

저산소 상태로 유도된 백서 뇌세포 배양에서 Minocycline의 뇌보호 효과

대구가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, 해부학교실*, 생화학교실†

하경아 · 양범석 · 김진경 · 김홍태* · 하성진† · 이종원† · 정혜리 · 김우택

Neuroprotective Effects of Minocycline in Rat Brain Cortical Cell Culture Induced by Hypoxia

Kyung A Ha, M.D., Bum Seok Yang, M.D., Jin Kyung Kim, M.D., Hong Tae Kim, M.D.*
Sung Jin Ha†, Jong Won Lee, Ph.D.*, Hai Lee Chung, M.D. and Woo Taek Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Department of Anatomy, Department of Biochemistry†,
School of Medicine, The Catholic University of Korea, Daegu, Korea*

Purpose : *In vivo*, minocycline appears to be neuroprotective. Thus, the neuroprotective effects of minocycline were studied in a rat brain cortical cell culture induced by hypoxia.

Methods : Cultured cells from the brains of Sprague-Dawley rats were divided into two sets of groups : normoxia groups treated with 5% CO₂ and hypoxia groups treated with 1% CO₂. After several days of incubation, the control groups were not treated with minocycline, while the sample groups were treated with either 1 or 10 µg/mL of minocycline. The damaged cells were observed under a microscope, while apoptosis was detected using a TUNEL assay control-stained with DAPI.

Results : Among the normoxia groups, the control and sample groups treated with 1 and 10 µg/mL of minocycline were all statistically significantly different from each other. Meanwhile, among the hypoxia groups, although the control was significantly different from the sample groups, there was no statistically significant difference between the sample groups. When comparing the normoxia and hypoxia groups, there was a statistically significant difference between the control groups and sample groups treated with 1 µg/mL of minocycline, yet no significant difference between the sample groups treated with 10 µg/mL of minocycline.

Conclusion : Minocycline was found to be neuroprotective in normoxia and hypoxia induced rat brain cortical cell cultures. (*J Korean Pediatr Soc* 2003;46:1101-1106)

Key Words : Minocycline, Hypoxia, Brain, Culture

서 론

저산소성 허혈성 뇌병증은 주산기 이환율과 사망률의 중요한 원인으로 소아에서 영구적인 신경학적 장애인 지능장애, 경련, 뇌성마비를 초래함^{1, 2)}으로 저산소성 허혈성 뇌병증에 대한 기전 및 치료에 대한 많은 연구가 있었다³⁾. 그 중에 몇몇 뇌보호 효과에 관한 방법이 증명되었는데⁴⁾ 흥분독성 길항제⁵⁾, 산화질소 합성효소 감소제⁶⁾, 성장 인자⁷⁾, 카스파아제(caspase) 활성화도 억제제⁸⁾ 및 저체온증⁹⁾ 등이다.

최근에 테트라사이클린 계열 항생제인 미노사이클린(minocycline)이 성인 동물 설치류에서의 허혈성 손상과 뇌졸중에서 뇌보호 효과가 있었다. 특히 국소적 및 전체적 동물 모형에서 전신적 투여로 뇌졸중 경색 부위를 현저하게 감소시켰다^{10, 11)}. 또한 백서에서 외상성 뇌손상 매개성 조직 손상과 그에 관련된 신경학적 기능 이상을 감소시켰으며¹²⁾, 동물 모형에서 다발성 경화증¹³⁾, 파킨슨병¹⁴⁾, 헌팅턴병¹⁵⁾의 신경퇴행을 막거나 지연시켜 뇌를 보호하였다. 또한 미노사이클린이 신생 뇌에서도 저산소성 허혈성 뇌손상후 뇌보호 효과가 있는 것으로 밝혀졌는데, 이는 미노사이클린이 흥분독성/고사(apoptosis)성 세포 사망의 표지자인 칼파인 분리 물질(calpain cleaved substrate)의 출현뿐 아니라 고사의 효과자로 알려진 활성화된 카스파아제-3의 생성을 억제함으로써 뇌보호 효과를 나타낸다고 보고하였다¹⁶⁾. 따라서 미노사이클린의 뇌보호 효과가 세포 사망의 한 형태인 고사를 억제

본 연구는 2002학년도 대구가톨릭대학교 연구비 지원에 의한 것임.

