

國立台灣大學生物資源暨農學院獸醫學研究所

碩士論文

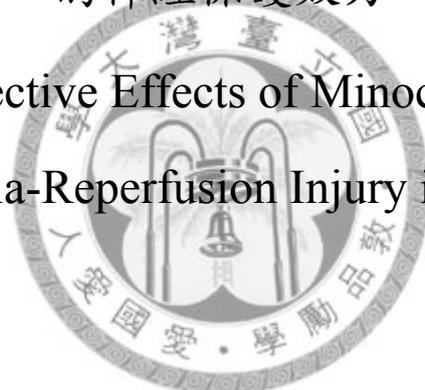
Graduate Institute of Veterinary Medicine  
College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

Minocycline 對於大鼠視網膜缺血再灌流性傷害  
的神經保護效力

The Neuroprotective Effects of Minocycline on Retinal  
Ischemia-Reperfusion Injury in the rat



黃珮筠

Pei-Yun Huang

指導教授：林中天 博士

Advisor: Chung-Tien Lin, DVM, Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

## 誌謝

時光匆匆，研究所的三年歲月，悄悄地在無數動物和實驗之間溜走了，感覺相當漫長，但暮然回首，道別的時候卻已降臨了。

完成我這論文研究的最大功臣，莫過於那些犧牲的大白鼠了，多謝牠們為了實驗的付出。心中存著最大的感激，將此論文獻給無怨無悔支持我努力就學的父母親與家人，還有不斷給我細心指導的林中天老師。父母親在生活上的支持鼓勵，還有林中天老師與葉力森老師在臨床生活上無私無己的教學熱忱，讓我一輩子都因這段充實的外科生活而獲益良多。另外感謝劉振軒老師、葉力森老師與林中天老師在口試中非常熱心的指導及指正我論文的方向，使我的論文更加嚴謹完整。

在這段不算短的日子裡，由衷地感謝醫院裡的所有醫師們給我無限熱情的幫忙。親切的研究室學長姊恩宜、文智、俊琨、世鴻、佳紘、小蕙，不管在研究或臨床上經常給予建議；這一路陪伴我從小小的 415 到 213 所有伙伴們：念庭、國軒、麗雅、詩婷、張可卡、沛劭、小蕾，我們有自己的天堂與最美的回憶，你們是最棒的！小武學姊、文傑學長、詩梅學姊、依津學姊、雨青學姊、欣怡學姐、以及青峰、老柏、佚宣、尚麟、騰猷與贊慧等，在我這三年的外科生涯裡，臨床方面給我無數的指導與建議，多謝你（妳）們！

珮筠 民國九十七年七月於台大動物醫院外科

## 目錄

中文摘要.....	1.
英文摘要.....	2.
第一章 緒言.....	4.
第一節 視網膜缺血性病變.....	4.
第二節 視網膜神經保護概念與治療策略.....	4.
一、視網膜缺血再灌流導致的傷害機轉.....	4.
二、神經保護策略及途徑.....	8.
第三節 視網膜缺血再灌流性病變之動物模式.....	10.
一、簡介.....	10.
二、視網膜缺血性病變評估.....	11.
第四節 Minocycline 的簡介與應用.....	14.
第五節 Methylprednisolone 的治療策略.....	18.
第六節 研究目的.....	19.
第二章 實驗材料與方法.....	20.
第一節 實驗動物.....	20.
第二節 實驗材料與分組.....	20.
第三節 大鼠視網膜缺血再灌流模式.....	21.
第四節 藥物的劑量與投予.....	21.
第五節 視網膜電波圖的紀錄與分析.....	22.
第六節 組織病理學切片評估.....	23.
第七節 統計與分析方法.....	24.
第三章 實驗結果.....	25.
第一節 視網膜電波圖電生理分析結果.....	25.
一、建立高眼內壓導致視網膜缺血再灌流模式.....	25.

二、視網膜電波圖 b-wave ratio 下降幅度分析比較.....	31.
三、視網膜電波圖 a 波和 b 波綜合比較.....	39.
第二節 組織病理型態分析報告.....	41.
一、各層視網膜厚度病變比較.....	41.
二、內叢狀層與外核層的比值分析.....	47.
<b>第四章 討論.....</b>	<b>49.</b>
第一節 視網膜缺血性病變的模式.....	49.
第二節 神經保護藥物的選擇.....	50.
第三節 視網膜電波圖討論.....	51.
一、視網膜功能評估的選擇.....	51.
二、統計視網膜保護效力結果與文獻之討論.....	52.
三、不同光源強度的使用與討論.....	56.
第四節 組織病理型態的討論.....	59.
一、缺血再灌流對病理型態上之影響.....	59.
二、病理結果的統計與文獻之討論.....	60.
第五節 評估藥物保護效果.....	62.
<b>第五章 結論.....</b>	<b>64.</b>
<b>第六章 參考文獻.....</b>	<b>65.</b>

## 摘要

美諾四環黴素(minocycline)是一種半合成、四環素(tetracycline)的第二代衍生物，應用於治療格蘭氏陰性菌或陽性菌的感染，近年來在許多研究腦部缺血或退化性疾病的實驗模式中，被發現具有神經保護的效果。

本篇研究目標在探討腹腔注射藥物minocycline是否對於視網膜缺血性病變有神經保護效果。本實驗採高眼內壓誘發視網膜缺血模式，大鼠眼前房以30號針頭穿刺，並連接上含生理食鹽水的點滴袋，將眼內壓提高到130mmHg，造成眼底視網膜完全缺血的狀態持續45分鐘。治療組分為兩個劑量，分別為每日45 mg/kg及90 mg/kg的minocycline腹腔注射。傷害評估利用缺血後第三天及第七天的視網膜電波圖，來檢查視網膜功能的改變，以及缺血後七天在組織病理形態及視網膜的厚度改變。其結果並和給予生理食鹽水和methylprednisolone的組別作比較分析。

視網膜電波圖的結果顯示，在給予缺血再灌流的傷害後，缺血眼的b波有顯著下降的趨勢(平均b波波幅損失 $74\pm 2\%$ )，而相對的a波影響較少。給予兩種劑量45 mg/kg及90 mg/kg的minocycline都有改善視網膜功能受損的情形，其視網膜電波圖的結果，分別為損失 $37\pm 6\%$ 及 $43\pm 2\%$ 的b波。組織病理結果顯示內層視網膜傷害均比外層強，而內叢狀層與外核層的比值(IPL/ONL ratio) 與正常的百分比分析(% of 正常)，缺血無治療組(IR-control)只剩下44.1%，45 mg/kg及90 mg/kg的minocycline治療組(Mino-45、Mino-90)顯示存留程度為93.4%和94.1%，而methylprednisolone治療組(MP)剩存的百分比可高達96.7%，幾乎沒有下降。根據結果指出，minocycline與methylprednisolone對於大鼠視網膜缺血再灌流模式，在組織病理的型態劑量上展現出良好的視網膜視網膜保護效果，而在視網膜功能方面可提供中等程度的神經保護效果。

## Abstract

Minocycline, a microglial inhibitor, has recently been shown to be neuroprotective in various models of cerebral ischemia and degenerative diseases. The purpose of this study was to investigate the neuroprotective effect of intraperitoneal minocycline against the retinal ischemia-reperfusion (IR) injury in the rat. The retinal IR injury model was induced in Sprague-Dawley rats by infusing normal saline (0.9%) into anterior chamber of eye to create a higher intraocular pressure (IOP) than blood pressure for 45 min. Minocycline was given intraperitoneally at dosages of 45 mg/kg per day and 90 mg/kg per day in rats of IR injury model. The effects were evaluated by electroretinogram (ERG) 3 days and 7 days after ischemia respectively, and compared with the groups treated with saline and methylprednisolone (30mg/kg, IV). Present results have indicated that ischemia-reperfusion (IR) injury caused retinal damage characterized by a decline in electroretinogram b-wave (loss of  $74\pm 2\%$  b-wave,  $n=5$ ) whereas the a-wave was relatively unaffected. Administration of minocycline in both doses ameliorated the damage of retinal function. The b-wave of ERG dropped down  $37\pm 6\%$  in the 90 mg/kg/day group ( $n=6$ ) and  $43\pm 2\%$  in the 45mg/kg/day group ( $n=6$ ). In the morphometrical histology, the retinal inner plexiform layer/outer nuclear layer (IPL/ONL) ratio was reduced following IR damage compared with that in the normal control. The IPL/ONL ratio was reduced to 44.1% in the IR-control group, 93.4% and

94.1% in the Mino-45 and Mino-90 group. While the IPL/ONL ratio was preserved to 96.7% in the MP group. According to the results, minocycline and methylprednisolone showed significantly good neuroprotective effects demonstrated in histology, but moderate neuroprotective effects in retinal function of the rats under retinal ischemia-reperfusion injury.



# 第一章 緒言

## 第一節 視網膜缺血性病變

視網膜缺血(retinal ischemia)或視神經缺血性傷害常會發生在青光眼、糖尿病性視網膜病變、高血壓、或視網膜動脈血管阻塞等疾病。視網膜缺血常會造成視力受損，因為缺血時，視網膜缺乏正常代謝所需的能量，也無法排除組織產生的廢物，造成細胞膜去極化、細胞內鈣離子的注入、氧化傷害等一連串的失衡反應，使神經細胞凋零或死亡，隨著缺血時間的加長，將會造成組織的損傷，嚴重者會造成永久的失明 (Osborne *et al.*, 2004a)。

## 第二節 視網膜神經保護概念與治療策略

在治療方面，近年來有許多研究致力於找出可以阻斷缺血後一連串氧化傷害至細胞凋亡的機制，已有一些作用在不同機制的藥物或成分，在實驗動物上證實能有效的減緩神經的受損，但在臨床上還需考量藥物投予的方式、劑型、劑量、藥物動力學及可行性等(Osborne *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2004a)。現今已有許多有關腦部缺血性傷害的研究，但視網膜有其獨特的代謝和環境結構，未來研究將以保護視網膜神經功能為目標，尋求對於視網膜缺血再灌流傷害具有良好的神經保護效果的藥物。

### 一、視網膜缺血再灌流導致的傷害機轉

視網膜在遭受到缺血傷害後，常有不可回復的組織病理型態或功能性的改變，而這些傷害都是起源於缺乏氧及葡萄糖，導致細胞內的腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)耗盡的後果。雖然短時間的缺乏不會造成毀滅性的災難，但缺血再灌流後皆下來由許多相關或不相關的生物化學反應構成，造成細胞內外離子移動、神經傳導物質及代謝反應的混

