etanol intraperitoneal uygulanan gruplar oluşturulmuştur. 20 mg/kg rifampisin ile tedavi edilen grupta enfarktüs boyutu önemli ölçüde daha küçük olduğu gözlenirken, 5 mg/kg rifampisinin etkili olmadığı gözlenmiştir. 20 mg/kg'lık rifampisin uygulanan grupta serebral iskemiden sonra önemli bir nöroproteksiyon gözlenmiştir. Yaygın doku hasarının gözlemlendiği striatumdaki terminal deoksiniükleotidil transferaz aracılı dUTP nick-end etiketleme (TUNEL) pozitif hücre sayısı, rifampisin verilmeyen gruba kıyasla rifampisin uygulamasıyla azalmıştır. Bu çalışma ile rifampisin uygulamasının farelerde kalıcı ve geçici fokal serebral iskemi sonrasında beyin hasarını etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir.

Parkinson hastalığı (PD), substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların kaybindan kaynaklanan motor semptomlarla karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. PD'nin karakteristik histopatolojik özellikleri arasında nöronal ölüme ek olarak, inflamatuvar süreçler ve intranöronal protein birikimi bulunmaktadır. Nöronal perikaryada (Lewy cisimcikleri) ve nöronal süreçlerde (Lewy nöritleri) lokalize proteinli inklüzyonlar esas olarak α -sinükleinden (α S) oluşur. (70).

2007 yılında Xu ve ark. yaptıkları çalışma ile rifampisinin PC12 feokromositoma hücrelerini, hem apoptoz hem de nekroz yollarını tetiklemekte kullanılan metil fenil pridinyum ile provoke edilen apoptoza karşı koruduğunu göstermişlerdir. Yine bu çalışma ile rifampisinin Parkinson hastalarında görülen mutasyona uğramış bir presinaptik protein olan alfa-sinüklein multimerlerinin ekspresyonunu inhibe ettiğini, dolayısıyla önemli bir nörolojik komorbidite olan Parkinson hastalığından kordüğünü göstermişlerdir (71).

Acuña L ve ark. (72), rifampisin (Rif) ve onun otoksidasyon ürünü rifampisin kinonun (RifQ) anti-inflamatuar ve nöroprotektif aktivitelerini değerlendirmek için rekombinant insan α S'nin fibriler formları tarafından aktive edilen beyin mikrogliyal hücre kültürlerini kullandıkları çalışmada, Rif ve RifQ ile ön tedaviler, prototipik inflammatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-6) salgılanmasını ve α S fibril agregatları ile aktive olan mikrogliyal hücrelerde oksidatif stres patlamasını azalttığı gösterilmiştir. TNF- α ve IL-6 seviyelerinin de ölçüldüğü çalışmada, Rif veya RifQ ile yapılan tedavilerin salgılanan sitokin seviyelerini önemli ölçüde azalttığı da gösterilmiştir.

Yukarda hipoksik beyin hasarının patolojisinden bahsedilirken değinildiği gibi, beyinde mikrogliya, nöronal destek, sinaptik modülasyon, nöronal devrenin yeniden düzenlenmesi ve önemli miktarda antimikrobiyal peptit üretimi gibi çok çeşitli işlevleri yerine getirir. Mikrogliyal aktivasyon, nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde, özellikle de hipoksik hasar oluşumunda önemli rol oynayan bir süreçtir. Mikrogliyal aktivasyonun düzenlenmesi potansiyel nörodejenerasyonun progresyonunun önlemesi açısından kritik kabul edilmektedir. Wei Bi ve ark. (73), 2011 yılında yaptıkları hayvan deneylerinde, mikrogliyalı indüklediği gösterilen lipopolisakkarit bir proinflammatuar mediatör olan BV-2 sinyal yolunun rifampisin molekülünün yarışmalı inhibisyonu ile kontrol edildiği göstermişlerdir. Bu çalışmada, rifampisin, lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen proinflammatuar mediatörlerin üretimi ve BV2 mikrogliadaki sinyal yolları üzerindeki etkilerini incelenmiş, ayrıca mikrogliya ve nöronların ortak kültürü kullanılarak rifampisin nöroprotektif etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, rifampisin, indüklenbilir nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz-2, tümör nekroz faktörü- α ve interlökin 1 β 'nin LPS ile uyarılan ekspresyonunun yanı sıra nitrik oksit ve prostaglandin E2 üretimini inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca, rifampisin, nükleer transkripsiyon faktörü NF-kappa B inhibitörünün bozunmasını bloke ederek LPS ile indüklenen nükleer faktör-kappa B aktivasyonunu bastırmıştır. Mikrogliya'nın rifampisin ile ön inkübasyonu, mikrogliya-nöronal ortak kültür sisteminde nörotoksiteyi azaltmış ve nöron sağkalımını iyileştirmiştir. Rifampisin iNOS ekspresyonu ve NO üretimi üzerindeki etkisini incelemek için, mRNA ve protein seviyelerinin yanı sıra LPS ile uyarılan BV2 mikrogliadaki nitrit birikimi ölçülmüş, rifampisin tedavisinin, LPS ile indüklenen iNOS mRNA ve protein ekspresyonunu doza bağımlı bir şekilde büyük ölçüde inhibe ettiği gözlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda rifampisin eklenmesinin,

LPS ile indüklenen TNF-a ve IL-1 β ifadesinde doza bağı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Çalışmalar, mikrogladaki proinflamatuvar mediatörlerin inhibisyonunun Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), travma, multipl skleroz (MS) ve serebral iskeminin şiddetini azalttığını göstermiştir (73-78)

Liang Y ve ark. (79) 2015'te rifampisin molekülünün hücre düzeyindeki etkilerini nöromoleküler metodlar ile değerlendirmiş ve NLRP3 ile Kaspaz-1 moleküllerinin ekspresyonları üzerine bir çalışma yapmışlardır. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks I'inin bir inhibitörü olan rotenon, ROS oluşturabilen elektron sızıntısına neden olarak oksidatif strese yol açtığı ve rotenonun p38 sinyal yolunu kullanarak mikroglia aktivasyonunu indüklediğini bildiren çalışmalar mevcuttur (79,80). Nöroinflamasyonda merkezi bir sinyal yolu olan NLRP3 enflamasyonu, nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. Reaktif oksidatif stresin (ROS) aktivatörlerinden biri olan NLRP3, ayrıca hücre içi ROS ve mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) saptamak için sırasıyla 20, 70-Diklorodihidrofloresein diasetat boyaması ve Rhodamine123 boyaması kullanıldığı çalışmanın sonuçları, rifampisinin, rotenon ile tedavi edilen BV2 hücrelerinde hücre içi ROS'u açıkça azalttığını ve MMP kaybını tersine çevirdiğini doğrulamış, ayrıca rifampisinin rotenon kaynaklı sitotoksite ve BV2 mikroglia'da IL-1 β 'nin gen ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Ayrıca western blot analizi, rifampisin ön işleminin kaspaz-1 bölünmesini ve NLRP3'ün protein ekspresyonunu inhibe ederek NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunu baskıladığını doğrulamıştır.

Rifampisin tedavisinin, LPS tarafından indüklenen mikroglada TLR-4 ekspresyonunu ve NF- κ B'nin nükleer transferini inhibe ettiğini ileri süren (79,81), ayrıca rifampisinin glutasyonu artırarak ve oksidatif stresi azaltarak apoptozu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. (79,82)

Zahednasab H ve ark. (83), rifampisinin demiyelinizasyon, gliozis, apoptoz, inflamasyon, behavioral disfonksiyon ve kuprizon demiyelinizasyon modelindeki biyokimyasal değişiklikler üzerindeki etkinliğini incelemişlerdir. Multipl skleroz (MS), patogenezinde nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonun rol oynadığı bir SSS hastalığı

olup, demiyelinasyonun nedeni oligodendrosit kaybıdır (83,84). Hastalarda oluşan ROS nöral hasarın ilerlemesinde ve miyelin kılıfının yıkımında rol oynar (83,85). Tersine çevrilebilir demiyelinasyonu indükleyen bir madde olan kuprizon kullanılan çalışmada, deney farelerine, 6 haftalık kuprizon tedavisinin son 7 gününde seri dozlarda rifampisin (10, 20 veya 40 mg/kg verilmiştir. Beş hafta boyunca fareleri cuprizone ile beslemek, farelerin kat ettiği mesafede önemli bir azalmaya ($p < 0.01$) neden olmuştur. Rifampisin uygulaması, açık alan aparatı ile ölçülen farelerin hareketlerini önemli ölçüde arttırmıştır ($p < 0.01$). Sağlıklı farelere uygulandığında ise rifampisin tarafından ne hareket hızı ne de hareket mesafesi etkilenmemiştir. Sonuçlar, rifampisin uygulamasının motor davranışsal eksikliklerde iyileşmeye yol açtığını göstermiştir. Apoptotik hücre ölümünü tespit etmek üzere DNA fragmentasyonunu boyamak için TUNEL testi kullanıldığı çalışmada, rifampisin, inter lökin-6, interlökin-1 β , kaspaz-12 aktivitesi, heme oksijenaz-1, NO ve malondialdehit düzeylerini önemli ölçüde düşürmüştür. Bir antiapoptotik olan Bcl-2 proteininin seviyeleri faktörü, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kuprizon ile tedavi edilen farelerde önemli ölçüde daha düşük bulunmuş, rifampisin verilen farelerde Bcl-2 seviyeleri, altı hafta boyunca kuprizon verilen farelere göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Kaspaz-12'nin aktivitesi, cuprizone ile tedavi edilen farelerde kontrolden daha yüksek olup, rifampisin verilmesi, bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Yine bu çalışmada cuprizone alan fare beyinlerinin korpus kallozumunda astrogliosis, astrositlerin birikmesine neden olmuş, GFAP'ye karşı antikorlar, cuprizone ile beslenen farelere kıyasla rifampisinin korpus kallozumdaki astrosit sayısını azalttığını göstermiştir. Mikrogliazun derecesi, beyin bölümlerinin korpus kallozumunda Iba-1'e karşı antikorlar aracılığıyla değerlendirilmiş, kuprizon ile tedavi edilen farelerde mikroglia sayısının arttığı gözlenmiştir. Buna karşın rifampisin verilmesi, aktif mikroglia sayısını azaltmıştır. Rifampisin, sırasıyla aktif astrositlerin ve mikrogliaların sayısını kontrol etmek için GFAP ve Iba-1 ifadelerini başarıyla modüle etmiştir. Histopatolojik bulgular, rifampisinin istatistiksel olarak remiyelinizasyonu desteklediğini, mikrogliaz ve astrogliozu azalttığını göstermiştir.

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir sisteminde çözünemeyen yanlış katlanmış protein kümelerinin birikmesi ile karakterize bir grup hastalık olup özellikle Alzheimer hastalığı, amiloid-y kümelerinin hücre dışı birikintilerini ve hiperfosforile tau

kümelerinin hücre içi intensiteleri ile karakterize kronik progresif bir hastalıktır (86). Hücre içi tau inklüzyonları, Pick hastalığı, kortikobazal dejenerasyon, progresif supranükleer felç, arjirofilik tahıl hastalığı, kromozom 17'ye (FTDP-17) bağlı frontotemporal demans ve parkinsonizmi gibi hastalıklar benzer nörodejeneratif süreçlere sahip hastalıklardır ve bu hastalıklarda amiloid-targeting-hedefleme terapilerinin son dekadların güncel konularındandır (86). Bu temelde, Tomohiro ve ark. hayvan modelleriyle yaptıkları çalışmada rifampisin, curcumin, epigallocatechin-3-gallate, myricetin ve scyllo-inositol moleküllerinin içeren ardışık amyloid hedefleme tedavilerini denemiştirler. Bu çalışmada rifampisin, geniş spektrumunu gösteren amiloid-, tau ve a-sinükleinin oligomer oluşumunu inhibe etmesi ve bu moleküller içerisinde amiloid-ve tau oligomerlerine karşı inhibe edici etkilerinin olması, APP OSK farelerinde (amiloid-lig oligomer modeli), Tg2576 farelerinde (Alzheimer hastalığı modeli) ve tau609 farelerinde (tauopati modeli) etkilerinin olması ile en önemli protektif ajan olarak öne çıkmıştır (86).

Yapılan bilişsel deneylerde de (Morris su labirenti kullanılarak yapılan çalışmalar gibi) 1 mg / gün rifampisinin farelerin hafızasını transgenik olmayan yavru kontrollerine göre benzer bir seviyeye gelecek düzeyde geliştirmiştir; rifampisin ayrıca sitokrom c'yi de inhibe ederek hipokampusta mitokondri ve kaspaz 3 aktivasyonundan salınımlarını etkilemesine bağlı olarak bilişsel fonksiyonlarda bir iyileştirme göstermiştir (86).

Alzheimer Hastalığı'nın nöropatolojik özelliği, önemli nöronal hücre ölümü ve ilgili beyin atrofisi ile ilişkili hücre dışı senil plakların ve hücre içi nörofibriler yumakların birikmesidir, beyinde etkilenen bölgelerdeki nörodegeneratif değişiklikler, hastalığın herhangi bir belirtisinin ortaya çıkmasından yıllar önce başlar (87). Erken nöroinflamatuvar yanıt ve mikrogial aktivasyon yoluyla ilgili nöronal disfonksiyon ve inflamatuvar belirteçlerin (yani, indüklenebilir nitrik oksit, nitrik oksit ve tümör nekroz faktörü- α) düzeylerini artırmadaki kritik rolüne dayalı olarak birlikte ele alındığında, erken AD'deki hafıza kaybı, uygun anti-inflamatuvar, anti-oligomerik ve rifampisin gibi nöroprotektif ajanlarla tersine çevrilebileceği düşünülmüştür (87). Ancak klinik deneylerde beklenen başarı elde edilememiştir. Klinik deneylerdeki başarısızlığın, muhtemelen tedavinin geç zamanlaması ve yetersiz dozajından kaynaklandığı düşünülmüştür (87).