접수 : 2003년 7월 11일, 승인 : 2003년 9월 8일

책임저자 : 김우택, 대구가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 053)650-4250 Fax : 053)622-4240

E-mail : woodykim@cu.ac.kr

하는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 미노사이클린이 저산소 상태로 유도된 백서 뇌세포 배양에서 고사를 억제하는 뇌보호 효과가 있는지를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 백서 뇌세포 배양

대뇌피질 신경세포 배양은 Brewer¹⁷⁾의 방법에 따라 하였다. 임신 18일의 백서(Sprague-Dawley)를 실온에서 에테르로 5분간 마취하고, 자궁을 분리하여 태아 백서의 뇌를 잘라내어 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES(pH 7.4)가 첨가된 HBSS 용액(GibcoBRL) 5 mL로 5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 세포를 1 mL Hank용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6-7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 분산된 세포를 모아 세포 수를 측정 후 약 1,500 cells/mm³ 되게 B27을 첨가한 plating Neurobasal media (GibcoBRL)(100 mL Neurobasal, 2 mL B27 supplement, 0.25 mL glutamax I, 0.1 mL 25 mM glutamate, 0.1 mL 25 mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 8 well chamber slide에 부어 CO₂ 배양조에서 배양한 다음 3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(GibcoBRL)(100 mL Neurobasal, 2 mL B27 supplement, 0.25 mL glutamax I)로 1/5씩 교환하였다.

2. 저산소상태 처리 및 억제 투입

배양 세포를 정상산소 상태(normoxia)와 저산소 상태(hypoxia)로 두 군으로 나누고, 정상 산소 상태는 5% O₂ 배양기(90% N₂, 5% CO₂)에, 저산소 상태는 1% O₂ 배양기(94% N₂, 5% CO₂)에서 세포 수를 계산하여서 수일간 처리하여 현미경하에서 충분한 세포 손상이 있다고 판단되면 두 군을 각각 대조군과 미노사이클린 1 µg/mL, 10 µg/mL로 처리한 군으로 나누어서 실험하였다.

3. TUNEL(Tdt-mediated dUTP nick and labeling) 및 DAPI 염색

8 well chamber slide에 배양된 세포를 phosphate buffered solution(PBS)으로 씻고 고정액(4% paraformaldehyde in PBS pH 7.4)으로 실온에서 한 시간 동안 고정한다. 다음, 새로 만든 permeabilisation solution(0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate)으로 얼음 위에서 2분간 처리하고, PBS로 2분간 2번 씻고, In situ cell death detection kit(TUNEL kit, Roche, 독일)에 들어 있는 label 용액과 효소 용액의 혼합액을 sample 당 50 µL을 넣고, 37°C에서 1시간 반응시키고, PBS로 2분간 3번 씻고, DAPI(Sigma, 미국)(최종농도 1 µg/mL)로 10분간 실온에서 처리하고 PBS로 씻고, antifading 용액으로 표본하였다. 현광 관찰 장치가 부착된 Zeiss사의 Axiophot 현미경으로 관찰하였다.

DAPI로 염색된 세포들은 F02 filter set(G365, FT 395, LP 420)에서 하늘색으로 TUNEL 반응 양성세포들은 F09 filter set(BP450-490, FT510, LP 520)에서 녹색으로 보였다. 사진 촬영은 DAPI와 TUNEL 양성 세포를 동시에 볼 수 있는 Triple band pass filter(ex:400/495/570, beam splitter:410/505/585, em:460/530/610)를 이용하였다. 염색 후 TUNEL 양성 세포는 광학 현미경하에서 관찰하였으며 대조 염색(DAPI)과 비교하여 핵의 응축과 진한 염색 상을 보이거나 여러 개의 작은 핵의 분리 고사 소체를 형성할 때로 하였으며 각 chamber 마다 200 배 배율 하에서 서로 다른 열 군대의 위치에서 각각 100여 개의 신경세포를 관찰하였고, 결과는 전체 세포에 대한 고사 세포의 비율로 나타내었다.