亂，導致一連串複雜的神經細胞傷害途徑，至今尚未完全明瞭 (Osborne *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2001)。簡單來說，在視網膜缺血初期的時候，由於供應視網膜的氧氣及葡萄糖被阻斷，減少了糖解作用及氧化連酸化的速度，導致神經細胞內的ATP減少，造成一系列細胞膜破壞及離子平衡失調 (Lipton, 1999)。當神經細胞內的ATP減少時會迅速的造成鈉鉀離子幫浦 ( $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase transporter) 的活性受損，而干擾細胞膜電位，使細胞內鈉離子濃度梯度增加，並抑制了細胞膜在去極化(depolarization)後的再極化(repolarization)，這樣的現象使鈣離子幫浦( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase)受損，使大量的鈣離子直接的湧入細胞內。另外，細胞膜的再極化受到抑制後，也會活化了突觸後神經細胞上麩胺酸(glutamate)離子通道性受體(ionotropic receptor)或代謝性受體(metabotropic receptors)，而glutamate這種興奮性神經傳遞物質的增加會進一步活化NMDA受體(N-methyl-D-aspartate, N-甲基-D-天門冬胺酸鹽)，而打開配體閘控的鈣離子通道(ligand-gated calcium channel)，繼續使鈣離子內流 (Zeevalk & Nicklas, 1992)。當細胞內聚積過多的鈣離子會帶來很多有害的影響，例如損害粒腺體的功能使細胞內的ATP進一步減少，促進活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)的產生，並活化細胞內proteases和一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)，綜合以上的結果最終導致組織的水腫而使神經細胞破裂死亡 (Osborne *et al.*, 1999)。可參考圖1-1，針對視網膜缺血後，一連串造成細胞凋零死亡的連鎖反應。

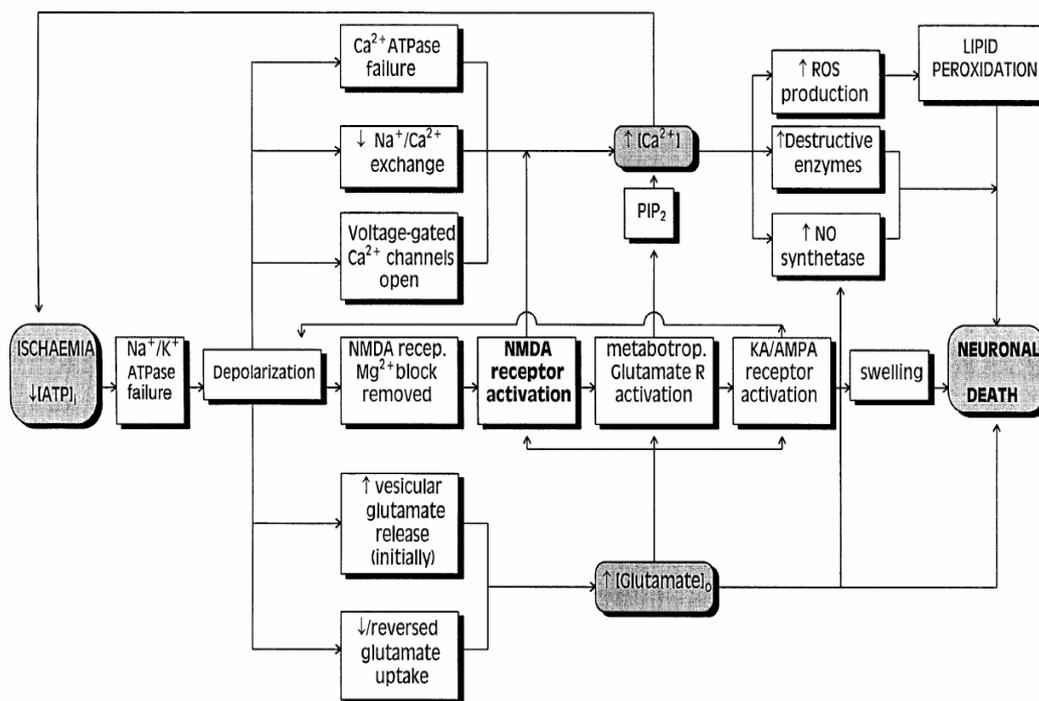
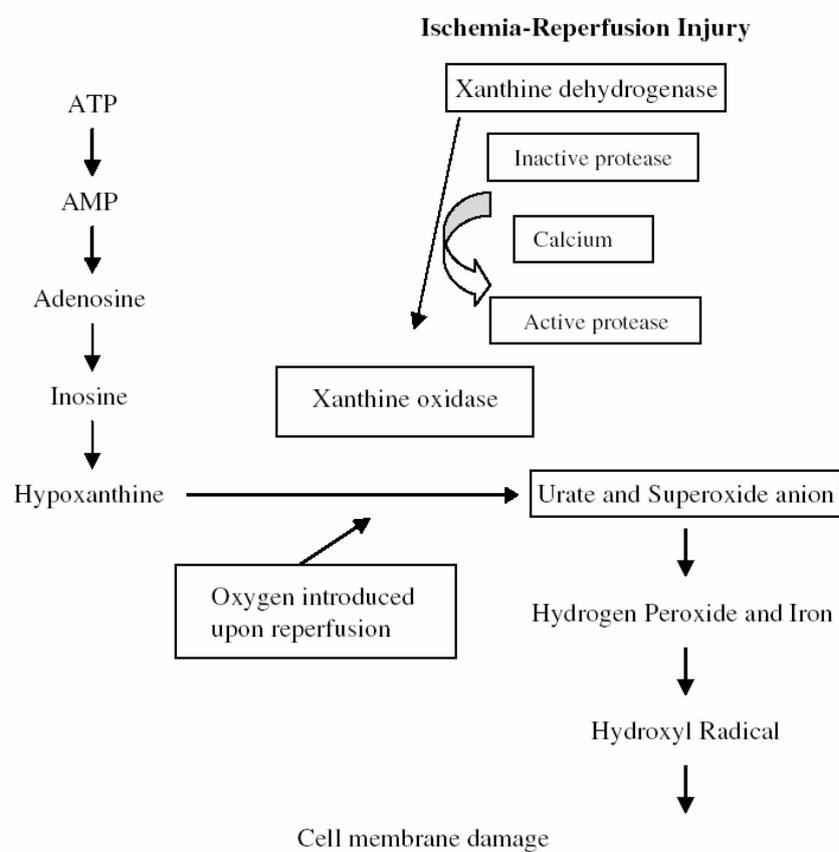


圖1-1 視網膜缺血造成細胞凋零死亡的連鎖反應 (Osborne *et al.*, 1999)

上述因 glutamate 的產生或氧氣/葡萄糖的耗盡而發生的一連串途徑，皆會造成自由基 (free radicals) 的釋放，而這些自由基也在視網膜缺血性傷害中扮演重要的角色 (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1990)。這些自由基的釋放通常是在再灌流 (reperfusion) 初期，當釋放的自由基多於細胞的抗氧化防禦時，就會對組織產生各種型態的氧化傷害 (Bonne *et al.*, 1998; Osborne *et al.*, 2004a)，可參考圖 1-2。當血液再灌流進入組織中，會產生大量的自由基，因為在缺血時 ATP 的耗盡會導致 hypoxanthine 的產生，且神經細胞內增加的鈣離子會活化鈣離子依賴性蛋白酶 calpain，calpain 將 xanthine dehydrogenase 轉換成 xanthine oxidase，而在再灌流的情況下 xanthine oxidase 這種酵素會將聚集的 hypoxanthine 氧化成為尿酸 (uric acid)，造成超氧離子 (superoxide radical,  $\cdot O_2^-$ ) 的釋放，產生更進一步的傷害 (Osborne *et al.*, 2004a; Jian Liu & Rosenberg, 2005)。



**圖1-2 缺血再灌流傷害細胞膜的機制**

圖示細胞在缺血再灌流傷害後的路徑，首先ATP會被分解，鈣離子將 xanthine dehydrogenase轉成xanthine oxidase，使活性增加。氧再介入後使hydroxyl radical出現傷害細胞。ATP= adenosine triphosphate, AMP= adenosine monophosphate. (McMichael, 2004; McMichael and Moore, 2004)

至目前為止越來越多證據指出，急性的炎症反應會造成大腦的缺血性病變，尤其在再灌流之後。有數種機制關於缺血後的炎症反應可能會造成腦神經傷害被提出 (Danton & Dietrich, 2003)，受損的神經膠細胞或活化的炎症細胞釋放出一些毒性媒介物，例如一氧化氮(nitric oxide, NO)、花生四烯酸(arachidonic acid)、白介素第一型(interleukin-1, IL-1)、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)等被提出 (Gustavsson *et al.*, 2008)。

另外，Nickells及Zack對於apoptosis在青光眼神經節細胞的分子途徑也有深入的探討 (Nickells & Zack, 1996)。Apoptosis在青光眼中造成的神經節細胞死亡理論，不斷有新的分子機制被提出和討論 (Nickells, 1999; Zhang *et al.*, 2002)。

## 二、神經保護策略及途徑

近年來針對視網膜缺血再灌流性傷害，已有許多可以阻斷缺血後一連串氧化傷害致細胞凋亡的機制被提出 (Osborne *et al.*, 2001; Osborne *et al.*, 2004a)。因視網膜缺血後的一連串傷害途徑非常複雜，可參考圖1-3針對視網膜缺血病變的保護治療以簡圖做說明，圖中解釋有許多不同的治療方法，可針對各個不同的目標點及傷害機制，去干擾或中斷病變的延伸，以降低缺血再灌流所造成的傷害。表1-1整理了過去部分文獻，已有許多不同的物質，被研究證明在動物模式上可針對不同的保護機制，達到降低缺血所造成視網膜的傷害 (Osborne *et al.*, 2004a)。

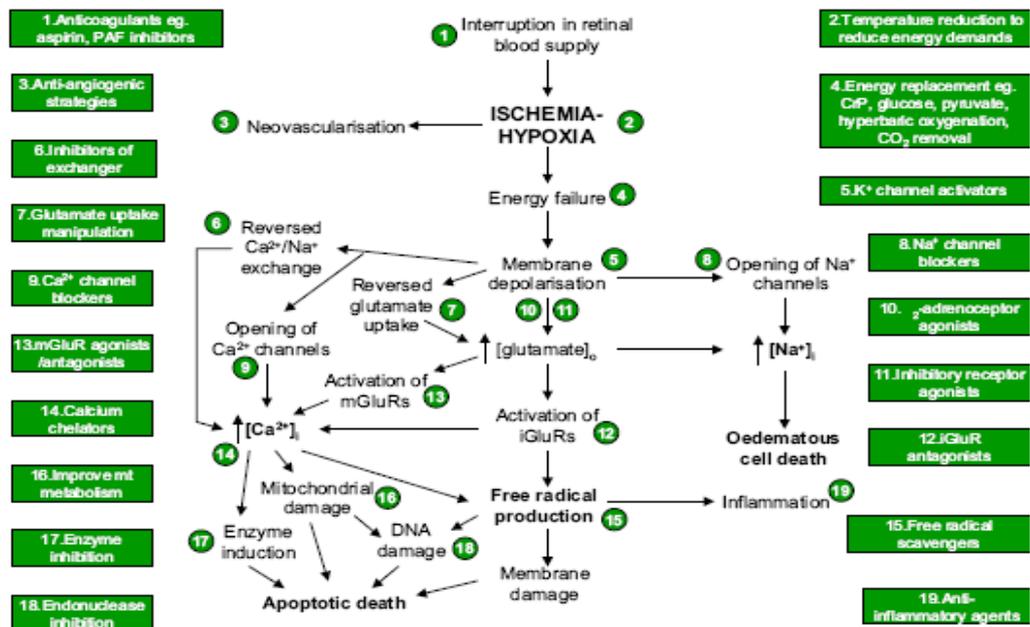


圖1-3 視網膜缺血病變的保護治療策略

上圖闡明詳細的視網膜缺血再灌注傷害的機制，顯示目前已有許多治療藥物被研究，針對在不同的路徑上的使用，以期能中斷干擾病變的延伸。

因視網膜缺血後的病變非常複雜，臨床上目前仍無有效的治療方針，最有可能也是最重要的，就是在缺血初期能夠重建提供營養物質的供應。另外，目前大部分的動物實驗都是在視網膜缺血前即給予神經保護藥物，但是在臨床上，除了一些“慢性”視網膜缺血例如糖尿病或慢性青光眼患者，其餘大多數的往往都是缺血發生後才開始投予藥物。因此如果要研究臨床上能提供有效的神經保護藥物，實驗所給予藥物的時間點可能必須要在缺血後或是缺血病變正在進行中(Osborne *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2004a)。