2.2.2 Rifampisin Kullanımının Kısıtlılığı, Rifampisine Direnç

Rifampine direnç, yaygın ve güncel kullanımın önündeki en temel problem olarak görülmektedir. (59). Mycobacterium tuberculosis ve Staphylococcus aureus dahil olmak üzere çeşitli bakterilerde ortaya çıkar. M. tuberculosis'in rifampine tek aşamalı mutasyon yoluyla spontan direnç oranı 8-10 basilde 1'dir ancak diğer bakteri türlerinde (örn., Escherichia coli, S. aureus , Streptococcus spp ve N. meningitidis) direnç oranı daha yüksektir (88,89). Direnç gelişme hızı yüksek ve öngörülebilir olduğundan, rifampin yalnızca N. meningitidis veya H. influenzae'ye karşı profilaksi için veya organizma yükünün nispeten düşük olduğu M. tuberculosis için monoterapi olarak önerilebilir. (89). Mikroorganizma temelli direnç mekanizmalarının, antibiyoterapi dışı amaçla kullanıldığında ne derece tetiklenilmekte olduğu bilinmemektedir ancak potansiyel olarak bu mutasyonun tetikleyici süreçleri ortaya çıkmadığı sürece direnç açısından bir risk olmaması da teorik olarak söz konusudur (89).

2.2.3. Rifampisinin Farmakokinetiği

Rifampisin, oral uygulamadan sonra hızlı ve tam emilime uğrayan eski bir ajandır. Absorpsiyon, formülasyona bağlı olabilir ve oral doz aç karnına alındığında daha iyiye yemekle birlikte alındığında ve diyabet ve / veya HIV enfeksiyonu olan hastalarda azalabilir (90). Temelde polimorfonükleer lökositlerde olmak üzere hücre içi olarak hücre dışı konsantrasyonların beş katına kadar penetre olabilen, %80 proteinlere bağlanan bu ajanın en önemli özelliklerinden birisi de beyin omurilik sıvısına ve pek çok vücut dokusuna / sıvısına yaygın ve etkin bir geçişinin olmasıdır (90). Bu etkisi hem antibiyotik olarak kullanımındaki en kuvvetli yönünü oluşturmaktadır, hem de non-süpüratif süreçlerde kullanımını pekiştiren önemli unsurlardan birisi olmuştur.

Rifampisinin yarılanma ömrü üç saattir. İnaktif metabolitlerinin yoğun bir karaciğer metabolizmasına uğramasına karşın, ilacın renal eliminasyonu minimal olarak kabul edilir (<%30) (90). Bu nedenle böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlamasına gerek yoktur. Bununla birlikte, rifampisin, özellikle izoniazid gibi diğer hepatotoksinlerle kombinasyon halinde kullanıldığında karaciğer enzimlerini etkileyebileceği için dikkatli olunmalıdır (90).

2.2.4 Tüberküloz Tedavisinde Rifampisin Kullanımı

Tüberküloz tedavisi için normal yetişkin rifampin dozu, günlük veya haftada üç kez verilen 10 mg / kg'dır (günlük maksimum 600 mg). İntravenöz dozlar, ağızdan uygulananlara benzerdir (58). Normal pediyatrik doz aralığı, günlük olarak doğrudan gözlemlenen tedavi ile verilen günde 10 ila 20 mg / kg'dır (maksimum 600 mg'a kadar). Oral dozlar yemeklerden bir saat önce veya iki saat sonra uygulanmalıdır (58). M. tuberculosis'e karşı rifampin için terapötik serum konsantrasyonu, 8 ila 24 mikrogram / mL'lik iki saatlik bir doz sonrası konsantrasyondur.

S. aureus'a bağlı protez kapak endokarditi olan yetişkinler için önerilen rifampin dozları sekiz saatte bir 300 mg'a kadardır (91). Bu, diğer antistafilokok tedavisi ile kombinasyon halinde 6 hafta süreyle uygulanabilir (91). Diğer invaziv stafilokok enfeksiyonları (osteomyelit, protez eklem enfeksiyonları ve menenjit gibi) için rifampin tedavisi önerileri genellikle günde 600 ila 900 mg (genellikle iki bölünmüş dozda) kullanır (91).

Böbrek fonksiyon bozukluğu olan veya diyalize giren hastalar için doz ayarlamasına gerek yoktur. Her ne kadar altta yatan karaciğer disfonksiyonu olan hastalara rifampin uygulanmasında dikkatli olunması gerekse de, bu popülasyonda dozlamaya rehberlik edecek resmi bir kılavuz bulunmamaktadır. Bununla birlikte, belirgin karaciğer yetmezliği olan hastalarda metabolizmanın önemli ölçüde değişebileceği bilinmektedir (91).

2.2.5 Rifampisinin Potansiyel Yan Etkileri ve Olumsuz Yanları

Hastalara, rifampinin tipik olarak vücut sıvılarında (idrar, ter, tükürük ve gözyaşı dahil) turuncu veya kırmızı-turuncu renk değişimine neden olduğu klinikte bilinmektedir. Rifampin uygulamasıyla ilişkili yan etkiler arasında gastrointestinal etkiler (bulantı, kusma, ishal), santral sinir sistemi etkileri (baş ağrısı, ateş), dermatolojik etkiler (döküntü, kaşıntı, kızarma) ve hematolojik etkiler (trombositopeni, nötropeni ve akut hemolitik anemi) sayılabilir (90,92).

Hepatit rifampin kullanımı ile görülse de sık bir yan etki olarak kabul edilmez (92). Sadece eşzamanlı hepatotoksik diğer ilaçların (izoniazid benzeri) uygulanması, HIV

komorbid enfeksiyonu, karaciğer hastalığı öyküsü, düzenli alkol tüketimi, predispozan faktörleri olan hastalarda daha sık görülür (89,92). Nedeni bilinmemekle beraber latent tüberküloz enfeksiyonu olan ve iki aylık rifampin / pirazinamid rejimi ile tedavi edilen hastalarda yüksek bir hepatotoksisite insidansı gözlenmiştir (92). Bu nedenle, sonraki kılavuzlar bu rejimin kullanımına karşı tavsiyelerde bulunmuştur. Rifampin, uygulamadan bir ila iki saat sonra başlayan ve altı ila sekiz saat sonra çözülen grip benzeri bir sendroma neden olabilir (92). Tipik olarak, bu sendrom, özellikle yüksek dozlarda, günlük tedaviden ziyade aralıklı olarak daha yaygın olarak ortaya çıkar.

Ağır rifampin ile ilişkili reaksiyonlar olarak anafilaksi, kutanöz vaskülit, kırmızı hücre aplazisi, lökopeni ve agranülositoz, trombositopeni, yaygın intravasküler koagülasyon, hemolitik anemi, pulmoner infiltratlar, lupoid reaksiyonlar ve akut böbrek yetmezliği sayılmaktadır (90,92).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamız, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanarak tıbbi etik açısından uygun bulunmuş (Tarih: 02.12.2020, Karar No:20/153), Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2021-11087 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Çalışma, Ocak 2020 – Temmuz 2021 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ile Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Merkezi koordinasyonunda hayvan deneyi araştırma projesi olarak tarasarlandı, çalışmaya Kasım 2020’de başlandı ve Mart 2022’de çalışma sonlandırıldı.

3.1 Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde üretilmiş olan 1 aylık Sprague Dawley cinsi 48 adet erkek sıçan kullanıldı. Her bir grupta 12 adet olmak üzere 4 gruba ayrılan sıçanlar, 12 saat ışık 12 saat karanlık saat döngüsü içerisinde standart sıçan kafeslerinde, standart oda sıcaklığında, musluk suyu ve standart sıçan yemi ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi. Bir deney sonunda ağırlığı ölçülen sıçanlar, inhalasyon yoluyla %100 O₂ içerisinde %5 izofloran bulunan anestezi odasına konularak anestezi altına alındı. Ölüm kardiyak ventriküler insizyon yoluyla açık göğüs anevrizması ile doğrulandı.

3.2 Deney Grupları ve İlaç Uygulamaları

Deney hayvanları, her bir grup 12 adet sıçan içeren 4 gruba ayrıldı. Toplamda 48 adet sıçan kullanıldı. Grupların dizayn edilmesinde, hipoksiye maruz kalmayan normoksi grubu ile diğer grupların karşılaştırılması ve ayrıca hipoksiye maruz kalıp rifampisin verilmeyen grup ile rifampisin verilen grupların karşılaştırılması amaçlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Deney grupları. N_KON: Normoksik kontrol grubu, H_KON: Hipoksik kontrol grubu, ASH_RİF_7G: Hipoksiye maruz kalıp 7 gün rifampisin verilen grup, ASH_RİF_14G: Hipoksiye maruz kalıp 14 gün rifampisin verilen grup.

Durum	Gruplar				
	N_KON	H_KON	ASH_RİF_7G	ASH_RİF_14G	
tedavi	tedavi yok	tedavi yok	Rifampisin	Rifampisin	
tedavi süresi	yok	yok	7 gün	14 gün	
N _{Toplam}	12	12	12	12	48

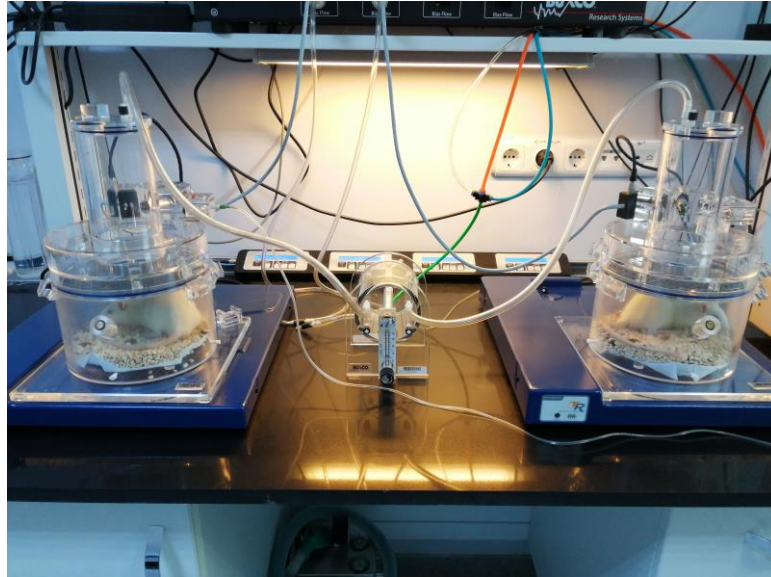
3.3. Fizyolojik Ölçümler

Akut sürekli hipoksi (ASH) modeli oluşturmak için barometrik bütün vücut pletismografi (WBP) kullanıldı. Sıçanlar WBP odalarına konulmadan önce bir basınç kalibrasyon sinyali Drorbaugh ve Fenn denkleminde (Drorbaugh, J.E. ve Fenn, W.O. 1955) kullanılan; pletismograf içinin sıcaklığı, sıçan vücut sıcaklığı, çevresel ve normobarik oda içi basıncı ve sıçan vücut ağırlığı parametreleri her nefes alımı ve verimi için dakikadaki ventilasyon ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$), frekans (nefes/dak) ve tidal volüm ($\text{ml}/100 \text{ g}$) hesaplanması için kullanıldı (Biosystems XA software; Buxco Electronics, Wilmington, NC). Normoksi ve/veya hipoksi koşullarında bulunan sıçanlar bütün vücut pletismograf odalarına (model PLY3213; Buxco Electronics, Wilmington, NC) konuldu ve ardından normobarik odalara giden basınçlı havanın 6 L/dk'lık eğilimli bir akış göstermesi sağlanarak inspire edilen havanın gaz kompozisyonunun kontrol edilmesi, O₂ ve CO₂ miktarlarının değiştirilmesi ve CO₂ birikimini önlemesi için kütle akış kontrolörü (MFC-4 Sable Systems, Inc. Las Vegas, NV) kullanıldı. Fizyolojik ölçümlere başlanmadan önce sıçanların 30 dk boyunca aklimatizasyonu sağlandı. (Wilkinson, K.A. vd. 2011). Dizayn edilen zaman periyodları içerisinde solunum parametreleri sürekli olarak ölçülürken sıçanların uyanık veya sakin olduğu zaman

durumları analiz için kullanıldı. Verilerin kabul edilebilirliği için gözler açık, vücut hareketinin olmadığı ve bilgisayar ekranında normal bir solunum modelinin sürekli izlendiği alanlar göz önünde bulunduruldu. Sıçanların uyuduğu veya uyku halinde olduğu gözlemlendiyse veri optimizasyonunun sağlanması için bu veriler kullanılmadı (Liu, C. vd. 2011).

3.3.1 Akut Sürekli Hipoksi Modeli Oluşturulması ve WBP Ölçüm Protokolü

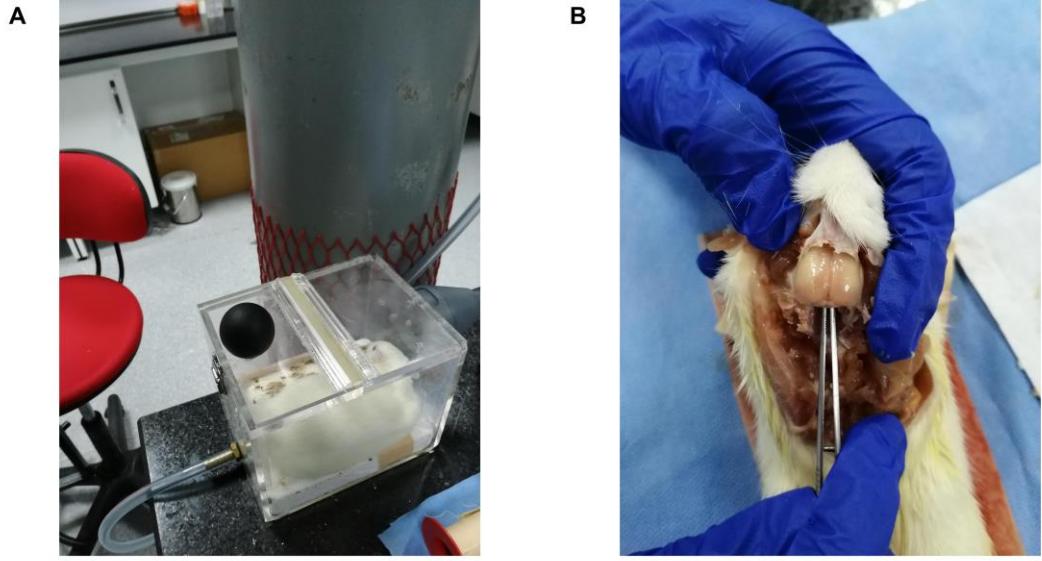
Akut Sürekli Hipoksi modeli uygulanan, solunum parametreleri ölçülen sıçanlar, ölçüm yapılacağı gün plestismografi odası içerisinde ilk **30 dk** boyunca %21 O₂ seviyesinde aklimatize olmalarına izin verildi. Aklimatizasyon işleminden sonra **30 dk** boyunca normoksik koşullardaki (FI_{O2}= 0.21 ve FI_{CO2}= 0.003 (N₂ ile balans)) gaz fraksiyonunda bazal ventilasyon ölçümü yapıldı. Normoksik koşullardaki bazal ventilasyon ölçümünden sonra **15 dk** boyunca (FI_{O2}= 10.0 ve FI_{CO2}= 0.03 (N₂ ile balans)) akut sürekli hipoksiye maruz bırakıldıktan sonra tekrar reoksijenizasyon sağlanıp **15 dk** boyunca normoksik gaz fraksiyonlarına dönüldü. Toplam **90 dakika** sonra ölçüm sonlandırıldı (Wilkinson, K.A. vd. 2010, 2011). Herbir grupta bulunan sıçanların WBP ölçümü bitiminden sonra akut hipoksiye maruz kalan ilaç gruplarına 1 hafta ve 2 hafta süreyle 20 mg/kg intraperitoneal rifampisin verilmiştir. Rifampisin uygulaması yapılan gruplar aynı WBP ölçüm protokolü ile akut HVR ölçümü yapıldı.