4. 통계처리

통계 처리는 SAS ver 8.1 통계 패키지를 이용하였고, 검정은 t-test, general lineal model(GLM) 및 일원 ANOVA로 처리하였고 유의 수준은 P값 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. TUNEL과 DAPI 염색

TUNEL 염색 양성 세포는 F09 filter set에서 녹색으로 보였고, DAPI 염색 양성 세포는 F02 filter set에서 하늘색으로 보였다(Fig. 1). 전체 세포는 TUNEL과 DAPI 염색 둘 다 양성인 세포를, 고사 세포는 TUNEL 염색만 양성인 세포로 하였다.

2. 정상산소 상태군과 저산소 상태군에서 뇌보호 효과

정상산소 상태군에서 대조군 고사율의 평균은 0.78(0.048), 미노사이클린 1 µg/mL 투여군의 평균은 0.27(0.191), 미노사이클린 10 µg/mL 투여군의 평균은 0.51(0.121)으로 3군 모두에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.01). 저산소 상태군에서 대조군의 평균은 0.88(0.075), 미노사이클린 1 µg/mL 투여군

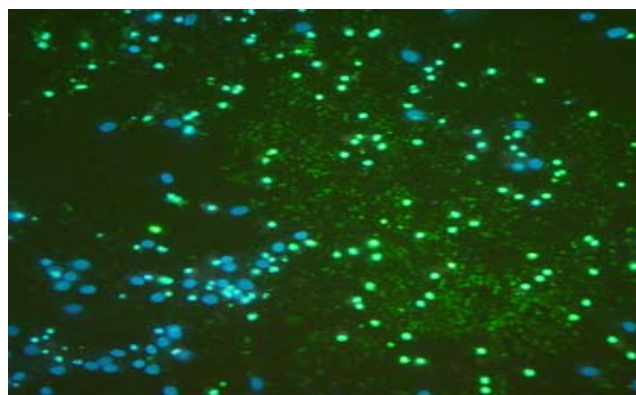


Fig. 1. TUNEL assay control-stained with DAPI shows green colored cells with TUNEL positive stain and blue colored cells with DAPI positive stain.

Table 1. Descriptive Analysis among Control and Sample Groups

Group	Contents	Apoptosis
		mean(SD)
Normoxia	Control	0.78(0.048)
	Minocycline 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.27(0.191)*
	Minocycline 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.51(0.121)*
Hypoxia	Control	0.88(0.075)
	Minocycline 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.51(0.085)*
	Minocycline 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.57(0.106) [†]

* $P < 0.01$ compared to control group

[†] $P < 0.01$ compared to control group but $P > 0.05$ between sample groups

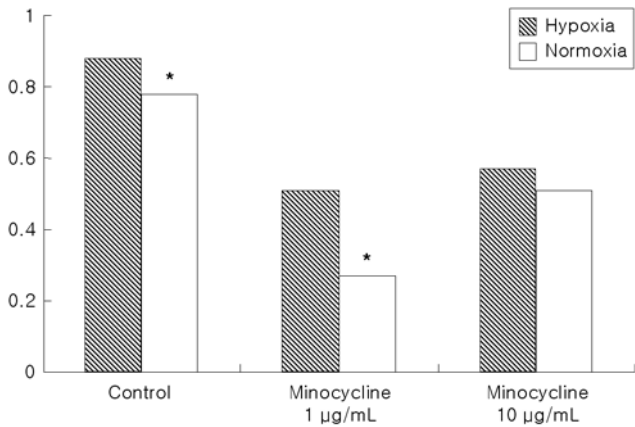


Fig. 2. Histogram of TUNEL assay control-stained with DAPI. * $P < 0.01$.

의 평균은 0.51(0.085), 미노사이클린 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군의 평균은 0.57(0.106)으로 대조군과 미노사이클린 투여군 간에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었으나($P < 0.01$), 미노사이클린 투여군간에서는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($P > 0.05$)(Table 1).

3. 정상산소 상태와 저산소 상태에서 각 군과의 비교에서 뇌보호 효과

정상산소 상태군과 저산소 상태군의 대조군간의 비교에서는 정상산소 상태군이 저산소 상태군보다 고사율의 평균이 낮고 통계학적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.01$). 또한, 정상산소 상태군과 저산소 상태군의 미노사이클린 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군간의 비교에서는 정상산소 상태군이 저산소 상태군보다 평균이 낮아서 통계학적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.01$). 그러나, 정상산소 상태군과 저산소 상태군의 미노사이클린 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군간의 비교에서는 정상산소 상태군이 저산소 상태군보다 다소 평균이 낮았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$)(Fig. 2).