Putative mechanism	Strategy / drug
Maintain retinal energy supply	Glucose, Oxygen
Reduce retinal energy demand	Hypothermia
Decrease [glutamate]	Ca <sup>2+</sup> channels blocker, $\alpha$ 2-Adrenoceptor
Block NMDA receptors	Dextromethorphen, Zinc
Block voltage-gated Ca <sup>2+</sup>	Flunarizine, $\beta$ - Adrenoceptor agonists
Prevent oxidative damage	Catalase, Vitamin E
Prevent apoptotic cell death	Calpain inhibitors
Prevent inflammation	COX-2 inhibitors, Interleukin-1 inhibitors

表1-1 針對各種不同的視網膜缺血性傷害途徑，活體內(*in vivo*)所提出之可能的神經保護藥物 (Osborne *et al.*, 2004a)

### 第三節 視網膜缺血再灌流性病變之動物模式

#### 一、簡介

在哺乳類動物包括活體內(*in vivo*)或活體外(*ex vitro*)，已有許多模式被建立用來研究視網膜缺血病變(參考下表)。因視網膜的血管分佈在不同種別的動物差異很大，在研究動物模式中受到了許多限制，高等靈長類視網膜的血管解剖構造與人類一樣，但基於財物、人道的考量，往往不能使用。在常見的實驗動物中，大鼠(*rat*)視網膜的血流供應型態與人類最為接近，都是全血管型態(*holangiomatic pattern*)，視網膜內層血管從中央視神經到周邊睫狀體皆有分佈。因此使用大鼠來研究狗貓或人類視網膜缺血性病變是較為理想的實驗動物模式 (Osborne *et al.*, 2004a)。

目前已有許多動物模式被建立用於研究視網膜缺血病變，可以參考表1-2，例如增加眼內壓(*high intraocular pressure, HIOP*)來造成視網膜的缺血、結紮視神經束(*optic nerve bundle*)或後側睫狀體血管(*posterior ciliary vessels*)，以上的方法都可以達到完全的阻斷視網膜的血流供應。

Experimental method	Degree of ischemia	Human disease correlate	Selected references
High intraocular pressure	Complete	CRAO, acute angle-closure glaucoma, ophthalmic artery occlusion	Smith and Baird (1952) and Buchi <i>et al.</i> (1991)
Ligature of optic nerve bundle	Complete	CRAO, ophthalmic artery occlusion	Stefansson <i>et al.</i> (1988)
Ligature of ophthalmic vessels	Complete	CRAO, ophthalmic artery occlusion	Otori <i>et al.</i> (1997) and Vidal-Sanz <i>et al.</i> (2001)
Bilateral occlusion of common carotid artery (2-vessel occlusion)	Incomplete	CRAO, ophthalmic artery occlusion, carotid insufficiency	Osborne <i>et al.</i> (1991) and Block <i>et al.</i> (1992)
Bilateral occlusion of vertebral and common carotid arteries (4-vessel occlusion)	Complete	Cardiac arrest/hypovolaemic shock	Osborne <i>et al.</i> (1991) and Block <i>et al.</i> (1992)
Photodynamic ablation	Incomplete	BRAO	Mosinger and Olney (1991) and Daugeleiene <i>et al.</i> (2000)
Cardiac arrest	Complete	Cardiac arrest	Feher and Antal (1979) and Strosznajder <i>et al.</i> (1998)
Postmortem ischemia	Complete	—	Johnson and Grierson (1976) and Napper and Kalloniatis (1999)
Intravitreal injection of glutamate receptor agonists	Incomplete?	CRAO?	Schwarz and Coyle (1977) and Siliprandi <i>et al.</i> (1992)

表 1-2 各種視網膜缺血的動物模式 (Osborne *et al.*, 2004a)

高眼壓模式(*HIOP*)廣泛的應用在各種視網膜缺血的研究，本實驗即採用此模式。此模式最早於1952年由Smith與Baird所提出，將無菌的輸液注入眼內，使產生足夠的壓力來阻斷所有的血流，當時並不清楚注入的輸液

進入眼球的前側或後側 (Smith & Baird, 1952)。在1991年Buchi等人改良，將針頭穿入大鼠眼前房並與輸液連接，升高輸液使壓力提高到110mmHg，此眼內壓高過於眼睛的灌注壓力，可壓迫阻斷視網膜與葡萄膜的循環造成眼球全面性的缺血，可以眼底和虹膜變白及視網膜電波圖的震幅消失來確認缺血狀態 (Buchi *et al.*, 1991)。此模式為造成急性且完全性的缺血，在病理特徵上與中央視網膜血管阻塞(central retinal artery occlusion, CRAO)相似，也可以作為模擬急性隅角封閉型青光眼(acute angle closure glaucoma)的病變研究 (Osborne *et al.*, 2004a)。

## 二、視網膜缺血性病變評估

視網膜缺血導致細胞的傷害已被證實，有些研究指出以內側的視網膜神經細胞死亡較為明顯 (Osborne *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2001)。在過去的文獻中有提到，若超過20分鐘的缺血，視網膜電生理功能的測試結果顯示視網膜遭受不可恢復的傷害。若給予缺血時間處理不夠長，可能只會造成視網膜電波圖震幅暫時性的變化，再灌注後會回復正常的狀況 (Foulds & Johnson, 1974)。而超過35分鐘的完全缺血，可以免疫組織染色的方法來觀察病變 (Safa & Osborne, 2000)。若要在組織病理切片下看到型態學明顯的改變，例如視網膜變薄或細胞數量減少，可能需要超過45分鐘的缺血，因視網膜缺血45分鐘是造成可觀察性的神經病變型態的最短時間 (Selles-Navarro *et al.*, 1996)。故許多研究藥物對於視網膜缺血傷害的動物實驗，若想在病理學上觀察到異常，最低的缺血時間必須超過45分鐘 (Chao & Osborne, 2001; Chidlow *et al.*, 2002; Shibuki *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2004b)。

### A. 視網膜功能評估

閃光式視網膜電波圖(flash electroretinogram, ERG)是記錄視網膜

對於光的刺激所產生的電生理訊號，所記錄的波型是所有視網膜細胞電生理訊號的綜合，也代表整體視網膜的功能狀況。一般來說，視網膜電波圖所呈現的a波是從從光接受器層(photoreceptors)所產生的電生理訊號，c波是從視網膜色素上皮層(pigment epithelium)而來的，而b波是雙極細胞(bipolar cells)與穆勒氏細胞(Müller cells)鉀離子的流動所產生(Osborne *et al.*, 2004a)。Granit是首位利用視網膜電波圖證實在缺血後視網膜的功能會下降 (Granit, 1933)，在稍早的研究文獻指出，無論是提高眼內壓力或結紮視網膜中央動脈引起的急性缺血，都會在視網膜電波圖上造成明顯b波的損失，而相較之下a波保留較多 (Mukaida *et al.*, 2004)。

所測得的b波的減少，被認為對視網膜缺血性病變的預後是不好的，而b/a波的比值在人類被當成中央視網膜血管阻塞(central retinal artery occlusion, CRAO)視網膜缺血的程度和預後指標 (Johnson & McPhee, 1993)。Foulds和Johnson兔子的高眼壓缺血模式，顯示視網膜缺血再灌流後，b波恢復的程度和缺血的時間有相關，並且b波對於視網膜缺血性傷害比a波和c波敏感很多，因此b波震幅的變化經常被用來評估缺血性傷害所造成視網膜損傷的程度 (Foulds & Johnson, 1974)。已有許多研究指出對於視網膜缺血性傷害，視網膜電波圖檢查的敏感性比其他方法高，有人指出即使在病理結構上看似正常的視網膜，有時已顯示出視網膜電波的下降，代表功能上也減退。雖然b波的來源大致已確定，但缺血性病變導致b波下降的確實機制還未非常明確，可能跟外層的視網膜對缺血性傷害較有抵抗性有關(Osborne *et al.*, 2004a)。

過去大多數的研究報告是利用單一強度光源刺激，去測量b波的改變來評估視網膜的功能性。若使用多種光源強度，可檢查出整體視網膜對於光刺激的細微敏感度和最大的刺激震幅，而各個刺激強光之間

的間隔建議2秒至120秒之間，光源強度由低到高來測量 (Mukaida *et al.*, 2004)。

另外除了基本的a、b、c三波組成視網膜電波圖基本的波型，在暗視野下用亮光(bright flash)刺激也會產生一種震盪電位(oscillatory potentials, OPs)，這些高頻的微波大多從視網膜內層細胞，尤其是無軸突細胞(amacrine cells)所產生的。異常的震盪電位常和視網膜缺血病變有關，尤其是糖尿病性視網膜病變，但因震盪電位不易精確的紀錄定量病變的程度，較少用來當做測量的指標 (Narfstrom, 2002; Osborne *et al.*, 2004a)。

視網膜電波圖除了可以作為缺血性傷害的指標，許多研究也利用來評估藥物改善缺血性傷害的效果。若經過藥物治療後，視網膜缺血造成b波減少的情形有改善，則顯示此藥物有神經保護的效果，而這種“功能性保護”也被視為病患的至少有部分的視力被保留，但精確的定量和意義還未非常明瞭。但因對於視網膜功能以及缺血性傷害具有高度的敏感性，使得視網膜電波圖檢查成為建立神經保護藥物對於視網膜缺血的動物模式上，最重要的評估工具 (Osborne *et al.*, 2004a)。

## B. 組織病理學評估

視網膜缺血性病變也常藉由分析組織病理，例如存活細胞的數目、型態上的變化等，來評估傷害的程度。但是組織病理學分析一次只能局限在一小部分的視網膜，而視網膜電波圖則反應整個視網膜的生理狀況，因此單以組織病理的評估，較適合作為輔助性的分析方法 (Grozdanic *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2004a)。

視網膜起源於部分的中腦，與腦的功能和結構上的特徵有部分相似，但相較之下視網膜對於缺血性傷害抵抗力較強，在人類幾分鐘的缺血就會造成大腦廣泛性的傷害，而視網膜則可以承受較長的時間