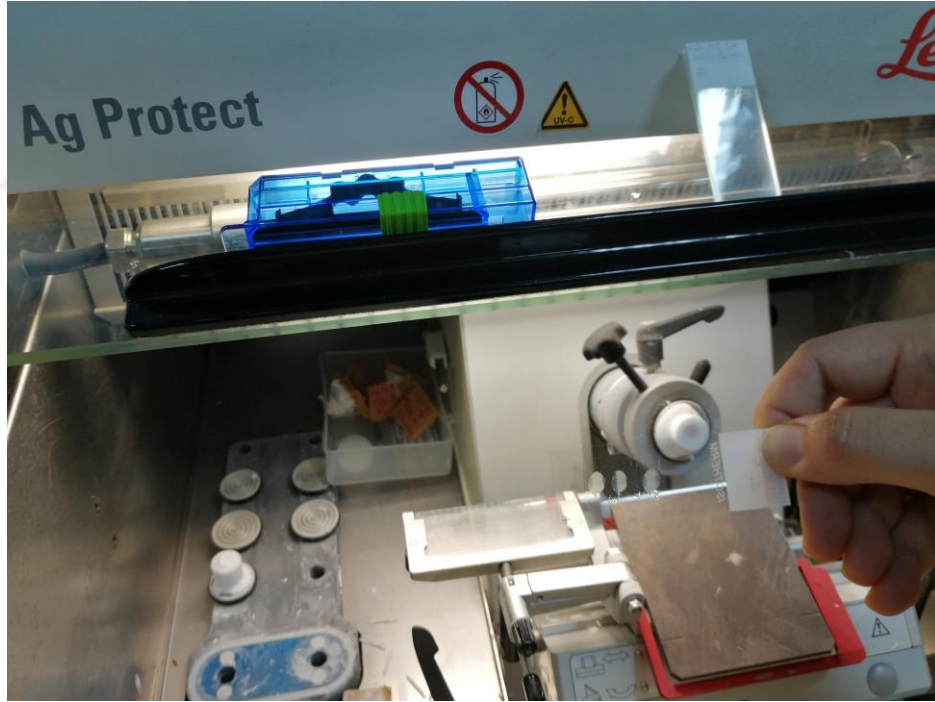
Şekil 3.1. Akut sürekli hipoksi modeli oluşturulan bütün vücut plestismografisi (WBP) sistemi.

3.4 Doku Perfüzyonu, Dokuların Çıkarılması ve Doku Kesitlerinin Alınması

Bir deney sonunda ağırlığı ölçülen sıçanlar, inhalasyon yoluyla %100 O₂ içerisinde %5 izofloran bulunan anestezi odasına konularak anestezi altına alındı ve ölüm kardiyak ventriküler insizyon yoluyla açık göğüs anevrizması ile doğrulandı. Ötenazi işleminin ardından 0.4 ml heparin (1000 ünite/ml) intraperitonel (IP) olarak yapıldı ve birkaç dakika beklendi. Sıçanlar sol ventrikül/aortik kateterizasyonla buz içerisinde tutulan 40 ml serum fizyolojik ve sonrasında 0.01 M tuz tamponu (PBS tablet, Sigma Aldrich pH= 7.4) ile vücuttaki tüm kan uzaklaştırılana kadar ve hemen sonrasında %4' lük paraformaldehit (Parafolmaldehit Granular, MERCK) tamponu ile perfüze edildi. Daha sonra beyin korteksinden doku kesitleri almak için dokular çıkarılarak immunofloresan çalışması için işleme alındı. Çıkarılan dokular +4°C derecede bir gün veya iki gün PBS içinde çözünmüş %2' lik paraformaldehit tamponu içerisinde tutuldu. Daha sonra yine PBS içinde çözünmüş %30' luk sükröz çözeltisi içerisine transfer edilerek +4°C' de 2 veya 3 gün solüsyon içerisinde batana kadar muhafaza edildi. Teneke kutu içerisine konulan izopentan, sıvı nitrojen kabına sarkıtılacak ve doku preperatları bir mantar parçasına otutturularak doku yapıştırıcı O.C.T. Compound (Tissue-Tek, Sakura) ile izopentan içerisinde donduruldu. Dondurulan dokular -80 °C derecede saklandı. Tüm dokular hazır olduğunda donduruculu karyostat (CM 1860 UV, LEICA, Germany) kullanılarak -20 °C derecede 5 µm kalınlığında transvers kesitler alındı. Toplanan beyin dokuları daha sonra immünofloresan boyama çalışılmak üzere antifriz solüsyonuna (%50 PBS, %30 etilen glisol, %20 gliserol) konularak -20 °C derecede saklandı (Wilkinson, K.A. vd. 2010, 2011; Nichols, N.L. vd. 2012; Satriotomo, I. vd. 2009; Satriotomo, I. 2012).



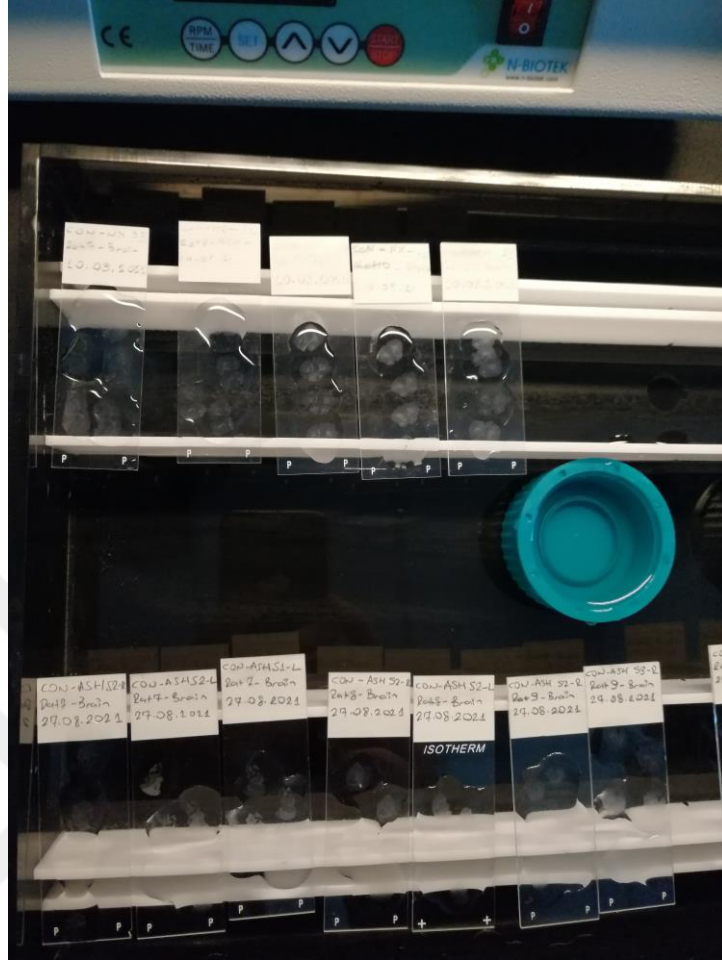
Şekil 3.2. (A) İzofluran bulunan anestezi odasında ötenazi uygulaması. (B) Beyin dokusunun çıkarılması.



Şekil 3.3. Dondurucu karyostat ile 5 μ M kalınlığındaki beyin doku kesitlerinin alınması.

3.5 Astrositlerin ve Mikrogliaların İmmunofloresan Etiketlenmesi ve Floresan Mikroskobunda Görüntüleme

Doku perfüzyonu işlemi yapılan her gruptan 6 sıçanın beyin dokusu çıkarılarak önce %4 PFA solüsyonunda, sonraki gece %30 süktroz çözeltisinde bekletildi. Dokular OCT (Tissue-Tek, Sakura) solüsyonu ile donduruldu. 5 µM kalınlığındaki beyin doku kesitleri donduruculu karyostat ile alındı. (Cryostat, LEICA, Germany). Alınan kesitler lam üzerinde sıralandı. Kesitler 3 kez x 10 dakika boyunca fosfatla tamponlanmış serum (PBS) ile yıkandı. Yıkama sonrasında dokular oda sıcaklığında 1 saat boyunca %0,5 Triton X-100 içeren PBS solüsyonuyla ardından 1 saat de %5' lik keçi serumu içeren PBS solüsyonu ile nem odasında inkübe edildi. Mikroglia hücrelerini göstermek amacıyla iyonize kalsiyum bağlayan adaptör molekül 1 (Iba-1) rabbit anti-Iba-1 1/2000 (PA5-27436, Invitrogen), astrosit hücrelerini göstermek amacıyla glial fibriller asidik protein (GFAP) chicken anti-GFAP 1/2000 (ab4674, Abcam) birincil antibodyleriyle işaretlendi. 2 gün boyunca +4°C sıcaklıkta birincil antibodyleri içeren %5' lik keçi serumu içeren PBS solüsyonu ile nem odasında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler PBS solüsyonuyla 3 kez 10 dakika yıkandı. Primer antibodylerle işaretlediğimiz hücrelere özgü moleküllerin belirli spektrum aralığında floresan veren 647-goat-antichicken 1/1000 (A-21449, Abcam), 488-goat-antirabbit 1/500 (A-32723, Abcam), 350-goat-antimouse 1/1000 (A11045, Abcam) ikincil antibodylerimizle işaretlenmesi için oda sıcaklığında nem odasında 2 saat süresince inkübasyonu yapıldı. İnkübasyon sonrasında kesitler PBS solüsyonuyla 3 kez 10 dakika yıkayıp temiz bir peçete yardımıyla dikkatlice silindikten sonra DAPI ile bloke edilip lamel yardımıyla kapatılarak görüntüleme için hazır hale getirildi. Spektral dekonvolüsyon floresan mikroskop (ZEISS AxioScop, Germany) kullanılarak 10X ve 20X büyütme kesitleri görüntülemek için kullanıldı (Tadmouri, A. vd. 2014; Taft, J.R. vd. 2015; Stokes, J.A. vd. 2017).



Şekil 3.4. İmmüofloresan antibodyler ile hücre çekirdeği, astrosit ve mikrogliaların işaretlenmesi

3.6 Astrosit aktivasyonunun miktarının belirlenmesi

Aktive olan astrositler GFAP salgılamaktadır (Eng, L.F. ve Ghirnikar, R.S. 1994). Astrositlerin aktivasyonun primer ve sekonder antibodylerle boyadığımız GFAP 'in görüntülerde verdiği ortalama renk dansitesi üzerinden ImageJ (FIJI; software v. 2.0.0) programında analizler yapıldı. Analizler için aynı programın Analiz - Ölçüm Yardımcısı (Analyze - Masure tool) kullanıldı. Seçilen alan içerisinde ortalama florasan değeri veren GFAP + alanların DAPI ile ko-lokalizasyonu üzerinden hücrelerin sayımı yapıldı (Stokes, J.A. vd. 2017).

3.7 Mikroglia aktivasyonunun miktarının belirlenmesi

Mikrogliaların immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesinde güvenle kullanılan belirteçlerden biri olan Iba-1 kullanıldı (Chen, Z. vd. 2012; Ito, D. vd. 2001; Stokes, J.A. vd. 2013). Uyarılan mikroglialar, hücre şekillerinde belirli değişiklikler yapmaktadırlar (Fontainhas, A.M. vd. 2011; Morrison, H.W. ve Filosa, J.A. 2013). Analizler için aynı programın Analiz-Ölçüm Yardımcısı (Analyze - Meseure tool) kullanıldı. Seçilen alan içerisinde ortalama floresan değeri veren Iba-1 + alanların DAPI ile ko-lokalizasyonu üzerinden hücrelerin sayımı yapıldı (Stokes, J.A. vd. 2017). (Stokes, J.A. vd. 2017).

3.8 İstatistiksel Analiz

Bütün istatistikler ham veriler üzerinden değerlendirildi. Veriler grup ortalamaları $\pm$ SEM (ortalamanın standart hatası) şeklinde sunuldu. İstatistik Analiz PRISM (Graphpad Software Inc., Version 9.0.1.) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Ventilasyon verileri 2-yönlü ANOVA testi sonrası Bonferroni test yöntemiyle analiz edildi (Wilkinson, K.A. vd. 2010). Astrosit ve mikroglia aktivasyonu akut hipoksi sonrası için tek-yönlü ANOVA sonrası Uncorrected Dunn's test yöntemiyle analiz edildi (Stokes, J.A. vd. 2017). 2-yönlü ANOVA sonrası FISHER' s LSD testi çoklu karşılaştırmalı normoksi ve hipoksi süresince gelişen glial hücrelerin aktivasyonuna kontrol grupları ve intraperitoneal rifampisin etkisini değerlendirmek amacıyla kullanıldı. Kullanılan istatistiksel yöntemler, p-değerleri ve semboller her şekil için not edildi.

4. BULGULAR

4.1. Akut Sürekli Hipoksi Gruplarında Rifampisin Uygulamasının Solunum Parametreleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Tüm grupların deney öncesi fizyolojik ölçümleri (solunum frekansı (fR), tidal volüm (Vt), ventilasyon (V) ve V/VCO_2) yapıldı. Her bir grubun kendi içinde protokol öncesi ve sonrası değerlerin kıyaslanması açısından sakrifikasyon işlemi öncesi yeniden fizyolojik ölçümler yapıldı (Tablo 4.1, Tablo 4.2). V/VCO_2 değeri metabolizmanın göstergesi olarak kullanılmaktadır. Normoksik kontrol grubunda, hipoksi protokolü uygulanmadığı için başlangıçtaki değerler ile sakrifiye edilmeden önceki değerler kıyaslandı. Hipoksik gruplardan, ilaç verilmeyen grupta başlangıçtaki değerler ile hipoksi maruziyeti sonrasında sakrifiye olmadan önceki değerler kıyaslandı, ilaç verilen gruplarda ise başlangıçtaki değerler ile hipoksi maruziyeti sonrası 7 gün ve 14 gün rifampisin verildikten sonra sakrifiye edilmeden hemen önceki değerler kıyaslandı. İlaç verilen ve verilmeyen grupların değerleri de birbirleriyle karşılaştırılarak Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 ile gösterilen grafikler elde edildi.