고 찰

저산소성 허혈성 뇌병증은 주산기 이환율과 사망률의 중요한 원인으로 만삭아에서는 생존 출생아에서 0.1-0.2%로 발생하고 심한 신경학적 후유증은 생존아 중 0.03%에서 발생한다. 그리고 생존아 중 25%에서는 뇌성마비, 지능박약, 학습장애, 간질 등과 같은 영구적인 신경학적 후유증이 남을 수 있다^{1, 2)}.

저산소성 허혈성 뇌병증에서 뇌손상에 대한 여러 가지 병태생리학적 기전이 제기되고 있다. 재관류와 관련하여 혈관내피세포 손상, 산소 유리기에 의한 손상, 세포홍분성독성, 칼슘 항상성의 파괴, 각종 신경 전달물질의 영향 등이 이에 해당한다. 뇌허혈이 지속되면 비교적 광범위한 신경세포의 사망이 나타나는데 해마의 추체세포, 소뇌의 푸르키니세포, 뇌피질 제 3, 5층의 추체세포 등이 가장 취약한 부분에 해당된다¹⁸⁾. 뇌신경계의 손상에 의한 각종 질환들은 그 원인이 무엇이든 간에 대부분 중추신경세포의 사망에 의하여 증상이 나타난다. 중추신경세포는 허혈에 예민하여 한번 손상을 입어 세포가 사망하면 다시 재생되기 어려운 특징을 갖고 있다. 일반적으로 뇌세포가 손상을 받으면 뇌세포는 세포 괴사(necrosis)와 세포 고사를 통해 사망한다. 괴사로 통한 뇌세포 사망은 세포가 세포팽창, 공포화와 함께 세포막이 터지는 병리학적 소견을 보이며, 세포질 내 칼슘이온의 증가를 동반하며 괴사에 빠진 세포는 염증반응을 유발한다¹⁹⁾. 고사는 괴사와 달리 발생 중에 정상적으로 일어나는 세포사망이며, 면역반응의 조절이나 조직의 재구성고 같이 생체가 살아있는 동안 지속적으로 일어나는 현상으로 세포막에 소기포 형성, 염색질의 농축 등의 형태학적 특징을 보이고, 내인성 엔도뉴클레아제가 활성화되어 뉴클레오솜간 염색질 분열의 특징적인 양상을 띄게 된다²⁰⁾. 그런데 허혈에 의한 신경세포 사망을 유발하는 과정으로 괴사와 고사를 구분하는 것은 절대적이지 못하다. 왜냐하면 홍분독성이나 산화적 스트레스가 괴사도 유발하지만 고사도 유발한다는 증거가 있기 때문이다. 그러므로 허혈성 신경세포 사망의 기전으로 괴사나 고사 둘 다가 관여된다고 할 수 있다²¹⁾.

세포 고사에 대한 초기의 연구들은 부신피질호르몬을 처치한 흥선세포, 세포독성 림프구에 대한 반응 등에 집중되어 왔다²²⁾. 일반적으로 세포 고사를 증가시키는 것으로 알려진 자극들로는 방사선 조사, 칼슘이온 운반체, 중양 괴사인자, 부신피질호르몬의 제거, 인터루킨-1 β , 과립백혈구 대식세포 집락촉진인자, 과립백혈구 집락촉진인자, 인터루킨-2 등의 성장인자나 사이토카인의 제거 등이다²³⁾. 세포 고사를 확인하는 방법으로는 전자현미경을 이용한 형태학적 검사법, 핵산염색분체 파괴를 Tdt 효소를 이용하여 검출하는 TUNEL법, 뉴클레오솜 크기의 규칙적인 핵산분절을 확인하는 DNA ladder법, 핵산 형광표지 후 FACS(fluorescence-activated cell sorter)를 이용하는 세포학적 검사법 등이 이용되고 있다^{24, 25)}. 그러나 한가지 방법만으로 세포 괴사와 세포 고사를 확실하게 구별하기는 아직까지는 미흡하다. 본 연구

는 백서 뇌세포를 배양하여 저산소 배양기에서 저산소 손상을 유도한 후 TUNEL 염색으로 세포 고사 정도를 확인하였다.