(Hayreh & Weingeist, 1980)。許多模擬青光眼視網膜病變的動物實驗報告指出，在內側的視網膜對缺血性傷害較外側敏感，神經細胞死亡較明顯，但其他的視網膜細胞也有被報導 (Osborne *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2001)。有人認為一種神經特殊呼吸蛋白質(neuroglobin)大量的存在視網膜有關，特別是光接受器層(photoreceptors)，約為大腦的100倍 (Schmidt *et al.*, 2003)。也有人認為這些photoreceptors有特殊的能力可行無氧代謝獲取能源 (Stone *et al.*, 1999)。而以上所有的報告，不論是何種動物模式都指出缺血性傷害會造成神經節細胞層(ganglion cells)損傷與缺失 (Osborne *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2004a)。

#### 第四節 Minocycline的簡介與應用

1967年Minocycline hydrochloride首度被分離發現，是一種半合成、四環素(tetracycline)的第二代衍生物，其結構如下圖1-4。近十年來應用於治療格蘭氏陰性菌或陽性菌的感染，特別是對抗金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)比其他的四環素來得有效，多用來治療痤瘡、中樞神經或泌尿道的感染、腦膜炎、結膜炎、鸚鵡病、牙周病等等。Minocycline就像其他的四環素，可以和30S ribosomal subunit結合、抑制RNA的轉錄來干擾細菌蛋白的合成 (Zemke & Majid, 2004; Elewa *et al.*, 2006)。

除了抗微生物的作用以外，過去五年左右，有許多報告指出在急性神經創傷的動物模式中(表1-3)，minocycline被證實有保護神經的特性，例如大腦全面的缺氧傷害 (Arvin *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2006)或局部的缺血傷害 (Xu *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2005; Hewlett & Corbett, 2006)。除了缺血傷害外，minocycline也被應用在治療脊椎或腦部的急性創傷，2001年Sanchez Mejia等人發現在小鼠腦部創傷模式中，受傷之前或之後馬上投予minocycline可以改善神經功能並減少病灶範圍 (Sanchez Mejia *et al.*,

2001)；脊椎創傷的小鼠模式以minocycline治療能明顯得恢復後肢的功能及力量 (Wells *et al.*, 2003)。至今為止minocycline應用在眼睛方面做為神經保護藥物的試驗還不多，目前只有少數文獻推測minocycline可以藉由抑制金屬基質酵素活化 (Mathalone *et al.*, 2007)、抗細胞凋零的效果 (Baptiste *et al.*, 2004)、抑制微膠質細胞的活化 (Zhang *et al.*, 2004)等種種機制來達到神經保護效果；另外，Maier等人於2007年在自體免疫調節視神經炎的大鼠模式中發現，minocycline能抑制神經細胞的凋零，而減緩視網膜退化 (Maier *et al.*, 2007)。上述的這些傷害不管在那種模式下，有類似的生理機制且必須早期的介入和治療，而minocycline在這些模式上不但能降低組織的傷害，也能幫助功能上的恢復。在許多急性神經的傷害，常用的神經保護藥物如鈣離子阻斷劑、glutamate antagonist等往往無法提供很好的效果，因它們對於血腦障蔽(blood-brain barrier)穿透力很差，無法發揮真正的效力。而minocycline則有優秀的血腦障蔽穿透力，且其親脂性較其他四環素類藥物來得高；在一動物實驗模式中發現，minocycline在腦中的濃度約可達血清中的50% (Smith *et al.*, 2003)，能提供實驗動物超過三小時的保護效果，並且minocycline是個安全的化合物，對於控制感染臨床上的使用是安全的 (Zemke & Majid, 2004; Elewa *et al.*, 2006)。

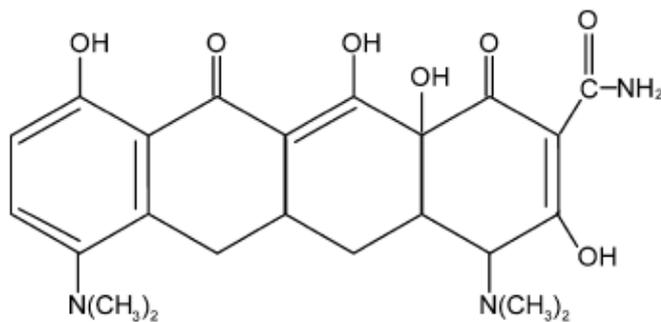


圖 1-4 Minocycline的化學結構式

**TABLE 1. Beneficial Effects of Minocycline in Animal Models of Neurologic Disease**

Animal Model of Disease	Effect of Minocycline
Focal ischemia	Decreased caspase 1 expression, inhibition of microglial activation
Global ischemia	Decreased caspase 1 expression, decreased iNOS expression, inhibition of microglial activation
Neonatal hypoxic ischemia	Inhibition of calpain-cleaved substrate production, inhibition of caspase 3
Intracerebral hemorrhage	Decreased MMP-12 expression, inhibition of microglial activation, inhibition of apoptosis
Traumatic brain injury	Inhibition of caspase 1
Spinal cord injury	Inhibition of caspase 3, inhibition of cytochrome c release
Huntington disease	Decreased caspase 1 expression, decreased caspase 3 expression, inhibition of iNOS
Amyotrophic lateral sclerosis	Inhibition of cytochrome c release
Multiple sclerosis	Decreased MMP-2 expression, increased IL-10 synthesis, decreased TNF- $\alpha$ synthesis
Parkinson disease	Decreased caspase 1 expression, decreased iNOS expression, inhibition of microglial activation, inhibition of p38 MAPK phosphorylation, inhibition of NADPH oxidase

**表1-3 Minocycline在各種神經疾病動物模式中的應用 (Zemke & Majid, 2004)**

Minocycline根據許多不同的機制，如抗炎症反應、抗細胞凋零、抑制基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等，而成為可能的神經保護藥物。

#### 一、抗炎症反應(Anti-inflammatory Effects)

四環素類的抗炎症效果已在許多急性或慢性神經創傷模式被證實，它們可以藉由阻止嗜中性球的移動、脫顆粒及氧化自由基的產生來減低嗜中性球調節組織傷害 (Golub *et al.*, 1991)。在一腦部缺血性傷害的動物模式上，發現minocycline可以抑制某些會誘導炎症反應的酵素如nitric oxide synthase、interleukin-1B converting enzyme，如此減少炎症反應、細胞凋零以及微膠細胞的活化等等 (Yrjanheikki *et al.*, 1998; Yrjanheikki *et al.*, 1999)。

另外，Tikka等人在活體外(*in vitro*)的實驗上證實極低濃度的minocycline可以保護大鼠腦神經免於一些因活性氧化自由基或nitric oxide造成的glutamate神經興奮毒性傷害 (Tikka *et al.*, 2001)，並抑制一些炎症反應訊息傳遞物質如p38等，減少腫瘤壞死因子的釋出等，並促進某些抗炎症細胞激素如interleukin-10的釋放 (Lin *et al.*, 2001)。因此minocycline成為抗炎症新的治療方式，年來也在許多急性腦部缺血模式中成為熱門的研究對象。

## 二、抗細胞凋零作用(Antiapoptotic Effects)

細胞凋零是細胞死亡的一種方式，在急性或慢性神經創傷都扮演重要的角色。Minocycline無論在*in vivo*或*in vitro*實驗模式上，都證明可以預防細胞凋零以及粒腺體釋放cytochrome c(細胞進行apoptosis，已知的markers變化之一)(Zhu *et al.*, 2002)。此藥並能藉由直接或間接抑制某些訊息或細胞激素，避免激活caspase級聯反應(他們活化後主要會切斷細胞內的結構蛋白質，也會破壞某些參與酵素代謝和訊息傳遞的蛋白質)，引起細胞凋亡)，達到減少粒腺體細胞死亡的目的 (Wang *et al.*, 2003)。此外，minocycline可向上調節抗細胞凋零蛋白bcl-2接受器數目增加，使bcl-2發揮其抑制apoptosis的功能 (Elewa *et al.*, 2006)。

## 三、抑制基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)

組織中的細胞隨時會和周圍的基質進行交互作用，持續的維持組織架構是由基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的活性所控制。他們的功能包括降解細胞外基質的構造，摧毀細胞表面的蛋白質、細胞激素與蛋白酶抑制劑，活化或是放潛伏的訊號分子或蛋白酶等，臨床上參與損傷修復、發炎反應、腫瘤轉移等病理生理狀況 (Yong *et al.*, 2001; Egeblad & Werb, 2002)。目前已有證據，在腦部缺血灌流傷害中，再灌流時所產生的自由基或氧化傷害會活化MMPs，進一步是血腦障蔽的蛋白質分解而破壞 (Jian Liu & Rosenberg, 2005)。Sivak and Fini指出，MMPs有表現於人類玻璃體和感光受器，尤其是MMP-9被發現在神經節細胞層有表現，在一些常見眼科疾病如青光眼、糖尿病性視網膜病變等，都發現有MMP短暫的增加現象 (Sivak & Fini, 2002)。並有研究指出，提高眼內壓後，發現MMP-9活性增加、細胞外基質降解與視網膜神經節細胞缺損都有極明顯的相互關係 (Guo *et al.*, 2005)。

四環黴素已知能抑制基質金屬酵素，低劑量的doxycycline更是第一個美國Food and Drug Administration (US FDA)認可的金屬基質酵素抑制劑，臨床上常用於牙周疾病 (Rifkin *et al.*, 1993; Ashley, 1999)。在大鼠的關節炎模式上，四環素類被證實可抑制MMP-2，改善發炎反應 (Greenwald *et al.*, 1992)。另外在大鼠的炎症性腦膜炎、顱內出血及腎臟缺血傷害等模式，minocycline被發現可以減少的MMP-9及MMP-12等的活性，進而保護神經減少傷害甚至改善功能 (Brundula *et al.*, 2002; Power *et al.*, 2003)。

#### 第五節 Methylprednisolone的治療策略

類固醇對於神經方面的治療實驗與臨床研究非常的多，然而單純針對缺血再灌流性病變的研究尤其是視網膜神經方面的研究非常的少。Methylprednisolone對於神經的親和性及抗炎症效果非常的好，在視網膜缺血再灌流之後，也會有如前述非常多的機制，如形成氧自由基、許多炎症物質的釋放或可能的apoptosis的死亡，methylprednisolone在過去對於其他器官或皮瓣移植等實驗，對於缺血再灌流性傷害皆有保護效果 (Slivka & Murphy, 2001; Askar & Bozkurt, 2002; Pearl *et al.*, 2002; Muratore *et al.*, 2003; Chimalakonda & Mehvar, 2004; Glanemann *et al.*, 2004; Akdemir *et al.*, 2005)。針對炎症物質的釋放，如一氧化氮、arachidonic acid、白介素第一因子 (IL-1) 與腫瘤壞死因子，等不同的機制去保護組織

Methylprednisolone的使用在臨床上很廣泛，雖然使用上仍具爭議性，但在各類器官移植手術中，常會建議例行性給予，例如肝臟手術，術後常因缺血再灌流的氧化傷害，造成肝臟實質過度炎症反應，因此會建議配合類固醇的使用 (Pulitano & Aldrighetti, 2008)。在大鼠肝臟缺血傷