Normoksi grubunda başlangıçtaki solunum frekansı, tidal volüm ve ventilasyon değerleri ve CO_2 metabolizması ile, sakrifiye edilmeden önceki değerler arasında anlamlı farklılık bulunmadı (Tablo 4.1).

Hipoksik kontrol grubunda başlangıçtaki değerler ile hipoksi sonrası değerler kıyaslandığında solunum frekansında anlamlı bir değişiklik olmadı. Tidal volüm ve ventilasyon değerleri ise anlamlı olarak arttı ($p=0.006$). CO_2 metabolizmasında ise anlamlı bir farklılık olmadı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Normoksik kontrol grubu ve hipoksik kontrol gruplarının deney öncesi ile sonrasında sakrifiye edilmeden önceki solunum frekansı (f_R), tidal volüm (V_t), ventilasyon (V) ve ventilasyon başına tüketilen karbondioksit oranı (V / V_{CO_2}) metabolizması değerlerinin karşılaştırması. Tabloda anlamlılık koyu renk yazılarak belirtilmiştir.

KONTROL (KON)			p
f_R (br/min)	Bazal	Bazal	0,500
Mean	138	131	
Std. Deviation	14	13	
Std. Error of Mean	4,1	3,9	
V_t (ml/min)			>0,9999
Mean	4,4	4,5	
Std. Deviation	0,39	0,54	
Std. Error of Mean	0,12	0,16	
V (ml/min * kg)			>0,9999
Mean	586	571	
Std. Deviation	56	63	
Std. Error of Mean	17	19	
V / V_{CO_2}			0,529
Mean	301	323	
Std. Deviation	33	43	
Std. Error of Mean	10	13	

HİPOKSİ KONTROL (H-KON)			p
f_R (br/min)	Bazal	HVR	0,275
Mean	125	115	
Std. Deviation	13	15	
Std. Error of Mean	3,9	4,4	
V_t (ml/min)			0,006
Mean	5,6	7,3	
Std. Deviation	0,85	1,5	
Std. Error of Mean	0,25	0,42	
V (ml/min * kg)			0,006
Mean	663	809	
Std. Deviation	60	126	
Std. Error of Mean	18	38	
V / V_{CO_2}			0,437
Mean	320	372	
Std. Deviation	30	50	
Std. Error of Mean	11	18	

Hipoksi sonrası 7 gün intraperitoneal rifampisin uygulanan grupta, frekans değeri başlangıca göre anlamlı olarak azaldı ($p=0,0064$), tidal volüm ve ventilasyon değerleri ve CO_2 metabolizması anlamlı olarak arttı ($p<0,0001$) (Tablo 4.2).

Hipoksi sonrası 14 gün intraperitoneal rifampisin uygulanan grupta, frekans değeri başlangıca göre anlamlı olarak azaldı ($p=0,0162$), tidal volüm anlamlı olarak arttı

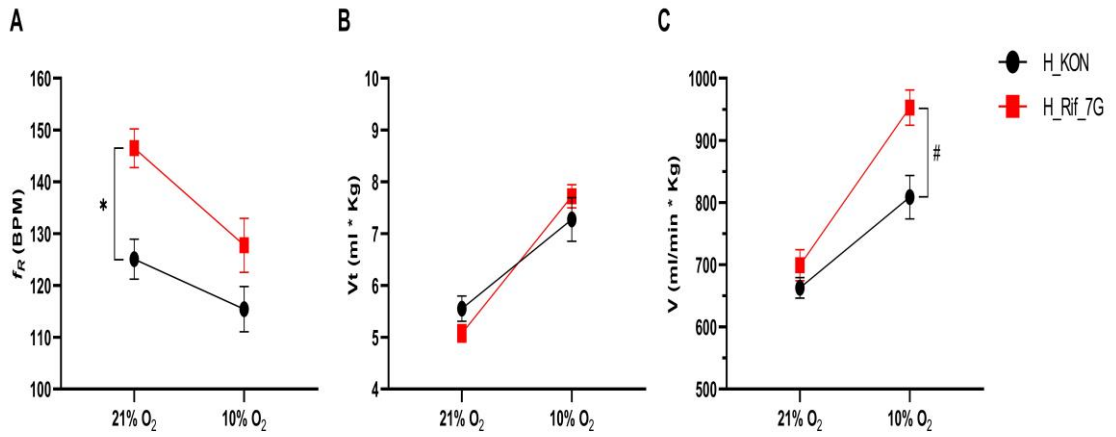
($p<0.0001$), ventilasyon değerleri anlamlı olarak arttı ($p=0,0002$) ve CO_2 metabolizması anlamlı olarak arttı ($p=0,0043$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hipoksi sonrası 7 gün ve 14 gün rifampisin verilen grupların deney öncesi ile sonrasında sakrifiye edilmeden önceki solunum frekansı (f_R), tidal volüm (V_t), ventilasyon (V) ve ventilasyon başına tüketilen karbondioksit oranı (V / V_{CO_2}) metabolizması değerlerinin karşılaştırması. Tabloda anlamlılık koyu renk yazılarak belirtilmiştir.

H_Rif_ 7G *				
fR (br/min)	Bazal	HVR	p	
Mean	147	128	0,0064	
Std. Deviation	13	18		
Std. Error of Mean	3,7	5,2		
Vt (ml/min)			<0,0001	
Mean	5,1	7,7		
Std. Deviation	0,58	0,77		
Std. Error of Mean	0,17	0,22		
V (ml/min * kg)			<0,0001	
Mean	699	964		
Std. Deviation	91	95		
Std. Error of Mean	27	29		
V / VCO2			<0,0001	
Mean	316	408		
Std. Deviation	28	32		
Std. Error of Mean	8	9,4		

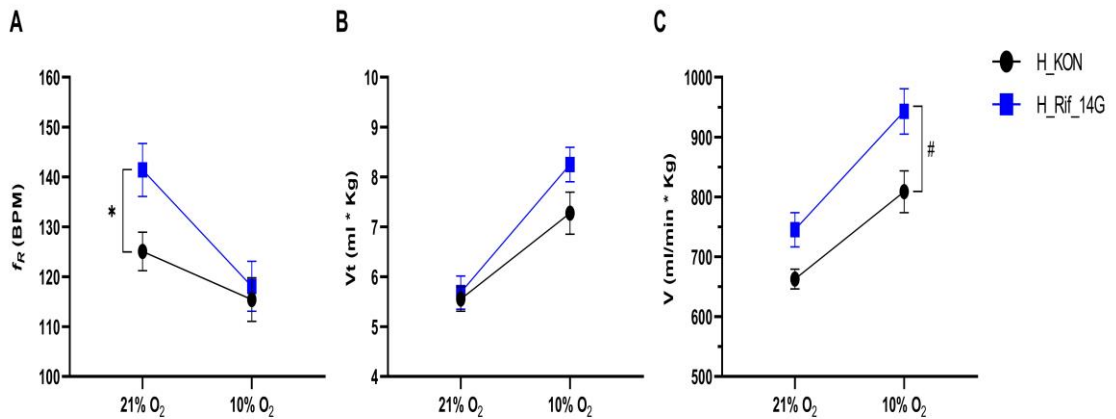
H_Rif_ 14G *				
fR (br/min)	Bazal	HVR	p	
Mean	141	118	0,0162	
Std. Deviation	18,43	17,27		
Std. Error of Mean	5,319	4,986		
Vt (ml/min)			<0,0001	
Mean	5,682	8,252		
Std. Deviation	1,146	1,199		
Std. Error of Mean	0,3309	0,3461		
V (ml/min * kg)			0,0002	
Mean	745,2	942,9		
Std. Deviation	99,56	130,9		
Std. Error of Mean	28,74	37,78		
V / VCO2			0,0043	
Mean	343	402,1		
Std. Deviation	37,27	53,69		
Std. Error of Mean	10,76	15,5		

Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup karşılaştırıldığında, 7 gün rifampisin verilen grupta frekansın anlamlı olarak azaldığı, tidal volümde anlamlı değişiklik olmadığı, ventilasyon değerlerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.1).



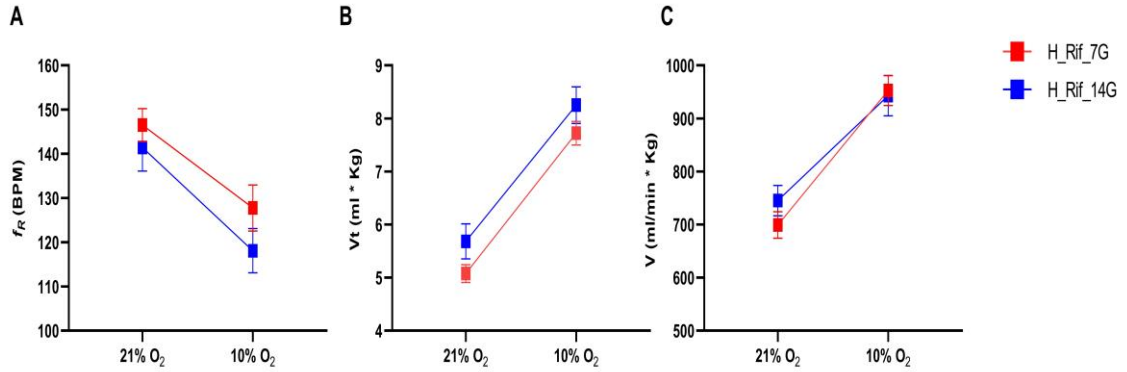
Şekil 4.1. Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grubun Frekans-Tidal Volüm- Ventilasyon grafiklerinin karşılaştırılması A. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının frekans değerlerinin grafiği B. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının tidal volüm değerlerinin grafiği C. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının ventilasyon değerlerinin grafiği. Anlamlılık (*) işareti ile gösterilmiştir.

Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grup karşılaştırıldığında, 14 gün rifampisin verilen grupta frekansın anlamlı olarak azaldığı, tidal volümde anlamlı değişiklik olmadığı, ventilasyon değerlerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.2).



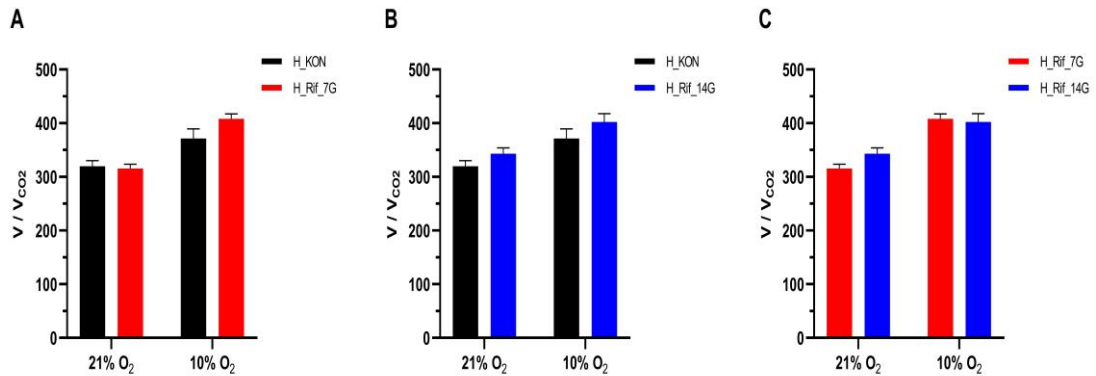
Şekil 4.2. Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grubun Frekans-Tidal Volüm- Ventilasyon grafiklerinin karşılaştırılması A. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının frekans değerlerinin grafiği B. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının tidal volüm değerlerinin grafiği C. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının ventilasyon değerlerinin grafiği. Anlamlılık (*) işareti ile gösterilmiştir.

Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup ile hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grup karşılaştırıldığında, frekans, tidal volüm ve ventilasyon değerlerinde anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



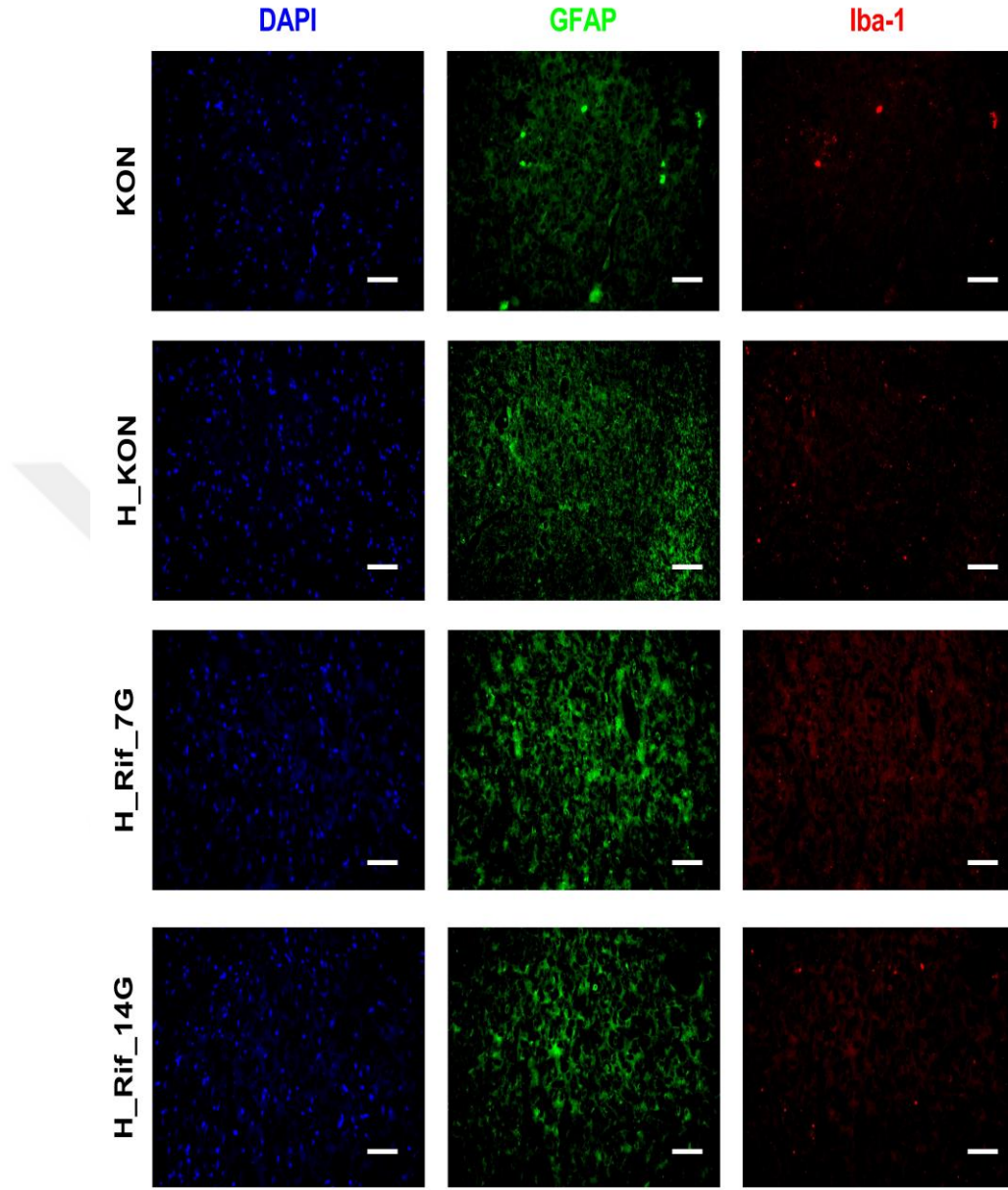
Şekil 4.3. Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup ile hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grubun Frekans-Tidal Volüm- Ventilasyon grafiklerinin karşılaştırılması A. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının frekans değerlerinin grafiği B. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının tidal volüm değerlerinin grafiği C. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının ventilasyon değerlerinin grafiği. Anlamlılık (*) işareti ile gösterilmiştir.

Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 7 ve 14 gün rifampisin uygulanan gruplar (Şekil 4.4) (A) ve (B)) ve 7 ve 14 gün uygulama yapılan gruplar (Şekil 4.4 (C)) arasında metabolizma (V/V_{CO_2}) ölçümlerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı.



Şekil 4.4. Hipoksik kontrol grubu ile hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup ve hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grubun CO₂ metabolizmasının göstergesi olan V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması A. H_KON ve H_Rif_7G deney gruplarının V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması B. H_KON ve H_Rif_14G deney gruplarının V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması C. H_Rif_7G ve H_Rif_14G deney gruplarının V/V_{CO_2} grafiklerinin karşılaştırılması.

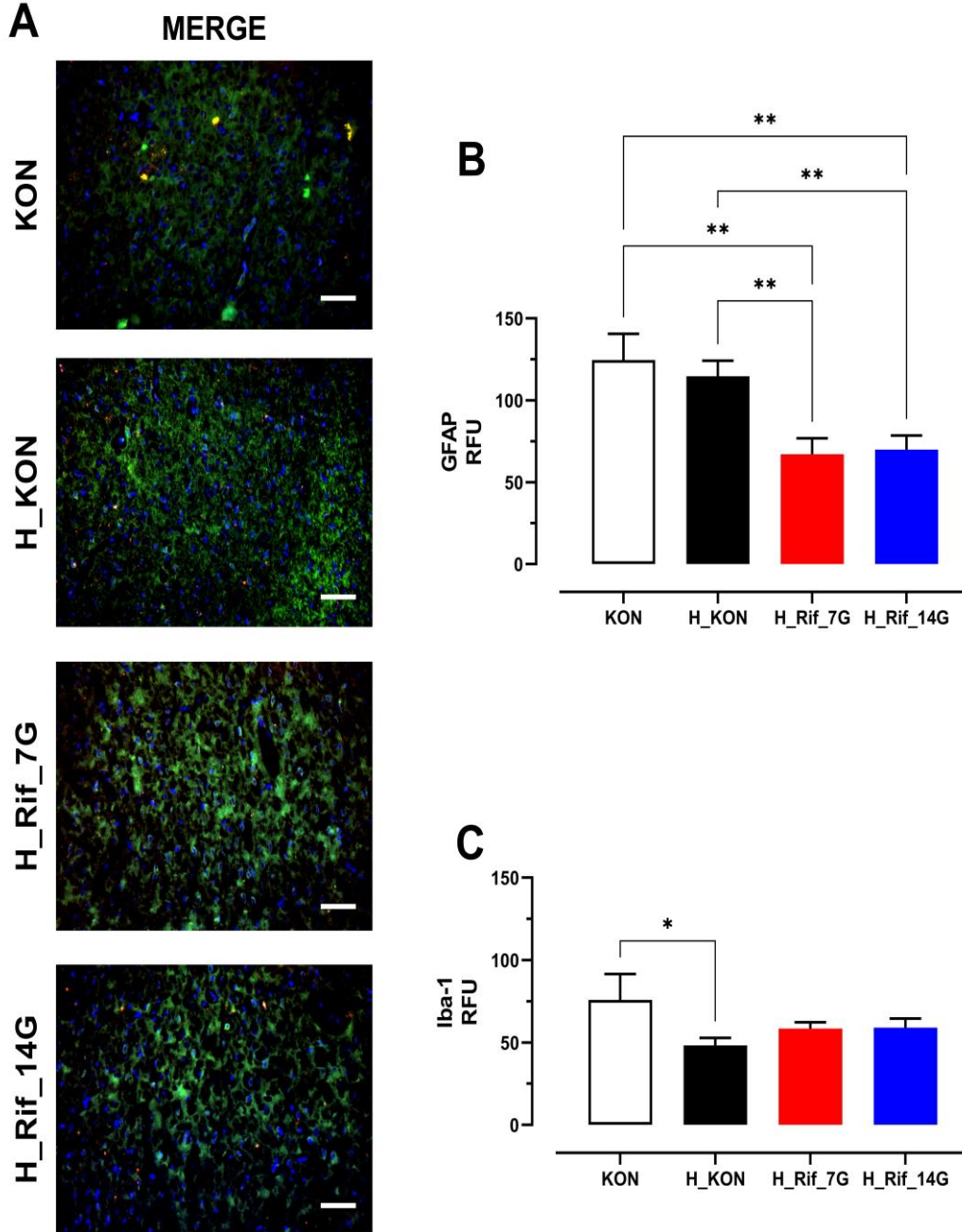
4.2. Akut Sürekli Hipoksi ve Normoksi Gruplarının İmmüno Floresans Boyama Bulguları



Şekil 4.5. Beyin dokusundan alınan kesitlerde beyin dokusu korteks bölgesinde mikrogliya ve astrosit belirteçleri kullanılarak deney grupları karşılaştırılması.

Şekil 4.5'te gösterildiği gibi yapılan immünfloresan boyama yöntemi ile glial hücre aktivasyonunun rifampisin ile baskılanıp baskılanmadığının gösterilmesi amaçlandı. 10x ve 20x lik objektiflerde görüntü alındı. Her gruba eş zamanlı olarak immüno florans protokolü uygulandı. GFAP; aktif astrositleri boyandı. Alexa Flour 488 dalga boyu ile Yeşil renk ikincil antikor ile işaretlendi. IBA-1; Aktif mikrogliarın tayini için kullanıldı. Alexa Flour 594 dalga boylu kırmızı renk ikincil antikor ile işaretlendi. DAPI:

Çekirdeklerin boyanması için kullanıldı ve mavi renk ışıma verdi. Rifampisin ilaç uygulaması yapılan H_Rif_7G ve H_Rif_14G akut sürekli hipoksi deney gruplarında astrosit aktivasyonunun baskılandığı, mikroglia aktivasyonunun ise baskılanmadığı gözlemlendi (N = 6 hayvan / grup; * p <0.05).



Şekil 4.6. (A) Beyin dokusundan alınan kesitlerde beyin dokusu korteks bölgesinde mikroglia ve astrosit belirteçleri kullanılarak elde edilen görüntülerin birleştirilmesi. (B) Deney gruplarının GFAP ile verdikleri görüntünün istatistiksel olarak karşılaştırılması. (C) Deney gruplarının IBA-1 ile verdikleri görüntünün istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Beyin korteks bölgelerinden alınan görüntülerde hücre çekirdekleri (mavi renk ışıma veren DAPI belirteci ile), astrositler (yeşil renk ışıma veren GFAP belirteci ile) ve mikroglialar (kırmızı renk ışıma veren IBA-1 belirteci ile) bir arada görüntülendi (Şekil 4.6 (A)).

Grupların GFAP ile verdiği yeşil renk immünofloresan boyamanın istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4.6 (B)). Hipoksik kontrol grubu ile normoksi grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grupta GFAP ile verilen yeşil renk boyama hem normoksi grubuna hem de hipoksik kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grupta da GFAP ile verilen yeşil renk boyama hem normoksi grubuna hem de hipoksik kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup ile 14 gün rifampisin verilen grup karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

Grupların IBA-1 ile verdiği kırmızı renk immünofloresan boyamanın istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4.6 (C)). Hipoksik kontrol grubunda kırmızı renk immünofloresan boyama normoksi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grupta ve hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grupta IBA-1 ile verilen kırmızı renk boyamada normoksi grubuna göre anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grupta ve hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grupta IBA-1 ile verilen kırmızı renk boyamada hipoksik kontrol grubuna göre de anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grup ile 14 gün rifampisin verilen grup karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Hipoksi sonrası 7 gün rifampisin verilen grupta ve hipoksi sonrası 14 gün rifampisin verilen grupta IBA-1 ile verilen kırmızı renk boyamanın hipoksik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında normoksik gruba yaklaştığı gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Sistemik hipoksi periyodlarına maruz kalınması (akciğer hastalıkları, uyku apnesi veya yüksek irtifada yaşayan yerliler gibi), primer olarak karotid organ içerisinde yer alan arteriyel kemoreseptörler aracılığı ile ventilasyonun hipoksiye verdiği cevap, vücudun ilk savunma hattıdır (93). Bu cevabın net etkisi, hipoksiye maruz kalmanın modeline (aralıklı veya sürekli nöbet), yoğunluğuna (günler, haftalar veya aylarca sürmesi) ve şiddetine (PaO_2 değerindeki düşüş) bağlı olarak farklı mekanizmalar arasındaki etkileşimle gerçekleşmektedir (94). Hipoksik uyarının modeline bağlı olan hipoksik ventilatuar cevaptaki (HVR) değişiklikler, artan nörotransmitter salınımı gibi geçici sinaptik aktiviteyi değiştiren kısa zamanlı (akut sürekli hipoksi) etkilerle sonuçlanır. Hipoksiye akut yanıt, bir hipoksik uyarının başlangıcını takiben ventilatuar aktivitenin ani artışıdır ve tipik olarak, bazal ölçüme göre göre hem fR hem de V_t 'de artışları içerir. Akut HVR, herhangi bir hipoksik stimülasyon boyunca devam eder ve hipoksinin giderilmesinden hemen sonra sona erer. Bu durum karotid organda PaO_2 'de bir değişiklik tespit edildikten sonra başlar. Bunun yanında, akut HVR'yi ölçmeye yönelik çoğu deneysel girişim muhtemelen kısa zamanlı potansiyelizasyon (STP) ve/veya hipoksik ventilatuar düşüşün (HVD) bileşenlerini içerir. Bunun nedeni, bu erken zaman alanlarının tipik olarak hipoksinin başlangıcından sonraki birkaç dakika içinde ortaya çıkması ve maruziyetin ilk dakikalarındaki ventilasyon yanıtlarının doğru kaydedilmesini sağlamak için O_2 gerilimlerini yeterince hızlı bir şekilde değiştirmenin sıklıkla deneysel olarak zorlayıcı olmasıdır. Örneğin, standart pletismografi yaklaşımları uygulandığı takdirde, hayvan hipoksik odada iken hipoksik gaz karışımı ve

normoksik gaz karışımlarını temizlemek için birkaç dakika gerekebilir. Sonuç olarak, araştırmacılar, bu tez çalışmasında yer alan WBP veri analizlerinde yaptığımız gibi, kararlı durumdaki ilk solunum ölçümlerini akut yanıt olarak adlandırırlar (95). Bu nedenle çalışma dizaynında immünfloresan değerlendirmelerle metabolik ve ventilasyon ilişkili parametrelerde etki mekanizmasının anlaşılması amacıyla dahil edilmiştir.

Çalışmamızda, normoksi grubunda başlangıçtaki solunum frekansı, tidal volüm ve ventilasyon değerleri ve CO₂ metabolizması ile, sakrifiye edilmeden önceki değerler arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Bu sonuçlar, deney süresince geçen 2 haftada ratların büyümesine bağlı olarak gerçekleşebilecek fizyolojik değişikliklerin deney sonuçlarını etkileyebilecek düzeyde olmadığını göstermektedir. Hipoksik kontrol grubunda başlangıçtaki değerler ile hipoksi sonrası değerler kıyaslandığında solunum frekansında anlamlı bir değişiklik olmadı. Tidal volüm ve ventilasyon değerleri ise anlamlı olarak arttı ($p=0.006$). CO₂ metabolizmasında ise anlamlı bir farklılık olmadı. Ayrıca KON grubuna göre 7 gün ve 14 günlük uygulamalarda ventilasyon başına düşen CO₂ üretimi oranı, aynı indirekt metabolizma ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ((Şekil 4.4 (A – B – C)). Hipokside etkinliği gösterilen geleneksel hipotermi tedavilerinden farklı olan bu bulgular, metabolik değişkenlerin çoğunlukla ilk 6-12 saatlerde olması, ancak bizim hayvan deneyimizin daha uzun boylamsal süreçleri ve özellikle 24 saatten sonra ortaya çıkan reaktif metabolik süreçleri içine alması nedeniyle farklılık gösterebilir.