최근 의료 기술의 발달로 특히, 미숙아의 생존율이 높아지면서 주산기 가사로 인한 저산소성 허혈성 뇌병증의 병리 기전에 대한 연구와 뇌손상을 줄이기 위한 노력들이 있어왔다. 그러나 저산소성 허혈성 뇌병증에서 지금까지 임상적으로 효과가 입증된 치료 약제는 아직 없으며, 보존적 치료로 적절한 관류나 환기를 유지하고, 체온, 혈당과 칼슘치, 그리고 산·염기 평형상태를 정상적으로 유지하며, 경련을 치료해야 하는 것이 중요하다^{1, 2)}. 또한, 잠재적 치료방법으로 산소 유리기 억제제와 청소제²⁶⁾, 흥분성 아미노산 길항제⁵⁾, 칼슘 이온 통로 차단제²⁷⁾, 산화질소 생산 억제제⁶⁾, 성장인자⁷⁾, 페노바르비탈²⁸⁾, NMDA 길항제²⁹⁾, 아데노신 유사제³⁰⁾, GABA 수용체 표현제³¹⁾, k-opioid 수용체 길항제³²⁾, 글루코코르티코이드³³⁾, 신경원 조세포 및 간세포 이식³⁴⁾ 등이 있다.

그러나 근본적 치료방법은 없는데 최근에 저산소성 허혈성 뇌병증의 기전과 병태생리가 좀 더 밝혀지게 되면서 새로운 치료법에 대한 연구가 증가되고 있다. 그중에 하나가 테트라사이클린 계열인 미노사이클린이다. 테트라사이클린 계열의 항생제는 항균 작용 이외에 항염증작용이 있어 류마티스 관절염이나 골관절염의 치료제로 사용되어왔다. 그중 미노사이클린은 반합성의 장기간 작용하는 2세대 테트라사이클린으로 지방친화성이 있어, 빠르고 쉽게 뇌척수액을 포함한 대부분의 체조직을 통과하며 여드름을 치료하거나, 몇몇의 포도상구균 감염에 광범위하게 사용되어졌고, 수십년간 안전하고 효과적인 항생제로 이용되어 왔다^{35, 36)}.

최근에 미노사이클린은 항균작용 이외에 여러 다른 작용이 있음이 밝혀졌다. 즉, 세포 간질의 메탈로프로테아제와 중앙 유발성 혈관형성, 악성 세포 성장, 골흡수를 억제, 다형백혈구에서의 산소유리기 방출의 감소, 염증의 매개체로 추정되는 iNOS의 억제^{37, 38)}, p38 MAPK와 미세아교세포의 활성화를 억제³⁹⁾ 등이다.

또한, 미노사이클린은 뇌경색^{10, 11, 16)}, 외인성 뇌손상¹²⁾, 파킨슨병¹⁴⁾ 그리고 헌팅톤병¹⁵⁾에서 뛰어난 뇌보호 효과가 있다. 국소적이고 광범위한 뇌경색과 다발성 경화증에서 중요한 면역병리학적 작용인 미세아교세포의 활성화를 막는 데 작용할 뿐만 아니라³⁹⁾ 세포홍분성독성에 노출된 척수배양 시스템에서의 미세아교세포의 활성화와 성장을 억제하는 작용이 있다⁴⁰⁾. 근위축성축삭경화증에 있어서 미노사이클린이 미토콘드리아에서의 사이토크롬 C 방출을 억제함으로써 병의 발현과 진행을 늦출 수 있으며⁴¹⁾, 파킨슨병의 MPTP 쥐 모형에서 iNOS와 카스파아제 1 발현의 감소와 연관되어 흑질선조체의 도파민성 신경변성을 막기도 했고¹⁴⁾, 헌팅톤병에서의 미노사이클린의 신경보호 효과는 카스파아제 1, 3, iNOS 그리고 사이클로옥시나아제-2의 억제 효과에 의해 병의 진행을 완화시켰다^{15, 39)}. 이온화 방사선으로 유발된 유산탈수소효소 방출과 핵산 단열에 의한 세포 고사에서의 신경세포보호 효과가 있으며⁴²⁾ 마이엘린 희돌기교세포 당단백질에 의해 유발되는 재발성 자가면역성 뇌척수염에서 효과적이었다¹³⁾.