害的實驗報告更是不勝枚舉，不管是移植或部分切除，經血管夾阻斷的血流再灌流後，皆可觀察到內皮細胞及Kupffer cells的水腫、血管收縮、炎症細胞浸潤、血小板聚集等再灌流所造成的炎症反應，進而使整個微循環系統故障衰退；而術前給予methylprednisolone在實驗大鼠的模式下，在病理、炎症介質IL-6的減少等都顯示能有效的降低炎症反應，至於對術後死亡率的改善，各家統計結果不一 (Muratore *et al.*, 2003; Chimalakonda & Mehvar, 2004; Saidi *et al.*, 2007)。在小豬未成熟心臟也顯示給予60mg/kg與30mg/kg的劑量，可以預防心臟缺血再灌流引起的apoptosis病變 (Pearl *et al.*, 2002)。在脊椎神經受傷的治療藥物方面，methylprednisolone是最常被使用並討論的藥物，至今已有三次大型的、完整規劃的臨床試驗評估其功效，分析結果顯示若在急性創傷八個小時內，methylprednisolone可以顯著的改善運動和感覺的功能，若超過24小時給予似乎沒有幫助，且延遲的給予類固醇可能會干擾生理再生功能，且對於一些脂質的氧化傷害似乎沒有保護作用 (Baptiste & Fehlings, 2006)。

## 第六節 研究目的

本實驗利用誘發高眼壓的大鼠模式，造成視網膜短暫性完全的缺血，高眼壓解除之後產生再灌流的傷害。治療方面則選擇使用在實驗上曾被報導對於其他器官缺血再灌流性傷害有效的藥物，但未曾使用在視網膜的缺血病變，其中包括minocycline與methylprednisolone。評估方法利用視網膜電波圖(electroretinography, ERG)檢查視網膜電生理上的變化，並以視網膜的組織病理變化，來分析不同藥物對視網膜的神經保護效果。

## 第二章 實驗材料與方法

### 第一節 實驗動物

本實驗採用約 8-10 週齡大雄性大鼠 SD (Sprague-Dawley rats)，體重約 300-400 克，從陽明實驗動物中心購得。飼養於台大動物醫院九樓實驗動物舍動物籠舍中，飲水與飼料供應充足，12 小時燈光以及 12 小時暗室的週期環境之中，環境溫度控制在  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度控制在 50-70%，購入至實驗前至少給予兩週以上的適應期。本動物實驗的進行皆符合 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 眼科動物使用規定 (ARVO Statement for the Use of Animal in Ophthalmic and Vision Research)。

犧牲動物選擇則以過量之全身麻醉藥 Thiamylal Sodium (Citosol®) 腹腔注射方式來進行安樂死。



### 第二節 實驗材料與分組

所選擇投予的藥物為米諾信® (Mirosin injection®, Minocycline HCl 100mg/vial，汎生)，與命得生® (Medason®, methylprednisolone sodium succinate 125mg/vial，南光)，皆為臨床上所使用的注射型藥物。

實驗分組為(1)不誘導高眼壓不使用任何藥物治療的對照組 (control group, n=6)，(2)不使用任何藥物，誘導高眼壓造成缺血再灌流病變的治療對照組 (ischemia-reperfusion, IR-control, n=5)；實驗組則分為(3)每日每公斤腹腔注射 minocycline 45 mg (mino-45, n=6)，(4)每日每公斤腹腔注射 minocycline 90 mg (mino-90, n=6)，以及靜脈給予 methylprednisolone (MP, n=5)。

### 第三節 大鼠視網膜缺血再灌流模式

所有實驗大鼠皆以密閉麻醉箱方式，使用 Isoflurane 麻醉氣體混入氧氣中誘導麻醉，待進入所需麻醉深度後接續使用面罩式來維持氣體麻醉之深度。

在誘導高眼壓前十分鐘，局部點眼給予麻睫散瞳® (Mydriacyl®, tropicamide 0.5%, Alcon) 散瞳，並在前三十秒給予點眼愛爾卡因® (Alcaine®, proparacaine HCl 0.5%, Alcon) 局部麻醉。每隻參與實驗的大鼠，包括未治療的 IR 對照組、minocycline 45 mg/kg/day 組、minocycline 90 mg/kg/day 組、methylprednisolon 的治療實驗組，大鼠左眼均給予高眼壓處理，而右眼做為對照不予高眼壓處理。

本實驗採用高眼壓模式 (high intraocular pressure, HIOP)，方法為使用 30 號針頭刺入眼球之前房，連接上含生理食鹽水的點滴袋，將之提高使壓力達到 130mmHg，壓力造成視網膜完全缺血可觀察到眼底變白，此缺血狀態持續 45 分鐘，之後再取出針頭即可觀察到因缺血變白的眼底快速充血，開始形成再灌流的傷害，在前導實驗 (pilot study) 中拔出針頭後，確認眼壓皆回到術前正常值 (data not shown)。眼底視網膜缺血可由眼科檢查筆燈或裂隙燈，觀察眼底變白來確認達到完全的缺血狀態，麻醉全程皆使用保溫電毯與熱水袋維持體溫在攝氏 38 度。

### 第四節 藥物的劑量與投予

將每瓶 Mirosin injection®以生理食鹽水泡製成為 2 ml 的溶液，使之濃度為 50 mg/ml。Minocycline 治療實驗組分成 45 mg/kg/day 以及 90 mg/kg/day 兩組，每日分成兩次 (bid) 給予。大鼠在接受高眼壓缺血處理前兩天開始投藥，之後連續每日給予，直到缺血處理後第七天犧牲為止。投藥方式採腹腔注射，投藥時會給予 Isoflurane 麻醉氣體非常短暫的鎮

靜，減少實驗動物不必要的緊迫。

Methylprednisolone 治療實驗組則是在高眼壓缺血處理前 10 分鐘與再灌流一開始，分別給予兩次的靜脈注射 methylprednisolone 30 mg/kg。每隻大鼠在給予靜脈藥物前，均於尾靜脈接上 24 號之靜脈留置針，方便給予藥物。

## 第五節 視網膜電波圖的紀錄與分析

在誘導高眼壓性缺血之後第三天及第七天，將大鼠全程全身麻醉進行視網膜電波圖 (BPM-100 Control Program System, ERG/VEP v5.50, RetinoGraphics Inc, USA) 的檢查及記錄。所有做視網膜電波圖檢查的大鼠在前一天即移入暗室，檢查前至少有 12 小時的黑暗適應期 (dark adaptation)。

檢查前給予局部眼藥麻睫散瞳® (Mydriacyl®, tropicamide 0.5%, Alcon) 散瞳，與愛爾卡因® (Alcaine®, proparacaine HCl 0.5%, Alcon) 局部麻醉，體溫以保溫電毯維持。記錄電極以隱形眼鏡形式 (contact lens electrode, ERG-jet®, Universo Plastique, Inc, Le Crêt-du-Loche, Switzerland) 覆蓋在該檢查眼之角膜上，與角膜中間空隙以傳導膠填充。參考電極以皮下細針形式 (platinum subdermal needle electrode F-E2, Grass-Telefactor Division, Astro-Med, Inc, West Warwick, RI, USA) 穿入該檢查眼之外眼角與耳朵間的皮下空間；而接地電極使用接電電夾 (ground electrode, Grass-Telefactor Division, Astro-Med, Inc, West Warwick, RI, USA)，夾住該檢查側的耳翼部。

測量使用閃光式視網膜電波圖 (Flash electroretinogram) 模式檢測，先從高眼壓缺血性病變之眼測起，儀器設定光源強度 (intensity) 從 -20dB 開始測量 (亮度單位：10dB 相當於 1 log-unit，也等於 1 log cd-s/m<sup>2</sup>)，接

著分別使用-15dB、-10dB、-5dB、0dB 與+5dB 共六種光源強度做記錄，每次結果均取 4 次光照平均，每兩次光照之間隔為 10 秒。

記錄視網膜電波圖結果的數據之後，使用該軟體設定平滑程度 (smooth) 3 來分析。a 波幅度數值是從光刺激前的電位測量到第一個明顯最大的波谷，而 b 波幅度是由第一個波谷測量到下一個最大的波峰頂端。而下降程度 (reduction) 的百分比數值，為同隻大鼠高眼壓缺血病變眼的結果除以另隻正常未處理眼的視網膜電波圖結果。

## 第六節 組織病理學切片評估

在高血壓缺血性病變後第七天，利用過量的 Thiopental (Citosol®) 麻醉藥打入腹腔中進行安樂死，待大鼠犧牲後將其兩隻眼睛做經結膜式的全眼球摘除手術 (transconjunctival enucleation)。取下的眼球組織放入 phosphate-buffered saline (PBS) 的 4% paraformaldehyde 溶液中固定 20 分鐘，之後取出眼球劃破角膜再浸 10% 福馬林溶液中固定兩天，再從視神經處將眼球切成兩個半球，送至製作病理切片以 hematoxylin and eosin (H&E) 方法染色。

從切片中利用光學顯微鏡的比例尺，來計算視網膜各層的厚度。厚度統計方面，視網膜各層包括外核層 (outer nuclear layer, ONL)、內核層 (inner nuclear layer, INL)、內叢狀層 (inner plexiform layer, IPL) 及外限制膜至內限制膜 (outer limiting membrane – inner limiting layer, OLM-ILM) 之厚度。測量點選擇從視網膜切片中的視神經頭前後 250 $\mu$ m 處開始，每 500 $\mu$ m 間隔向前後延伸再各取兩處測量，每個眼球共取六處視網膜區塊的平均數據作為標準，每測量點選擇區塊寬度為 100 $\mu$ m。每次測量皆由同一人員進行。

## 第七節 統計與分析方法

視網膜電波圖使用許多光源強度 (intensity) 測量，從-20dB、-15dB、-10dB、-5dB、0dB 與+5dB 共六種光源強度，並記錄所有的 a 與 b 波幅度。視網膜功能下降的趨勢則使用波幅下降的百分比表示，方法為同隻大鼠高眼壓處理眼(本實驗皆採左眼)的波幅除以另一側正常未處理眼(右眼)的波幅作比較。在不同治療組別中，分析波幅下降的結果及不同光源強度對病變結果是否有差異，並針對各組資料與對照組之間用 student *t*-test 交叉比較，分析彼此間統計上顯著差異。

組織病理方面分析視網膜每層的厚度，與計算內叢狀層與外核層的比值(IPL/ONL ratio)。此外，在評估病變方面，也使用下降百分比的方法，作為探討治療的效果，各組間使用 student *t*-test 分析來探討統計上的差異。



### 第三章 實驗結果

#### 第一節 視網膜電波圖電生理分析結果

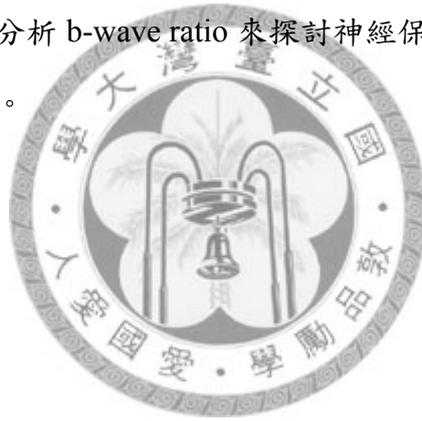
##### 一、建立高眼內壓導致視網膜缺血再灌流模式

本實驗利用高眼內壓(HIOP)導致視網膜缺血再灌流的實驗模式，發現隨缺血處理時間不同或壓力不同，造成的傷害程度也會跟著改變，因視網膜缺血 45 分鐘是造成可觀察性的神經病變型態的最短時間，本實驗採取缺血 45 分鐘，再一次重新建立實驗模式。首先，對未做處理的動物在缺血處理前一天先進行視網膜電波圖檢查，光源採-20dB、-15dB、-10dB、-5dB、0dB 與+5dB 共六種強度，只選擇 ERG b-wave ratio (同隻大鼠高眼壓處理眼的波幅除以另一側正常未處理眼)介於 90%-110%的動物進行實驗，於再灌流後第三及第七天視網膜電波圖的變化。其結果由視網膜電波圖儀器記錄如圖 3-1-1，分別代表正常對照組 (control)、無治療 IR 組 (IR-control) 以及兩種劑量的 minocycline (mino-45、mino-90) 與 methylprednisolone (MP) 治療之後改變的波幅型態，可看出視網膜缺血性病變所造成的波幅下降，而 mino-45、mino-90 及 MP 治療組都有明顯的使波幅上升，但其波幅型態與正常相比仍有下降的趨勢。