Bulgularımız göstermektedir ki hipoksi sonrası 14 gün intraperitoneal rifampisin uygulanan grupta, solunum frekans değeri başlangıca göre anlamlı olarak azaldı ($p=0,0162$), tidal volüm anlamlı olarak arttı ($p<0.0001$), ventilasyon değerleri anlamlı olarak arttı ($p=0,0002$) ve CO₂ metabolizması anlamlı olarak arttı ($p=0,0043$). Ayrıca metabolik temelli solunum regülasyonunda özellikle santral ve kısmen periferik (üst solunum yollarında, trakeada, akciğerlerde, göğüs duvarında ve pulmoner damarlarda bulunan) kemoreseptörlerin önemli rolü vardır. CO₂ artışına verilen ventilasyon yanıtı öncelikle merkezi kemoreseptörlerin aktivitesini yansıtırken PaCO₂'deki artışlara yanıt olarak ventilasyondaki artış doğrusaldır. Sonuçta bizim verilerimiz göstermektedir ki 7 gün boyunca rifampisin uygulanan sıçanlarda, kontrol grubuna göre akut HVR' de

hipoksik koşulda anlamlı bir artış bulundu. Buna karşın her iki grupta normoksida anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.1 (C)). Ventilasyon parametresi ölçümünde gösterildiği üzere kontrol grubuna göre 7 gün boyunca uygulanan rifampisin akut HVR'yi köreltmediği, aksine arttırdığı bulundu. 14 gün boyunca rifampisin uygulanan sıçanlarda, kontrol grubuna göre akut HVR' de hipoksik koşulda anlamlı bir artış bulundu (Şekil 4.2(C)).

Hipoksi maruziyetinden sonra MSS' deki hasarın histopatolojisinde, nöroenez, sinaptogenez ve aksonal büyüme azalırken, inflamasyon artışı söz konusudur (12). Glial hücrelerden; MSS'nin iyonik ve nörotransmitter homeostazını sürdürmek, sinaptik bağlantıları iyileştirmek ve nöronal metabolik substratlar sağlamak gibi fonksiyonları olan astrositler ile, normal zamanlarda dinlenme durumunda bulunarak MSS ortamında bağışıklık ve patolojik sinyaller açısından tarama yapan, sinaptik elementleri indükleyerek veya çıkararak nöronal aktiviteyi modüle etmek, ekstrasellüler boşluğu temizlemek gibi fonksiyonları olan mikrogial hücreler (14), MSS sistemindeki hasarlanmadan sonra gliosis dokusunun oluşumunu görev alırlar. Sinaptik aktivitede gerçekleşen değişimler hem nöron hem de glial hücre aktivasyonunun hipoksi boyunca ve sonrasındaki etkileşimleri ile gerçekleşmektedir. Potansiyel hipoksi – nörogial sekel ilişkisinde rifampisin molekülünün potansiyel astrosit/mikrogial etkinliğinin saptanması bu nedenle önemlidir ve takip edecek çalışmalarda bir terapötik ajan olarak yerini de ortaya koyabileceği için bu temelde bir çalışma dizaynı oluşturulmuştur. Çünkü astrositlerin akut hasarlanmadan sonra nöronal hayatta kalmayı ve işlevi desteklemesi için hastalıkta uygun astrosit-mikroglia çapraz etkileşimi gereklidir.

Bu tez çalışmasında rifampisinin hipoksi modelindeki ikincil etkileri değerlendirilmek üzere solunum parametrelerinin fizyolojik ölçümleri yapılmış, bunun yanı sıra immünofloresan mikroskopisi kullanılarak deneysel hipoksi oluşturulmuş ratların beyin kesitlerinde astrosit ve mikrogialların aktivitesi değerlendirilmiştir. Deneysel olarak hipoksiye maruz bırakılmış olan ratlardan rifampisin verilen ve verilmeyen gruplar ile hipoksiye hiç maruz kalmamış olan kontrol grubunun solunum parametreleri fizyolojik olarak ölçülmüş, ayrıca alınan beyin kesitlerinde astrosit markeri olan GFAP ve mikroglia hücrelerinin markeri olan IBA-1 immünofloresan mikroskopisiyle incelenmiştir. Çalışmamızın sonuçları, literatürde daha önce gözlemlenmiş olan

rifampisinin nörogelişimsel basamaklardaki pozitif etkilerinin, beyin dokusundaki inflamasyonun baskılanması ile ilişkili olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Nöronal hasar sonrasında mikrogliyal hücrelerde oluşan değişiklikler, hasar veya dejenerasyona MSS doku tepkisini temsil eder. Mikrogliyal reaksiyona ikincil olarak, mikrogliaya sinyal veren inflamasyon araçları salgılayan astrositlerin aktivasyonu vardır. Reaktif astrositler GFAP sentezi artar, morfolojik değişikliklere uğrarlar ve bu da etkilenen bölgede hasarı sınırlayabilen glial skar oluşumuna yol açar (32). GFAP, astrosit hücre iskeletini oluşturan ara filamentler oluşturduğundan, GFAP ekspresyonundaki bir artış, morfolojinin değişmesine ve hücrelerin dallanmasının artmasına neden olur. Genellikle, yüksek GFAP ekspresyonu astrosit aktivasyonunun göstergesi olarak kabul edilir. (21). Literatürdeki bir çok deneysel çalışma, mikrogliadaki proinflamatuvar mediatörlerin inhibisyonunun alzheimer, parkinson, travma, multipl skleroz ve serebral iskeminin şiddetini azalttığını göstermiştir (14,74-78). Daha önce deney hayvanlarında nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisi içerisinde yer alan glial hücre aktivasyonuna bağlı olarak farklı deneysel modellerde beyin dokusunda glial hasarı azalttığı ve farklı hücresel mekanizmalar üzerinden nöroprotektif özellikleri gösterilmiş olan rifampisinin bu potansiyel immünmodülatör etkilerinin akut hipoksi modelinde ne derece etkin olduğu bilinmemektedir. Bu çalışma rifampisinin akut hipoksi modeli oluşturularak glial hücre aktivasyonuna etkisinin değerlendirildiği ilk çalışma özelliğine sahiptir.

Mevcut literatür çalışmaları değerlendirildiğinde göstermektedir ki hipoksik sekellerde (hipoksik iskemik ensefalopati, akut hipoksi, perinatal asfiksi vb) oluşan hücresel hasarın derinleşmesinde oluşan ‘injury-induced inflammatory response’ (hasar ilişkili iltihabi cevap) önemli ve kritik bir rol almaktadır. Bu bulgular temelinde yapılan bazı çalışmalar bu hasarı derinleştiren inflamasyonun bastırılmasını hedeflemiş ancak genel olarak başarısız olmuşlardır ve hem derinleşen hasarın hem de gliozisin önüne geçilemediği görülmüştür (96). Takip eden çalışmalarda bu inflamasyonda mikrogliyal hücrelerin kritik rollerinin saptanması, proinflamatuvar etkilerinin yanında özellikle de hasar sonrası 24. saatten sonra çeşitli gen ekspresyonlarında (NLRP3 inflamassome vb) artışla beraber baskın proinflamatuvar fenotip oluşturmalarının görülmesi doğrudan inflamasyon oluşmadan bu mekaniği hedef alan tedavilerin gündeme alınması ihtiyacını

doğurmuştur (97). Ancak kan beyin bariyeri, hedefe yönelik antikorların yetersizliği, beyin metabolizmasındaki değişkenlikler ve glial hücrelerin değişken mizaçları nedeniyle henüz denenilen tedavilerde (glukokortikoidler, eritropoetin, minoksilin, Notoginsenoside R1, Breviscapine vb) etkin bir sonuç alınmamıştır (96).

Astrositler, glial hücreler içerisinde heterojen bir popülasyon olarak bulunur ve bazıları kemosenitif olmakla beraber sinapslarda nörotransmitter kullanılabilirliğini düzenlerler (14). Astrositler, SSS'nin iyonik ve nörotransmitter homeostazını sürdürür, sinaptik bağlantıları iyileştirir ve nöronal metabolik substratlar sağlar. Astrositlerin akut hasarlanmadan sonra nöronal hayatta kalmayı ve işlevi desteklemesi için hastalıkta uygun astrosit-mikroglia çapraz etkileşimi gereklidir. Aktif mikroglia ve reaktif astrosit, nöroinflamasyonda karşılıklı iletişim ve işbirliği yoluyla immün optimizasyonu sağlayabilir. Mikroglia ve astrositler arasındaki inflamasyon sinyalleri, sadece mikrogliyal aktivasyonun kendi kendine geri bildirim döngüsü ile değil, aynı zamanda bağışıklık ağındaki astrositlerin benzersiz anatomik yapısı ile de güçlendirilebilir (22,23). Astrositler ayrıca nörotrofik desteğe sahiptir, sinaptik aktivitenin oluşumunu, iletimini ve sürdürülmesini sağlarlar (24). Bu nedenle mikrogliyal aktivitenin tamamen bastırılarak inflamasyonun yok edildiği çalışmalarda da sekellerin farklı değişkenler ile derinleşmesi, antiinflamatuvar değil, mikrogliyal aktiviteleri düzenleyen immünmodulator terapileri gündeme getirmiştir (96,98). Mevcut bulgular mikrogliyal fonksiyonların hasar üzerindeki etkilerini ikilem haline getirmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda rifampisin uygulamasının farelerde kalıcı ve geçici fokal serebral iskemi sonrasında beyin hasarını etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir ancak moleküler mekaniği net şekilde gösterilememiştir (69). Takip eden çalışmalarda rifampisinin parkinson hastalarında görülen mutasyona uğramış bir presinaptik protein olan alfa-sinüklein multimerlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği, dolayısıyla önemli bir nörolojik komorbidite olan parkinson hastalığından kordığı gösterilmiştir (71). Güncel bir çalışmada rifampisin molekülünün hücre düzeyindeki etkilerini nöromoleküler metodlar ile değerlendirilip NLRP3 ile Kaspaz-1 moleküllerinin ekspresyonları üzerine yapılan çalışmada (79) rifampisinin, rotenon kaynaklı sitotoksosite ve BV2 mikroglia'da IL-1 β 'nin gen ekspresyonunu azalttığını gösterilmiştir. Bu temelde yapılan bir başka çalışmada rifampisinin ve onun otoksidasyon ürünü rifampisin kinonun (RifQ) anti-inflamatuar ve nöroprotektif aktivitelerini değerlendirmek için rekombinant insan aS'

nin fibriler formları tarafından aktive edilen beyin mikrogliyal hücre kültürleri kullanılmış, Rif ve RifQ uygulanmasının prototipik inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6) salgılanmasını ve α S fibril agregatları ile aktive olan mikrogliyal hücrelerde oksidatif stres patlamasını azalttığı, ayrıca TNF-a ve IL-6 seviyelerini de önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (72). Bu çalışma doğrudan hipoksi – mikrogliyal fonksiyon – sekel üçgeninde rifampisin uzamsal etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır. Bulgularımız Rif ile RifQ'nun mikrogliyal ekspresyonların tetiklediği 'injury-induced inflammatory response''e azalttığını gösteren mevcut diğer deneysel çalışmalarla desteklenmektedir ve potansiyel hipoksik sekelleri azaltabileceğini göstermektedir. Bu nedenle hipoksik hasarlanmaların söz konusu olduğu hipoksik iskemik ensefalopati, perinatal asfiksi ve çeşitli hipoksik problemlerde potansiyel bir terapötik ajan olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

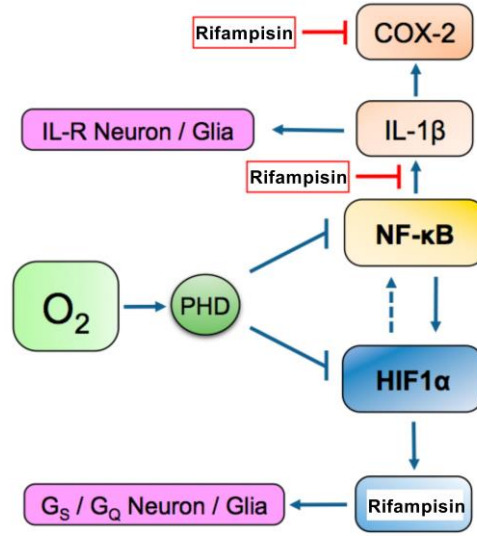
Rifampisin demiyelinizasyon, gliosis, apoptoz, inflamasyon, behavioral disfonksiyon ve kuprizon demiyelinizasyon modelindeki biyokimyasal değişiklikler üzerindeki etkinliğini incelendiği bir çalışmada (83), rifampisin uygulamasının motor davranışsal eksikliklerde iyileşmeye yol açtığı gösterilmiş, ayrıca rifampisin, inter lökin-6, interlökin-1 β , kaspaz-12 aktivitesi, heme oksijenaz-1, NO ve malondialdehit düzeylerini önemli ölçüde düşürmüştür. Çalışmada cuprizon alan fare beyinlerinin korpus kallozumunda astrogliosis, astrositlerin birikmesine neden olmuş, GFAP'ye karşı antikorlar, cuprizon ile beslenen farelere kıyasla rifampisin korpus kallozumdaki astrosit sayısını azalttığını göstermiştir (83). Bizim çalışmamızda santral sinir sisteminde mikrogliyal fonksiyonlarca düzenlenen bu proinflamatuvar markerların düzenleyicisi olan glial hücre aktivasyonunun rifampisin ile baskılanıp baskılanmadığı immünfloresan boyama yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Literatür çalışmalarında mikrogliozun derecesi, beyin bölümlerinin korpus kallozumunda IBA-1'e karşı antikorlar aracılığıyla değerlendirilmiş, kuprizon ile tedavi edilen farelerde mikrogliya sayısındaki artışlarla değerlendirildiği için bizim çalışmamızda da rifampisin, sırasıyla aktif astrositlerin ve mikrogliaların sayısını kontrol etmek için GFAP ve IBA-1 ifadelerini başarıyla modüle etmiştir. Histopatolojik bulgular, rifampisin istatistiksel olarak remiyelinizasyonu desteklediğini, mikroglioz ve astrogliozu azalttığını göstermiştir. Şekil 4.6 (A)' da immün boyama sonuçlarına göre (Şekil 4.6 (B)) akut HVR' deki bu artış muhtemelen KON ve H_KON gruplarına göre H_Rif_7G grubunda

astrosit markeri olan GFAP’ de anlamlı bir azalış olması ve buna karşın aktif mikroglia markeri olan IBA-1’ daki (Şekil 4.6 (C)) KON ve H_KON gruplarına göre H_Rif_7G grubunda anlamlı bir değişim olmasa da, KON ile H_KON grupları arasında bir değerde olması rifampisin uygulamasının astrosit aktivasyonunu belirgin olarak inhibe ettiği fakat mikroglia aktivasyonu üzerinde anlamlı bir artışa neden olmadığı bulundu. Bulgularımız rifampisinin glial aktivasyon ve immünfloresan boyamalar ile kümülatif durumunun hem normoksik hem hipoksik hücrelerde değerlendirmesinin yaparak doğrudan mikrogliyal proinflamatuvar süreçleri immünmodüle ederek remiyelinizasyonu desteklediğini, mikroglioz ve astrogliozu azalttığını göstermiştir. Bu bulgular gelecekte rifampisin molekülü veya benzer moleküler immünmodulator tedavilerin hedef alındığı etkenler ile potansiyel inflamasyon ilişkili hasarların önüne geçilebileceğini, hipoksik hasarın olduğu hastalarda sürecin derinleşmesinde önemli rolü olan mikrogliyal fonksiyonların düzenlenmesinde etkin olunabileceğini göstermektedir.