본 연구에서는 미노사이클린의 뇌보호 효과는 정상산소 상태군과 저산소 상태군 모두에서 효과가 있었으며 고농도보다 저농도에서 효과가 통계학적으로 유의성 있었다. 양군간의 비교에서는 대조군과 미노사이클린 저농도에서는 통계학적으로 유의성이 있었으나 고농도군에서는 통계학적으로 유의성이 없었다.

결론적으로 미노사이클린은 고사를 억제하는 기전으로 저산소 상태나 정상 산소 상태에서 뇌보호 효과가 있었다.

요 약

목적 : 미노사이클린이 in vivo 연구에서 뇌보호 효과가 있는 것으로 알려져 있어 본 연구에서는 미노사이클린이 저산소 상태로 유발된 백서 뇌세포 배양에서 고사를 억제하는 뇌보호 효과가 있는지를 알아보고자 하였다.

방법 : 임신 18일된 백서의 대뇌피질 신경세포를 배양하여 정상산소 상태군과 저산소 상태군으로 두 군으로 나누고, 정상산소 상태는 5% CO₂ 배양기에, 저산소 상태는 1% CO₂ 배양기에서 세포 수를 세면서 단일한 처리하여 현미경하에서 충분한 손상이 있다고 판단되면 두 군을 각각 대조군, 미노사이클린 1 µg/mL, 10 µg/mL로 처리한 군으로 나누어서 실험하였다. TUNEL 및 DAPI 염색으로 세포 고사 상태를 통계학적으로 처리하였다.

결과 : 정상산소 상태군에서 대조군과 미노사이클린 1 µg/mL 투여군, 미노사이클린 10 µg/mL 투여군 3군 모두에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.01). 저산소 상태군에서 대조군과 미노사이클린 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었으나(P<0.01), 미노사이클린 투여군 간에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05). 정상산소 상태군과 저산소 상태군간의 대조군과 미노사이클린 1 µg/mL 투여군의 비교에서는 정상산소 상태군이 저산소 상태군보다 평균이 낮아 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.01). 정상산소 상태군과 저산소 상태군간의 미노사이클린 10 µg/ml 투여군의 비교에서는 정상산소 상태군이 저산소 상태군보다 다소 평균이 낮았으나 통계학적으로 유의성은 없었다(P>0.05).

결론 : 결론적으로 미노사이클린은 고사를 억제하는 기전으로 저산소 상태나 정상 산소 상태에서 뇌보호 효과가 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Volpe JJ. Perinatal brain injury from pathogenesis to neuroprotection. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2001;7:56-64.
- 2) Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. Ann NY Acad Sci 1997;835:234-9.
- 3) White A. Systemic review of therapy after hypoxic-ischaemic brain injury in the perinatal period. Semin Neonatol 2000;5:33-40.
- 4) Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Novel

- treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol* 2000;5:75-86.
- 5) McDonald JW, Silverstein FS, Jhonston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 1990;15:41-70.
 - 6) Ishida A, trescher WH, Lange MS, Johnston MV. Prolonged suppression of brain nitric oxide synthase activity by 7-nitroindazole protects against cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. *Brain Dev* 2001;23:349-54.
 - 7) Johnston BM, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD. Insulin-like growth factor-1 is a potent neuronal rescue agent after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *J Clin Invest* 1996;97:300-8.
 - 8) Cheng U, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Giddy JM, Shah A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998;101:1992-99.
 - 9) Thoresen M, Bagenholm R, Loberg EM, Apricena F, Kjellmer I. Post-hypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;74:F3-F9.
 - 10) Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15769-74.
 - 11) Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Pak H, Chan, Koistinaho JA. Tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13496-50.
 - 12) Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* 2001;48:1393-99.
 - 13) Popovic N, Schubatt A, Goetz BD, Su-Chun Zhang, Chris Lington, Duncan ID, et al. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol* 2002;51:215-23.
 - 14) Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14669-74.
 - 15) Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zuh S, et al. Minocycline inhibits caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2000;6:797-801.
 - 16) Arvin KL, Han BH, Yansheng Du, Sui-zhen Lin, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline markedly protects the neonatal brain against Hypoxic-Ischemic injury. *Ann Neurol* 2002;52:54-61.
 - 17) Brewer GJ. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Meth* 1997;71:143-55.
 - 18) Bass E. Cardiopulmonary arrest. Pathophysiology and neurologic complications. *Ann Intern Med* 1985;103:920-7.
 - 19) Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiology* 1992;23:1261-76.
 - 20) Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 1993;14:133-51.
 - 21) Collingridge GL, Lester RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol* 1989;41:143-210.
 - 22) McConkey DJ, Orrenius S, Jondal M. Agents that elevate c-AMP stimulate DNA fragmentation in thrombocytes. *J Immunol* 1990;145:1227-30.
 - 23) Carbonari M, Cibati M, Fioilli M. Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. *Cytometry* 1995;22:161-7.
 - 24) Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. NGF protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 1996;39:114-22.
 - 25) Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000;20:5775-81.
 - 26) Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1994;35:10-4.
 - 27) Germano IM, Bartkowski HM, Cassel ME, Pitts LH. The therapeutic value of nimodipine in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 1987;67:81-7.
 - 28) Hall RT, Hall FK, Daily DK. High dose phenobarbital therapy in term new-born infants with severe perinatal asphyxia. A randomized, prospective study with three-year follow-up. *J Pediatr* 1998;132:345-8.
 - 29) Arias RL, Tasse JR, Bowlby MR. Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an in vitro model of cerebral ischemia. *Brain Res* 1999;816:299-308.
 - 30) Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. An adenosine analogue, 2-chloroadenosine, protects against long term development of ischaemic cell loss in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1987;83:287-92.
 - 31) Nunez JL, Alt JJ, McCarthy MM. A novel model for prenatal brain damage. Ii. long-term deficits in hippocampal cell number and hippocampal-dependent behavior following neonatal GABA(A) receptor activation. *Exp Neurol* 2003;181:270-80.
 - 32) Rozza A, La Torre G, Scavini C, Lanza E, Favalli L, Raccagni G. k-opioid receptor changes in experimental models of cerebral ischaemia and atherosclerosis in the rabbit. *Pharmacol Res* 1992;26:409-15.
 - 33) Arque C, Leroux P, Bodenanc C, Laquerriere A, Marpeau L, Marret S. Glucocorticoid treatment in an ischaemic-like excitotoxic model of periventricular leucomalacia in mice. *B JOG* 2000;109:989-96.
 - 34) Jin K, Mao XO, Sun Y, Xie L, Greenberg DA. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and vivo. *J Clin Invest* 2002;101:311-9.
 - 35) O'Dell JR, Paulsen G, Haire CE, Blakely KW, Palmer W, Wees SJ, et al. Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis with minocycline. Four-year follow up of a double blind placebo controlled trial. *Arthritis Rheum* 1992;42:1691-5.
 - 36) Goulden V, Glass D, Cunliffe WJ. Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne. *Br J Der-*

- matol 1996;134:693-5.
- 37) Ryan M, Greenwald RA, Golub LM. Potential of tetracycline to modify cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1996;8:238-47.
- 38) Golub LM, Ramamurty NS, Llavaneras A, Ryan ME, Lee HM, Liu Y, et al. A chemically modified non-microbial tetracycline(CMT-8) inhibits gingival matrix metalloproteinases, periodontal breakdown, and extra-oral bone loss in ovariectomized rats. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:290-310.
- 39) Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15769-74.
- 40) Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 2001;25:80-8.
- 41) Zhu S, Stavrovskaya IG, Drodza M, Kim BY, Ona Y, Li M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 2002;417:74-8.
- 42) Tiina Tikka, Taina Usenius, Mikko Tenhunen, Riitta Keinanen, Jari Koistinaho. Tetracycline derivatives and ceftriaxone, a cephalosporin antibiotic, protect neurons against apoptosis induced by ionizing radiation. *J Neurochem* 2001; 78:1409-14.
-