由於視網膜電波圖是一十分敏感的檢測工具，且不同大鼠在檢測的絕對值上或多或少一定具備些許不同個體之差異性，因此利用圖 3-1-2 及 3-1-3 代表缺血再灌流模式下視網膜電波圖 a-wave ratio 及 b-wave ratio 的變化。經測量後發現未經處理的眼睛，無論第三天或第七天其視網膜電波圖都沒有明顯的變化；然而給予 45 分鐘的缺血，整體的視網膜電波圖第三天的 a-wave ratio 和 b-wave ratio 分別降至  $88.9 \pm 4\%$  以及  $25.5 \pm 3\%$  (平均值 $\pm$ 標準差；n=5)；而第七天的結果為  $88.0 \pm 5\%$  以及  $27.9 \pm 2\%$ 。由此可證明，視網膜缺血再灌流的動物模式中，視網膜電波圖的結果短時間

內不會自行回復，且 IR 對照組與正常對找組間有明顯差異，並具有統計上的意義。

另外，本實驗並利用不同的光照強度，刺激誘導出不同的幅度比較。圖 3-1-4 及 3-1-5 顯示未治療 IR-control 組再灌流後第三及第七天 a-ratio 的變化，於第三天的-15dB、-5dB 及 0dB 的光源強度中，其 a-ratio 和對照組比較，測得有顯著差異( $P<0.05$ )，而第七天則為測得-5dB、0dB、+5dB 三組有顯著差異。圖 3-1-6 及 3-1-7 則顯示 IR-control 組第三天和第七天視網膜電波圖上 b-ratio 的變化，無論在第三或第七天比較缺血組與對照組，以每種光源強度測得 b-wave ratio 均有強烈的顯著差異 ( $P<0.001$ )。因此本實驗將採取主要分析 b-wave ratio 來探討神經保護藥物對於視網膜缺血再灌流模式的影響。



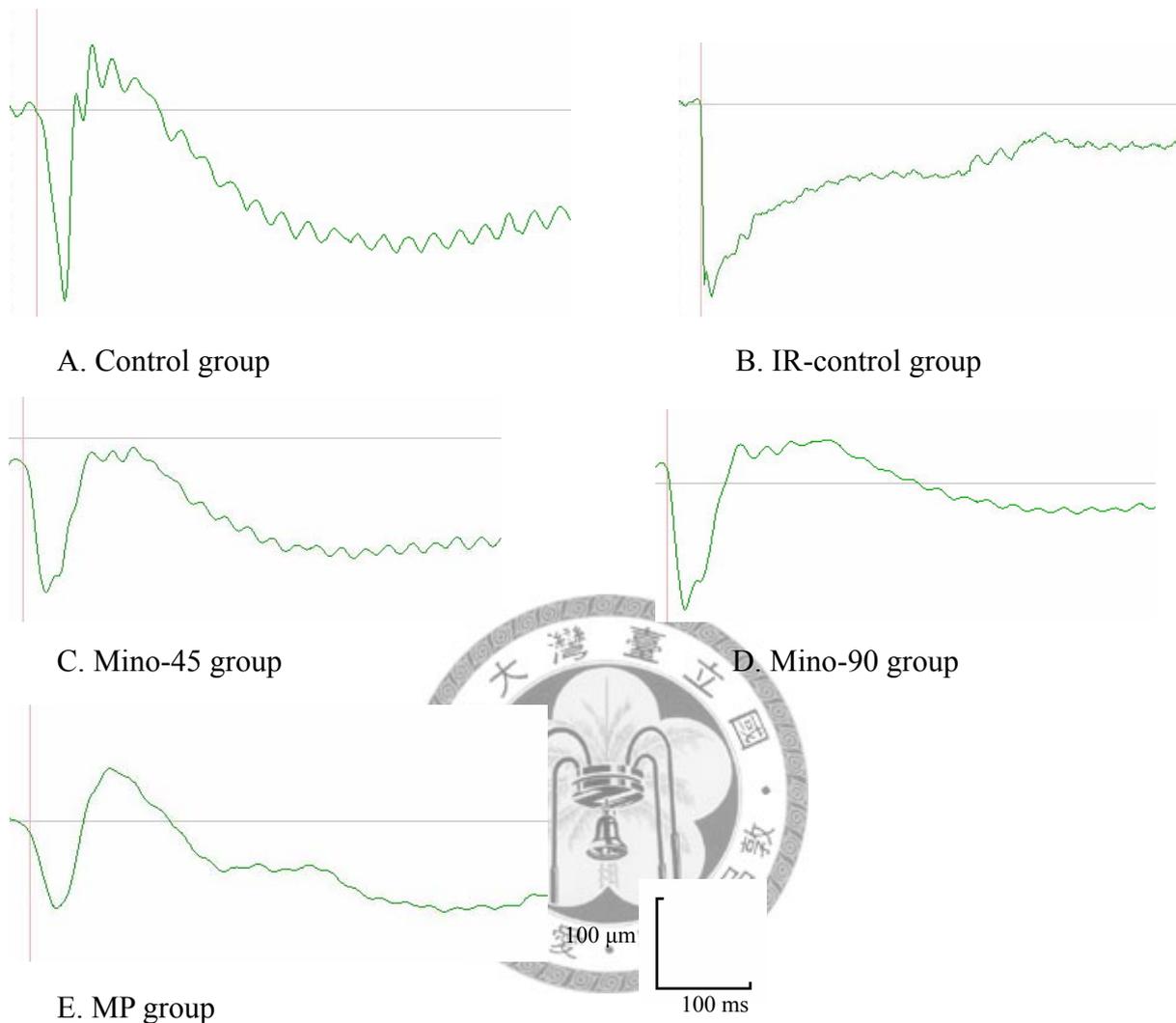


圖 3-1-1 各組視網膜缺血再灌流模式視網膜電波圖型態

所有測試皆為暗視野適應 12 小時，閃光式視網膜電波圖的結果。缺血病變模式為視網膜由高壓方式造成眼底完全缺血 45 分鐘。儀器為 BMP-100，光源強度設定為 0 dB，平均 4 次的波型記錄，閃光間隔 10 秒，平滑程度 3。

A：正常無缺血對照組、B：視網膜缺血再灌流無治療對照組、C：每天每公斤 45mg minocycline 治療組、D：每天每公斤 90mg minocycline 治療組、E：methylprednisolone 治療組。

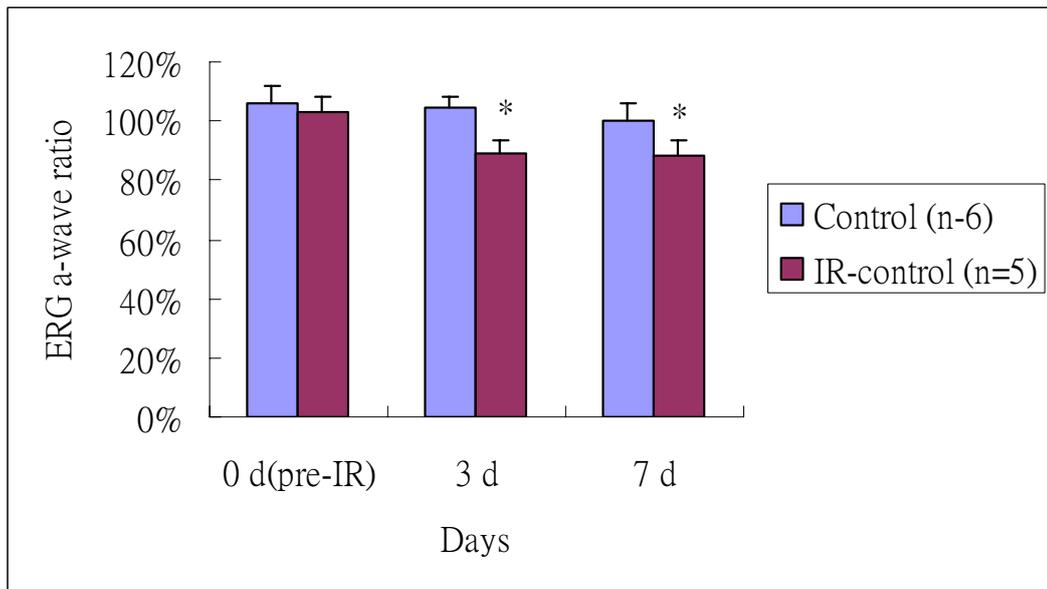


圖 3-1-2 觀察動物在缺血處理前(pre-ischemia)以及給予 45 分鐘缺血後再灌流 3,7 天時視網膜電波圖 a 波的改變；各組結果乃為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 IRcontrol group 與 control group 比較其  $p < 0.05$ 。

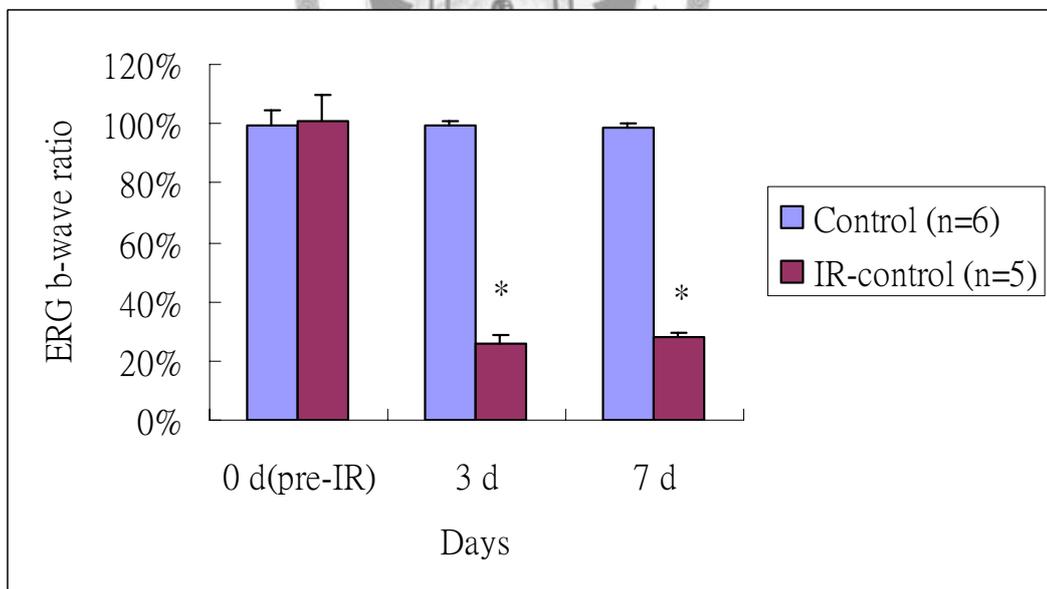


圖 3-1-3 觀察動物在缺血處理前(pre-ischemia)以及給予 45 分鐘缺血後再灌流 3,7 天時視網膜電波圖 b 波的改變；各組結果乃為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 IR-control group 與 control group 比較其  $p < 0.01$ 。