Çalışmamız rifampisin ile glial hücreler arasında bir negatif korelasyon olduğunu göstermekle birlikte bunun etki mekaniği ve parabolik immünmodulator değişkenliğini göstermemektedir. Hipoksik iskemik ensefalopatide hipotermi tedavisinin etki mekaniğini inceleyen çalışmalarda C1q'nin sistemik ve mikrogliyal ekspresyonunun azaldığı ve sistemik C5a düzeylerinin azalması sonucunda mikrogliyal ve nöronal birikiminin azaldığı gösterilmiştir (99). Aynı çalışma bu değişkenin sonucunda pro ve anti-inflamatuvar efektörlerin azalmış ekspresyonunun oluştuğunu ve hipotermi tedavisinin metabolik süreçte glial fonksiyonları yavaşlatarak apoptoz geçiren hücrelerde C1q bağlanmasıyla bir ilişkisinin olduğunu göstermiştir. Rifampisinin daha önce yapılan deneylerde mikrogliyalı indüklediği gösterilen lipopolisakkarit bir proinflamatuvar mediatör olan BV-2 sinyal yolunun rifampisin molekülünün yarışmalı inhibisyonu ile kontrol edildiğini göstermesi ve Toll-like receptor 2 (TLR2)’ler üzerinden benzer bir antiinflamatuvar etkiyle immünmodulator bir etkisinin olduğunun saptanması benzer bir etki mekanizması ile mikrogliyal fonksiyonların düzenlendiğin düşündürmektedir (72,100). Bu nedenle bulgularımız rifampisin molekülünün immünmodulator bir etkiyle hipoksiye ve glial hasara maruz kalan hücrelerde mikroglia-nöronal ortak kültür sisteminde nöroinflamotoksik hasarın azalmasını açıklayabilir.

Beyinde mikroglial hücreler; nöronal destek, sinaptik modülasyon, nöronal devrenin yeniden düzenlenmesi ve önemli miktarda antimikrobiyal peptit üretimi gibi çok çeşitli işlevleri yerine getirir. Ayrıca inflamatuvar süreçte de görevlidirler ve muhtemelen salgılanan mediatörler hipoksik cevabın bir parçası olan HVC'nin de sürece dahil olmasını sağlamaktadır. Doğrudan bir ilişkilendirme yapmak güç olsa da ventilasyon parametresi değerlendirmelerimiz göstermektedir ki kontrol grubuna göre 14 gün boyunca uygulanan rifampisin akut HVC'yi boylamsal olarak arttırması aynı zamanda mikroglial fonksiyonlar ve immünmodulatöre etkilerinin (Şekil 4.6 (A)) bir sonucu da olabilir ve bu artış KON ve H_KON gruplarına göre H_Rif_14G grubunda astrosit markerı olan GFAP' de ile belirgin olarak inhibisyonuna rağmen mikroglial aktivasyon üzerinde anlamlı bir artışa olmaması ile açıklanabilir. Mikroglial aktivasyon, nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde, özellikle de hipoksik hasar oluşumunda önemli rol oynayan bir süreçtir. Ayrıca 7 gün ve 14 günlük rifampisin kullanımında Şekil 4.3 (C)'de gösterildiği üzere ventilasyonda anlamlı olarak bir farklılık bulunmadı. Glial hücre aktivasyonu sonuçlarına göre akut HVR' de anlamlı bir artış bulunmaması muhtemelen hem GFAP (Şekil 4.6 (B)) hem de IBA-1 (Şekil 4.6 (C)) immün boyamalarında anlamlı bir farklılık olmamasından dolayı olduğunu düşünüyoruz.

Rifampisinin literatürde daha önce yayınlanmış olan etkileri de değerlendirildiğinde hipoksi modelinde astrosit ve mikroglial hücreler üzerine olan etkilerini moleküler düzeyde muhtemelen serbest oksijen radikalleri üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmüş olup, bu konuda moleküler düzeyde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır (Şekil 5).



Şekil 5.1. Rifampisin uygulamasının beyin dokusunda nöron ve glial hücreler üzerine etki mekanizmasının muhtemel hücresel sinyal yolağı şeması. PHD: Prolil Hidroksilaz, COX-2: Siklooksijenaz 2, NF-κB: Nükleer Faktör Kappa B, HIF1α: Hipoksi indüklenebilir faktör-1Alfa

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile akut sürekli hipoksi oluşturulmuş ratlarda, rifampisin molekülünün santral sinir sisteminde astrosit aktivasyonunu anlamlı derecede baskıladığı (Şekil 4.6 (B)) gösterildi. Ayrıca mikroglial aktivasyonda anlamlı değişiklik olmasa da immünmodülatör bir etkiyle rifampisin verilmeyen hipoksik grubuna göre 7 gün ve 14 gün rifampisin verilen gruplarda mikroglial aktivasyonun normoksik gruba yaklaştığı gösterildi (Şekil 4.6 (C)). Rifampisinin IL-1B (71) ve NF-KB'yi baskıladığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup, akut hipoksi modelinde astrositleri baskılaması da muhtemelen bu mekanizmalar ile gerçekleşmektedir (Şekil 5). Rifampisinin ratlarda gösterdiğimiz bu etkisi insanlarda hipoksik beyin hasarının tedavisinde kullanılabilmesi için umut vericidir.

6. SONUÇLAR

1. Hipoksik hasarlanmada, takip eden süreçte ortaya çıkan ‘‘injury-induced inflammatory response’’ (hasar ilişkili iltihabi cevap) son derece hayatidir ve bu konuda yapılan çalışmalarda antiinflamatuvar tedavilerin etkinliği yetersiz olup rifampisinin muhtemel bir etkinliği söz konusudur.
2. Pro-inflamatuvar süreçte astrositlerin ve mikrogial hücrelerin kritik bir rolü vardır. Bu süreç henüz net olmamakla birlikte bu hücrelerin immünmodülasyonlarının antiinflamatuvar etkinliği olduğu görülmüştür. Bulgularımız, rifampisin molekülünün santral sinir sisteminde astrosit aktivasyonunu anlamlı derecede baskıladığını göstermektedir.
3. Potansiyel hipoksi – nörogial – sekel ilişkisinde rifampisin molekülünün potansiyel astrosit/mikrogial etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Gelecekte hipoksik beyin hasarının tedavisinde bu ve benzeri moleküllerin kullanılabilmesi için bir öncü çalışmadır ancak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
4. Rifampisin ilaç uygulaması yapılan H_Rif_7G ve H_Rif_14G akut sürekli hipoksi deney gruplarında astrosit aktivasyonunun baskılandığı, mikrogia aktivasyonunun ise baskılanmadığı gözlenmiştir (N = 6 hayvan / grup; * p <0.05). Hipoksik hasarda kritik rolü olan bu hücrelerin düzenlenmesinde rifampisinin önemli bir rolü olabileceği düşünülmüştür.

5. Bu tez çalışması potansiyel hipoksik hasarların ve nöroglial hücrelerin rifampisin ile ilişkisini immünfloresan görüntülemelerle değerlendiren ilk çalışmadır. Bulgularımız aktif mikroglia markerı olan IBA-1' daki KON ve H_KON gruplarına göre H_Rif_7G grubunda anlamlı bir değişim olmasa da, KON ile H_KON grupları arasında bir değerde olması rifampisin uygulamasının astrosit aktivasyonunu belirgin olarak inhibe ettiği fakat mikroglia aktivasyonu üzerinde anlamlı bir artışa neden olmadığını göstermektedir.
6. Normoksi grubunda başlangıçtaki solunum frekansı, tidal volüm ve ventilasyon değerleri ve CO2 metabolizması ile, sakrifiye edilmeden önceki değerler arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Bu durum, deney süresince geçen 2 haftalık zamanda fizyolojik ölçümlerin ratların büyümesinden kaynaklanmadığını göstermektedir. Hipoksik kontrol grubunda başlangıçtaki değerler ile hipoksi sonrası değerler kıyaslandığında solunum frekansında anlamlı bir değişiklik olmadı. Tidal volüm ve ventilasyon değerleri ise anlamlı olarak arttı ($p=0.006$). CO2 metabolizmasında ise anlamlı bir farklılık olmadı. Bu durum konvansiyonel hipotermi tedavilerinin hedef aldığı zaman dilimiyle, intünflamatuvar tedaviler hedef zaman intervalleri arasında farklılıktan ileri geldiği düşünüldü.
7. Hipoksi sonrası 14 gün intraperitoneal rifampisin uygulanan grupta, solunum frekans değeri başlangıca göre anlamlı olarak azaldı ($p=0,0162$), tidal volüm anlamlı olarak arttı ($p<0.0001$), ventilasyon değerleri anlamlı olarak arttı ($p=0,0002$) ve CO2 metabolizması anlamlı olarak arttı ($p=0,0043$). Bu farklılığın inflamatuvar değişkenliklerden ve kemoreseptör düzeyindeki etkilenimlerden ileri geldiği düşünüldü.
8. Literatür hipoksik hasarın devam edecen bir süreç olduğu, reaktif oksijenizasyon hasarı, hasar ilişkili inflamatuvar injury gibi çeşitli mekaniklerle sürekli etkilenim halinde olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, bu kritik süreçte rifampisinin hem immünolojik hem metabolik potansiyel etkileri olduğunu göstermektedir.
9. Çalışmamız akut hipoksik hasar – rifampisin ilişkisinin, moleküler hücresel düzeyde gösteren ilk çalışmadır. Bulgularımız rifampisin ve ilişkili moleküllerin hipoksik iskemik ensefalopati, perinatal asfiksi, akut hipoksik sekel gibi

durumlarda bir immünmodülatör tedavi ajanı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

10. Bulgularımız ayrıca rifampisinin, pro-inflamatuar düzenleyici etkisiyle bağımlı veya bağımsız olarak santral veya periferik metabolik süreçlere etki ederek, hayvanlarda ventilasyon cevabının değişiminde rol oynadığını göstermektedir. Bu ilişkinin değerlendirilebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



7. KAYNAKLAR

1. Arthur C Theodore, MD. (2022). Measures of oxygenation and mechanisms of hypoxemia: mechanisms of hypoxemia. In Geraldine Finlay, MD (Ed), *Uptodate*. Retrieved from <https://www.uptodate.com/home>
2. Gerald L Weinhouse, MDG Bryan Young, MD, FRCPC. (2022). Hypoxic-ischemic brain injury in adults: Evaluation and prognosis: introduction. In Janet L Wilterdink, MD (Ed), *Uptodate*. Retrieved from <https://www.uptodate.com/home>
3. Yvonne Wu, MD, MPH. (2022). Clinical features, diagnosis, and treatment of neonatal encephalopathy: epidemiology. In John F Dashe, MD, PhD (Ed), *Uptodate*. Retrieved from <https://www.uptodate.com/home>
4. Frajewicki A, Laštůvka Z, Borbélyová V, et al. Perinatal hypoxic-ischemic damage: review of the current treatment possibilities. *Physiol Res*. 2020 Dec 31;69(Suppl 3):S379-S401. doi: 10.33549/physiolres.934595. PMID: 33464921; PMCID: PMC8603715.
5. Yulug B, Hanoglu L, Kilic E, Schabitz WR. Rifampicin: an antibiotic with brain protective function. *Brain Res Bull*. 2014 Aug;107:37-42.
6. Lawn Je, Cousens S, Zupan J, Team Lnss: 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* 365: 891-900, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71048-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71048-5) possibilities. *Physiol Res*. 2020 Dec 31;69(Suppl 3):S379-S401. doi: 10.33549/physiolres.934595. PMID: 33464921; PMCID: PMC8603715.
7. Lee Acc, Kozuki N, Blencowe H, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res* 74: 50-72, 2013. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.206>
8. Wood T, Osredkar D, Puchades M, et al. Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Sci Rep* 6: 23430, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep23430>

9. Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z: Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges. *Front Cell Neurosci* 11: 2017. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
10. Volpe JJ: Neonatal encephalopathy: An inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol* 72: 156-166, 2012. <https://doi.org/10.1002/ana.23647>
11. Arthur C Theodore, MD. (2022). Measures of oxygenation and mechanisms of hypoxemia: effects of hypoxemia. In Geraldine Finlay, MD (Ed), *Uptodate*. Retrieved from <https://www.uptodate.com/home>
12. Arteaga O, Álvarez A, Revuelta M, Santaolalla F, Urtasun A, Hilario E. Role of Antioxidants in Neonatal Hypoxic–Ischemic Brain Injury: New Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(2):265. <https://doi.org/10.3390/ijms18020265>
13. Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*. 2012 Apr;121(1):4-27. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x. Epub 2012 Feb 2. PMID: 22251135; PMCID: PMC3304021
14. Vesce S, Bezzi P, Volterra A. Synaptic transmission with the glia. *News Physiol Sci*. 2001 Aug;16:178-84. doi: 10.1152/physiologyonline.2001.16.4.178. PMID: 11479369
15. Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci*. 2007 Nov;30(11):596-602. doi: 10.1016/j.tins.2007.08.007. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17950926
16. Tadmouri A, Champagnat J, Morin-Surun MP. Activation of microglia and astrocytes in the nucleus tractus solitarius during ventilatory acclimatization to 10% hypoxia in unanesthetized mice. *J Neurosci Res*. 2014 May;92(5):627-33. doi: 10.1002/jnr.23336. Epub 2014 Feb 7. PMID: 24510616
17. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005 Jun;8(6):752-8. doi: 10.1038/nn1472. Epub 2005 May 15. PMID: 15895084.

18. Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, et al. 2006. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 9:1512–1519
19. Martin ED, Fernandez M, Perea G, et al. 2007. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia- ~ induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55:36–45.
20. Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. 2011. Functions of microglia in the central nervous system—beyond the immune response. *Neuron Glia Biol* 7:47–53.
21. MacDonald AJ, Ellacott KLJ. Astrocytes in the nucleus of the solitary tract: Contributions to neural circuits controlling physiology. *Physiol Behav.* 2020 Sep 1;223:112982. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.112982. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32535136; PMCID: PMC7378570.
22. Michinaga S, Seno N, Fuka M, et al. Improvement of cold injury-induced mouse brain edema by endothelin ETB antagonists is accompanied by decreases in matrixmetalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor-A. *Eur J Neurosci.* 2015 Sep;42(6):2356-70. doi: 10.1111/ejn.13020. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26174228
23. Harada K, Kamiya T, Tsuboi T. Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front Neurosci.* 2016 Jan 12;9:499. doi: 10.3389/fnins.2015.00499. PMID: 26793048; PMCID: PMC4709856.
24. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. Epub 2009 Dec 10. PMID: 20012068; PMCID: PMC2799634.
25. Pamenter ME, Powell FL. Time Domains of the Hypoxic Ventilatory Response and Their Molecular Basis. *Compr Physiol.* 2016 Jun 13;6(3):1345-85. doi: 10.1002/cphy.c150026. PMID: 27347896; PMCID: PMC4934681.
26. Stornetta RL. Identification of neurotransmitters and co-localization of transmitters in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008 Dec 10;164(1-2):18-27. doi: 10.1016/j.resp.2008.07.024. PMID: 18722563; PMCID: PMC2642910.

27. Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:197–205.
28. Lan X, Han X, Li Q, Yang QW, Wang J. Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nat Rev Neurol*. 2017 Jul;13(7):420-433. doi: 10.1038/nrneurol.2017.69. Epub 2017 May 19. PMID: 28524175; PMCID: PMC5575938.
29. Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, Cai J. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol Neurobiol*. 2013 Dec;48(3):690-701. doi: 10.1007/s12035-013-8460-4. Epub 2013 Apr 24. PMID: 23613214; PMCID: PMC4079114.
30. Estes ML, McAllister AK. Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol*. 2014 Nov;24(6):623-30. doi: 10.1111/bpa.12198. PMID: 25345893; PMCID: PMC4365495.
31. Chen SH, Oyarzabal EA, Sung YF, et al. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia*. 2015 Jan;63(1):118-31. doi: 10.1002/glia.22738. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25130274; PMCID: PMC4237670
32. Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Nov 7;7(2):a020420. doi: 10.1101/cshperspect.a020420. PMID: 25380660; PMCID: PMC4315924.
33. Sidhartha Tan, MD. (2022). Etiology and pathogenesis of neonatal encephalopathy: hypoxic-ischemic injury. In John F Dashe, MD, PhD (Ed), *Uptodate*. Retrieved from <https://www.uptodate.com/home>
34. Yvonne Wu, MD, MPH. (2022). Clinical features, diagnosis, and treatment of neonatal encephalopathy: clinical presentation. In John F Dashe, MD, PhD (Ed), *Uptodate*. Retrieved from <https://www.uptodate.com/home>
35. Choi Ha, Badjatia N, Mayer Sa: Hypothermia for acute brain injury-mechanisms and practical aspects. *Nat Rev Neurol* 8: 214, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.21>

36. Ergenekon E: Therapeutic hypothermia in neonatal intensive care unit: challenges and practical points. *J Clin Neonatol* 5: 8-17, 2016. <https://doi.org/10.4103/2249-4847.173271>
37. Alsina M, Martín-Ancel A, Alarcon-Allen A, Arca G, Gayá F, García-Alix A: The severity of hypoxic-ischemic encephalopathy correlates with multiple organ dysfunction in the hypothermia era. *Pediatr Crit Care Med* 18: 234-240, 2017. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000001068>
38. Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H: Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res* 44: 391-403, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00161-X](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00161-X)
39. Allen Ka, Brandon Dh: Hypoxic ischemic encephalopathy: pathophysiology and experimental treatments. *Newborn Infant Nurs Rev* 11: 125-133, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.nainr.2011.07.004>
40. Van Der Kooij Ma, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen Cj, Van Bel F: Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev* 59: 22-33, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.04.007>
41. Wu Yw, Gonzalez Ff: Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Dev Med Child Neurol* 57 (Suppl 3): 34-39, 2015. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12730>
42. Wu Yw, Bauer La, Ballard Ra ve ark: Erythropoietin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics. *Pediatrics* 130: 683-691, 2012. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-0498>
43. Jatana M, Singh I, Singh Ak, Jenkins D: Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 59: 684-689, 2006. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000215045.91122.44>
44. Amantea D, Certo M, Petrelli F, et al. Azithromycin protects mice against ischemic stroke injury by promoting macrophage transition towards M2

- phenotype. *Exp Neurol* 275: 116-125, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.10.012>
45. Schubring C, Kiess W, Englaro P, et al. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1480-1483, 1997.
<https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3935>
 46. Dicou E, Attoub S, Gressens P: Neuroprotective effects of leptin in vivo and in vitro. *Neuroreport* 12: 3947-3951, 2001. <https://doi.org/10.1097/00001756-200112210-00019>
 47. Zhang F, Wang S, Signore Ap, Chen J: Neuroprotective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-glucose deprivation and transient cerebral ischemia. *Stroke* 38: 2329-2336, 2007.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.482786>
 48. Baydas G, Reiter Rj, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S: Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 135: 879-886, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.048>
 49. Esposito E, Cuzzocrea S: Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol* 8: 228-242, 2010.
<https://doi.org/10.2174/157015910792246155>
 50. Maresova D, Riljak V, Mares J: Melatonin modulates hypoxia-induced changes of rat brain excitability. *Gen Physiol Biophys* 29: 67-71, 2010.
https://doi.org/10.4149/gpb_2010_01_71
 51. Villapol S, Fau S, Renolleau S, Biran V, Charriaut-Marlangue C, Baud O: Melatonin promotes myelination by decreasing white matter inflammation after neonatal stroke. *Pediatr Res* 69: 51-55, 2011.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181fcb40b>
 52. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W: Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain

- injury in rats. *J Pineal Res* 44: 157-164, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00503.x>
53. Rodríguez-Fanjul J, Fernández-Feijóo Cd, Lopez-Abad M, et al. Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: Is it a gender question? *PLoS One* 12: e0184643, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643>
 54. Benders Mj, Bos Af, Rademaker Cm, et al. Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 91: F163-F165, 2006. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.086652>
 55. Kaandorp Jj, Van Bel F, Veen S, et al. Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: follow-up of two randomised controlled trials. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 97: F162-F166, 2012. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2011-300356>
 56. Forrest GN, Tamura K. Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):14-34.
 57. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901-12.
 58. Boeree MJ, Diacon AH, Dawson R, Narunsky K, du Bois J, Venter A, et al. A dose-ranging trial to optimize the dose of rifampin in the treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(9):1058-65.
 59. Drancourt M, Raoult D. Characterization of mutations in the *rpoB* gene in naturally rifampin-resistant *Rickettsia* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(10):2400-3.
 60. Mandell GL, Vest TK. Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by rifampin: in-vitro and in-vivo studies. *J Infect Dis.* 1972;125(5):486-90.
 61. Bellahsene A, Forsgren A. Effect of rifampin on the immune response in mice. *Infection and immunity.* 1980;27(1):15-20.

62. Pahlevan AA, Wright DJ, Bradley L, Smith C, Foxwell BM. Potential of rifamides to inhibit TNF-induced NF-kappaB activation. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Mar;49(3):531-4.
63. Ziglam HM, Daniels I, Finch RG. Immunomodulating activity of rifampicin. *J Chemother.* 2004 Aug;16(4):357-61.
64. Kim SK, Kim YM, Yeum CE, Jin SH, Chae GT, Lee SB. Rifampicin Inhibits the LPS-induced Expression of Toll-like Receptor 2 via the Suppression of NF-kappaB DNA-binding Activity in RAW 264.7 Cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;13(6):475-82.
65. Tsiskarishvili N, Tsiskarishvili N. The anti-tubercular drugs in the treatment of psoriasis. *Georgian medical news.* 2009(174):25-8.
66. Namazi H. Practice pearl: a novel use of rifampicin for treatment of carpal tunnel syndrome. *The Journal of Pain.* 2008;9(4):380-1.
67. McGeer, P.L.; Harada, N.; Kimura, H.; McGeer, E.G.; Schulzer, M. Prevalence of Dementia amongst Elderly Japanese with Leprosy: Apparent Effect of Chronic Drug Therapy. *Dement. Geriatr. Cognit. Disord.* 1992, 3, 146–149
68. Namba, Y., Kawatsu, K., Izumi, S., Ueki, A., Ikeda, K., 1992. Neurofibrillary tangles and senile plaques in brain of elderly leprosy patients. *Lancet* 340, 978
69. Yulug B, Kilic U, Kilic E, Bähr M. Rifampicin attenuates brain damage in focal ischemia. *Brain Res.* 2004 Jan 16;996(1):76-80. doi: 10.1016/j.brainres.2003.10.012. PMID: 14670633.
70. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Mar-Apr;24(2):197-211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9. PMID: 12498954.
71. Xu J, Wei C, Xu C, et al. Rifampicin protects PC12 cells against MPP⁺-induced apoptosis and inhibits the expression of an α -Synuclein multimer. *Brain research.* 2007;1139:220-5.
72. Acuña L, Hamadat S, Corbalán NS, et al. Rifampicin and Its Derivative Rifampicin Quinone Reduce Microglial Inflammatory Responses and

- Neurodegeneration Induced In Vitro by α -Synuclein Fibrillary Aggregates. *Cells*. 2019 Jul 25;8(8):776. doi: 10.3390/cells8080776. PMID: 31349736; PMCID: PMC6721546.
73. Bi W, Zhu L, Wang C, et al. Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Brain Research*. 2011;1395:12-20.
 74. Eikelenboom, P., van Gool, W.A., 2004. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 111, 281–294
 75. Koning, N., Bö, L., Hoek, R.M., Huitinga, I., 2007. Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 62, 504–514 Nov
 76. Krause, D.L., Müller, N., 2010. Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* Jun, pii, 732806
 77. Liu, B., Hong, J.S., 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1–7.
 78. Qian, L., Flood, P.M., Hong, J.S., 2010. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J. Neural Transm.* 117, 971–979.
 79. Liang Y, Jing X, Zeng Z, et al. Rifampicin attenuates rotenone-induced inflammation via suppressing NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Brain Res.* 2015 Oct 5;1622:43-50.
 80. Gao, F., Chen, D., Hu, Q., Wang, G., 2013. Rotenone directly induces BV2 cell activation via the p38 MAPK pathway. *PLoS One* 8, e72046.
 81. Bi, W., Zhu, L., Jing, X., et al. 2014. Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated cocultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway. *Mol. Med. Rep.* 10, 1793–1799.

82. Chen, S., Sun, Y., Zeng, Z., Tao, E., 2010. Rifampicin inhibits apoptosis in rotenone-induced differentiated PC12 cells by ameliorating mitochondrial oxidative stress. *Neural Regen. Res.* 5, 251–256.
83. Zahednasab H, Firouzi M, Kaboudanian-Ardestani S, Mojallal-Tabatabaei Z, Karampour S, Keyvani H. The protective effect of rifampicin on behavioral deficits, biochemical, and neuropathological changes in a cuprizone model of demyelination. *Cytokine.* 2019 Jan;113:417-426. doi: 10.1016/j.cyto.2018.10.016. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30539784.
84. A. Bitsch, J. Schuchardt, S. Bunkowski, T. Kuhlmann, W. Brück, Acute axonal injury in multiple sclerosis: correlation with demyelination and inflammation, *Brain* 123 (6) (2000) 1174–1183.
85. K.J. Smith, R. Kapoor, P.A. Felts, Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species, *Brain Pathol.* 9 (1) (1999) 69–92.
86. Umeda T, Ono K, Sakai A, et al. Rifampicin is a candidate preventive medicine against amyloid- β and tau oligomers. *Brain.* 2016;139(Pt 5):1568-86
87. Yulug B, Hanoglu L, Ozansoy M, et al. Therapeutic role of rifampicin in Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2018 Mar;72(3):152-159. doi: 10.1111/pcn.12637. Epub 2018 Feb 10. PMID: 29315976.
88. Farr B, Mandell GL. Rifampin. *Med Clin North Am.* 1982;66(1):157-68.
89. Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics.* 2014;67(9):625-30.
90. Bekker A, Schaaf HS, Draper HR, et al. Pharmacokinetics of Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide, and Ethambutol in Infants Dosed According to Revised WHO-Recommended Treatment Guidelines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2171-9.
91. Mandell GL, Vest TK. Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by rifampin: in-vitro and in-vivo studies. *J Infect Dis.* 1972;125(5):486-90.
92. Martínez E, Collazos J, Mayo J. Hypersensitivity reactions to rifampin. Pathogenetic mechanisms, clinical manifestations, management strategies, and

- review of the anaphylactic-like reactions. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78(6):361-9.
93. Fitzgerald RS, Lahiri S. Reflex responses to chemoreceptor stimulation. *Compr Physiol*. 2011; 11:313–362.
 94. Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 1998; 112:123-134.
 95. Basaran KE, Villongco M, Ho B, et al. “Ibuprofen Blunts Ventilatory Acclimatization to Sustained Hypoxia in Humans”, *PLoS ONE*, 2016; 11: e0146087.
 96. Min YJ, Ling EA, Li F. Immunomodulatory Mechanism and Potential Therapies for Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Front Pharmacol*. 2020 Dec 11;11:580428. doi: 10.3389/fphar.2020.580428. PMID: 33536907; PMCID: PMC7849181.
 97. Serdar M, Kempe K, Rizazad M, et al. Early Pro-inflammatory Microglia Activation After Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Front Cell Neurosci*. 2019 May 24;13:237. doi: 10.3389/fncel.2019.00237. PMID: 31178702; PMCID: PMC6543767.
 98. Tsuji S, Di Martino E, Mukai T, et al. Aggravated brain injury after neonatal hypoxic ischemia in microglia-depleted mice. *J Neuroinflammation*. 2020 Apr 11;17(1):111. doi: 10.1186/s12974-020-01792-7. PMID: 32276642; PMCID: PMC7149909.
 99. Shah TA, Pallera HK, Kaszowski CL, Bass WT, Lattanzio FA. Therapeutic Hypothermia Inhibits the Classical Complement Pathway in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Front Neurosci*. 2021 Feb 12;15:616734. doi: 10.3389/fnins.2021.616734. PMID: 33642979; PMCID: PMC7907466.
 100. Haferland I, Wallenwein CM, Ickelsheimer T, et al. Mechanism of anti-inflammatory effects of rifampicin in an ex vivo culture system of hidradenitis suppurativa. *Exp Dermatol*. 2022 Jan 20. doi: 10.1111/exd.14531. Epub ahead of print. PMID: 35048417.