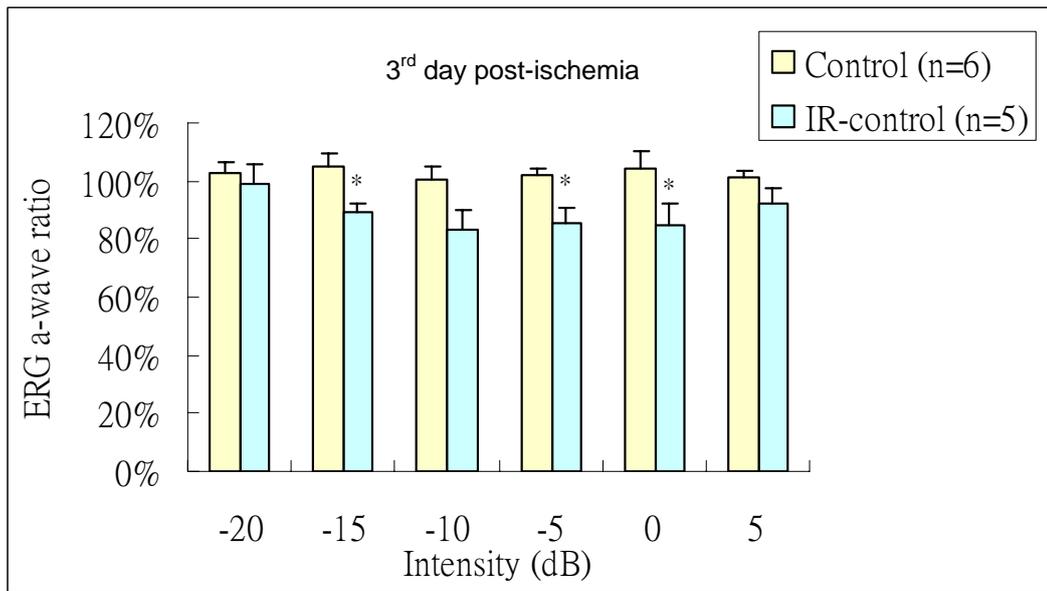


圖 3-1-4 觀察動物在高眼壓缺血處理 45 分鐘後再灌流第三天，使用不同光照強度誘導出視網膜電波圖 a 波的改變；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 IR-control group 與 control group 比較其  $p < 0.05$ 。

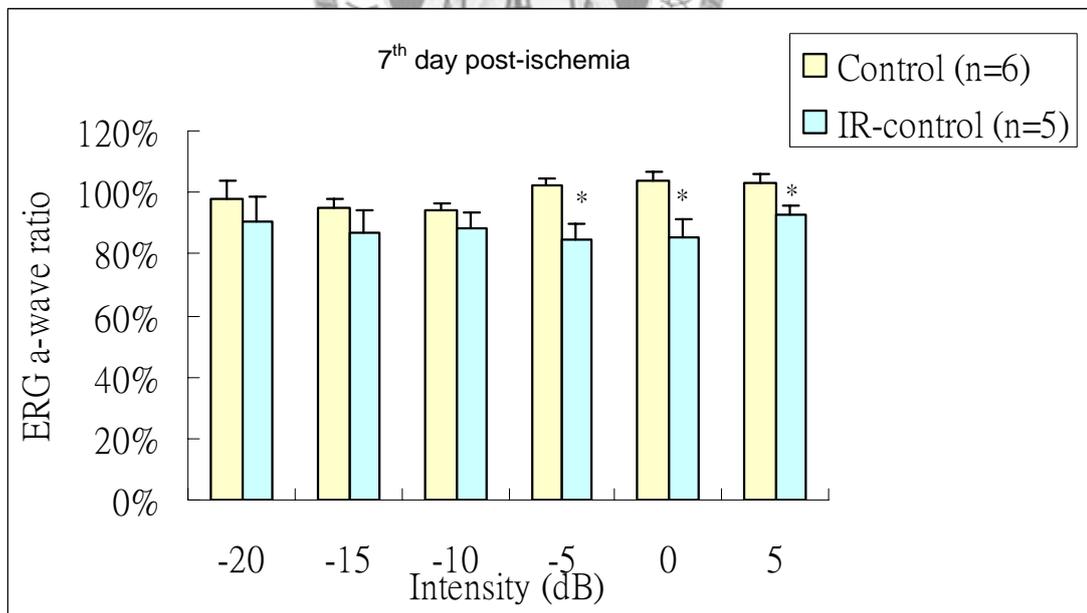


圖 3-1-5 觀察動物在高眼壓缺血處理 45 分鐘後再灌流第七天，使用不同光照強度誘導出視網膜電波圖 a 波的改變；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 IR-control group 與 control group 比較其  $p < 0.05$ 。

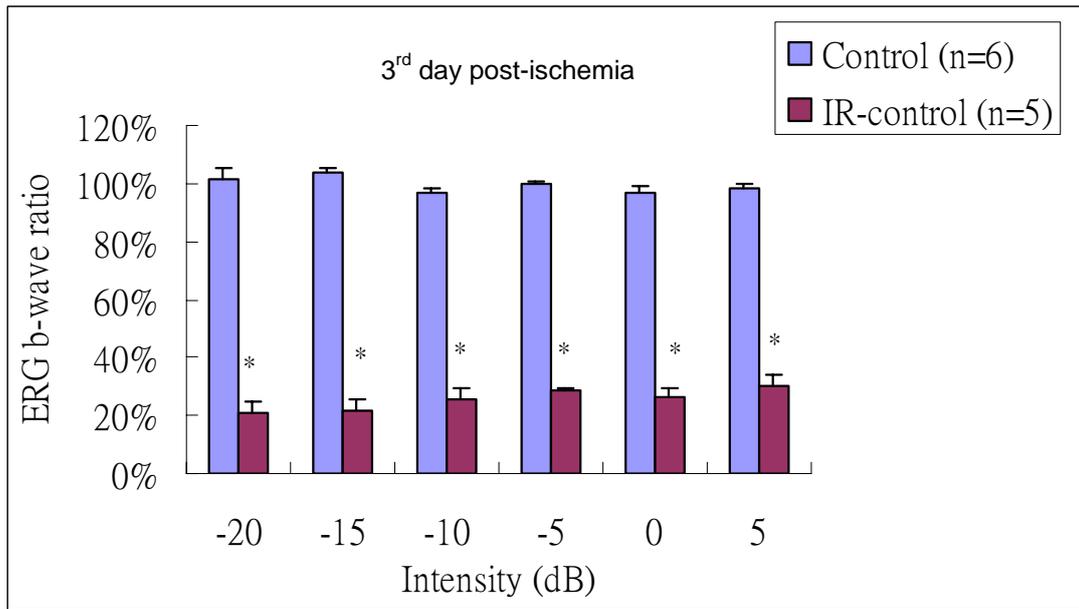


圖 3-1-6 觀察動物在高眼壓缺血處理 45 分鐘後再灌流第三天，使用不同光照強度誘導出視網膜電波圖 b 波的改變；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 IR-control group 與 control group 比較其  $p < 0.01$ 。

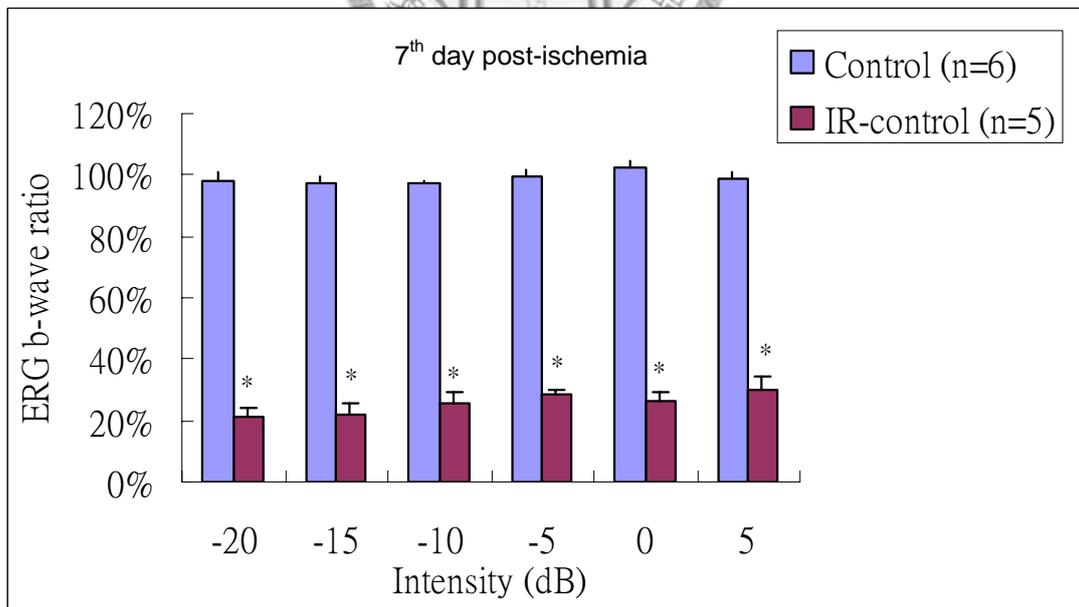


圖 3-1-7 觀察動物在高眼壓缺血處理 45 分鐘後再灌流第三天，使用不同光照強度誘導出視網膜電波圖 b 波的改變；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 IR-control group 與 control group 比較其  $p < 0.01$ 。

## 二、視網膜電波圖 b-wave ratio 下降幅度分析比較

在建立了實驗動物模式的條件並確定穩定性之後，可以進一步去探討 minocycline 對於缺血再灌流模式的影響，並進一步與類固醇類的藥物 methylprednisolone 比較其對於視網膜神經保護的效果。本實驗一樣對於未投藥及缺血處理的動物先進行視網膜電波圖檢查，只選擇 b-wave ratio 介於 90-110% 的動物進行實驗。利用不同的光照強度，刺激誘導出不同的幅度比較，於缺血後第三和第七天觀察其視網膜電波圖 b 波的變化。

### A. Minocycline 45mg/kg/day (Mino-45) 治療組：

表 3-2-1 及表 3-2-2 分別為給予每天每公斤 45 mg minocycline 治療的實驗組，缺血再灌流後第三天和第七天以不同光照強度測得視網膜電波圖 b 波的結果。測得的結果缺血再灌流後第三天 b-ratio 下降剩 48% - 64% 之間，平均為  $54.5 \pm 3\%$  (平均值 $\pm$ 標準差; n=6); 第七天的結果則為 51% - 66% 之間，平均為  $59.6 \pm 2\%$ 。以 Student's *t*-test 分析比較指出各種不同光源強度，在給予 minocycline 45 mg/kg/day 與只做缺血處理沒有治療的 IR-control 組，無論第三天或第七的 b-ratio 皆有顯著差異。(P<0.01) (圖 3-2-1 及圖 3-2-2)。

### B. Minocycline 90mg/kg/day (Mino-90) 治療組：

表 3-2-3 及表 3-2-4 分別為給予每天每公斤 90 mg minocycline 治療的實驗組，缺血再灌流後第三天和第七天以不同光照強度測得視網膜電波圖 b 波的結果。測得的結果缺血再灌流後第三天 b-ratio 下降剩 42% - 78% 之間，平均為  $64.1\% \pm 6\%$  (平均值 $\pm$ 標準差; n=6); 第七天的結果則為 45% - 78% 之間，平均為  $63.7 \pm 5\%$ 。以 Student's *t*-test 分析比較指出各種不同光源強度，在給予 minocycline 45 mg/kg/day 與只做缺血處理沒有治療的

IR-control 組，無論第三天或第七的 b-ratio 皆有顯著差異。(第三天光照強度-5 dB,  $P<0.05$ ，其餘的皆  $P<0.01$ ) (圖 3-2-3 及圖 3-2-4)。

C. Methylprednisolone (MP) 治療組：

表 3-2-3 及表 3-2-4 分別為缺血處理前 10 分鐘與再灌流一開始，分別給予兩次的靜脈注射 methylprednisolone 30 mg/kg，缺血再灌流後第三天和第七天以不同光照強度測得視網膜電波圖 b 波的結果。測得的結果缺血再灌流後第三天 b-ratio 下降剩 41% - 95%之間，平均為  $64.1\% \pm 10\%$  (平均值 $\pm$ 標準差；n=5)；第七天的結果則為 43% - 91%之間，平均為  $62.9 \pm 9\%$ 。以 Student's *t*-test 分析比較指出各種不同光源強度，在給予 minocycline 45 mg/kg/day 與只做缺血處理沒有治療的 IR-control 組，無論第三天或第七的 b-ratio 皆有顯著差異。(第三天和第七天光照強度-15 dB,  $P<0.05$ ，其餘的皆  $P<0.01$ ) (圖 3-2-5 及圖 3-2-6)。



**表 3-2-1. 使用不同光照強度記錄 ERG b-wave ratio 百分比 (Mino-45 組)**

Rat No.	Mino-45-	Mino-45-	Mino-45-	Mino-45-	Mino-45-	Mino-45-	Mean±SD
Intensities (dB)	1	2	3	4	5	6	
-20	61.1%	41.5%	48.9%	74.1%	44.2%	39.2%	51.5 ± 6%
-15	61.8%	70.8%	43.2%	63.8%	44.2%	45.9%	54.9 ± 5%
-10	67.7%	54.2%	50.6%	61.0%	37.4%	48.4%	53.2 ± 4%
-5	66.8%	54.6%	50.2%	58.8%	51.2%	59.8%	56.9 ± 3%
0	64.7%	56.4%	48.0%	61.8%	43.4%	56.5%	55.2 ± 3%
+5	64.4%	63.0%	48.7%	58.9%	40.2%	58.3%	55.6 ± 4%
Mean	64.4%	56.7%	48.3%	63.1%	43.4%	51.3%	54.5 ± 3%

測量方法為與同隻實驗動物另一正常眼數據作比較 (n=6)。在高眼壓模式持續 45 分鐘，三天後的結果。Mino-45：minocycline 45mg/kg/day, IP

**表 3-2-2. 使用不同光照強度記錄 ERG b-wave ratio 百分比 (Mino-45 組)**

Rat No.	Mino-45	Mino-45	Mino-45	Mino-45	Mino-45	Mino-45-	Mean±SD
Intensities (dB)	-1	-2	-3	-4	-5	6	
-20	65.3%	63.7%	42.1%	84.4%	52.4%	57.4%	60.9 ± 6%
-15	73.6%	59.2%	49.6%	71.6%	47.9%	53.7%	59.3 ± 5%
-10	57.0%	57.0%	41.4%	61.2%	55.3%	65.9%	56.3 ± 3%
-5	67.5%	62.1%	47.4%	49.2%	57.3%	63.6%	57.9 ± 3%
0	67.7%	59.5%	62.6%	57.1%	62.0%	67.2%	62.7 ± 2%
+5	69.0%	58.0%	62.6%	54.4%	54.1%	65.1%	60.5 ± 3%
Mean	66.7%	59.9%	51.0%	63.0%	54.8%	62.2%	59.6 ± 2%

測量方法為與同隻實驗動物另一正常眼數據作比較 (n=6)。在高眼壓模式持續 45 分鐘，七天後的結果。Mino-45：minocycline 45mg/kg/day, IP

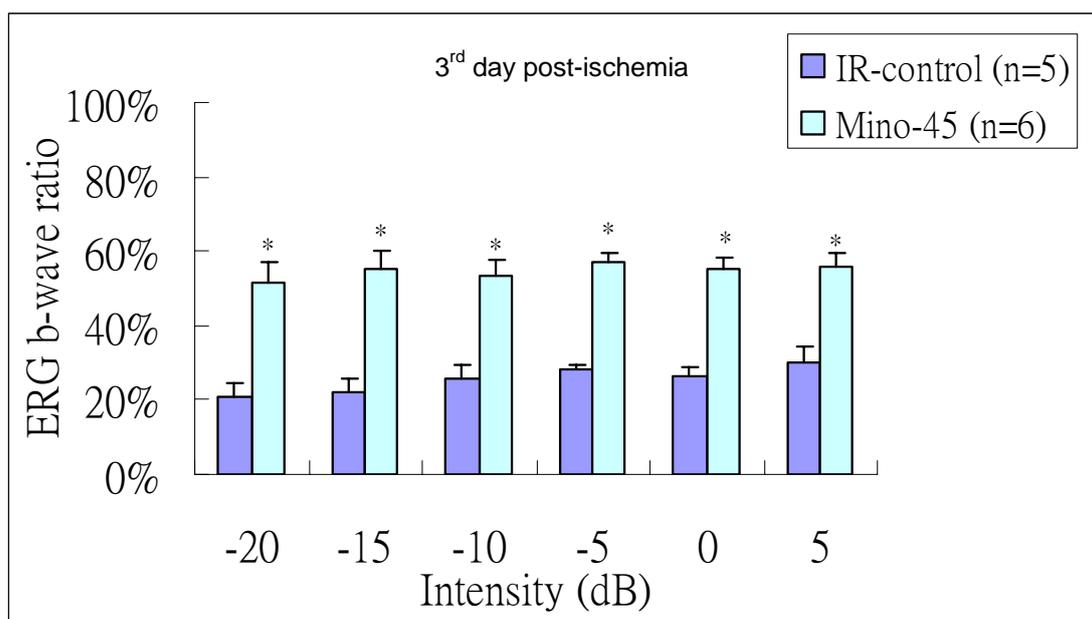


圖 3-2-1 以 minocycline 45mg/kg/day 治療(Mino-45)，使用不同光照強度記錄再灌流後第三天視網膜電波圖 b 波的變化；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 Mino-45 group 與 IR-control group 比較其  $p < 0.01$ 。

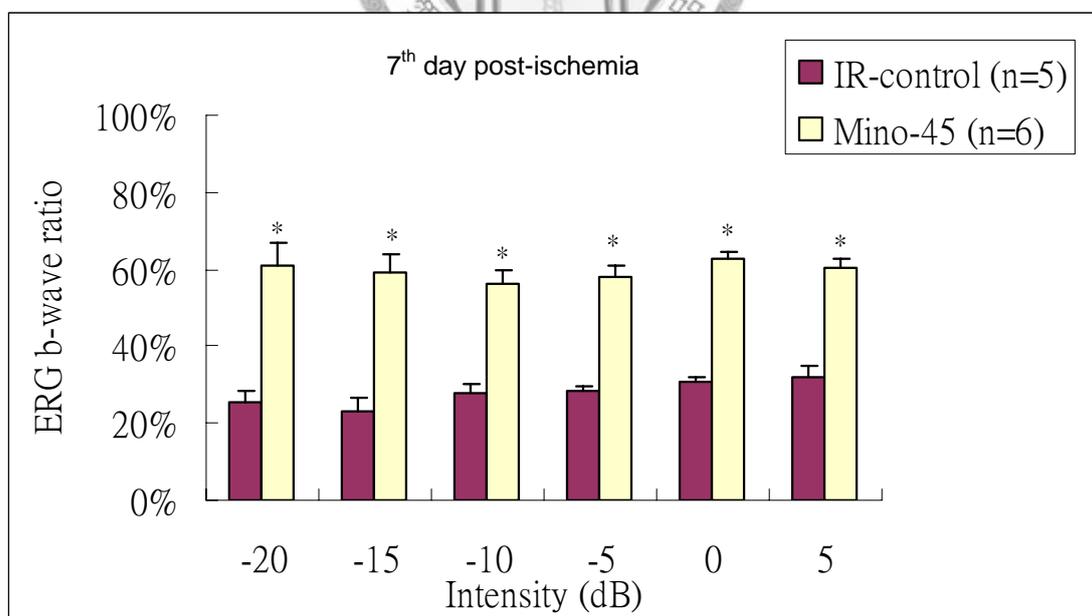


圖 3-2-2 以 minocycline 45mg/kg/day 治療(Mino-45)，使用不同光照強度記錄再灌流後第七天視網膜電波圖 b 波的變化；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 Mino-45 group 與 IR-control group 比較其  $p < 0.01$ 。

**表 3-2-3. 使用不同光照強度記錄 ERG b-wave ratio 百分比 (Mino-90 組)**

Rat No.	Mino-90	Mino-90	Mino-90	Mino-90	Mino-90	Mino-90-	Mean±SD
Intensities (dB)	-1	-2	-3	-4	-5	6	
-20	54.7%	58.5%	82.0%	48.7%	72.0%	58.2%	62.3 ± 5%
-15	54.3%	42.6%	75.3%	29.5%	84.5%	59.4%	57.6 ± 8%
-10	56.0%	41.8%	72.0%	79.4%	82.0%	79.5%	68.5 ± 7%
-5	52.9%	32.5%	84.5%	37.5%	77.2%	59.4%	57.3 ± 9%
0	60.7%	41.3%	83.3%	85.3%	81.6%	58.9%	68.5 ± 7%
+5	74.0%	34.3%	71.2%	107.1%	74.9%	61.2%	70.4 ± 10%
Mean	58.8%	41.8%	78.1%	64.6%	78.7%	62.8%	64.1±5.58%

測量方法為與同隻實驗動物另一正常眼數據作比較 (n=6)。在高眼壓模式持續 45 分鐘無給予藥物，三天後的結果。Mino-90：minocycline 90mg/kg/day, IP

**表 3-2-4. 使用不同光照強度記錄 ERG b-wave ratio 百分比 (Mino-90 組)**

Rat No.	Mino-90	Mino-90	Mino-90	Mino-90	Mino-90	Mino-90-	Mean±SD
Intensities (dB)	-1	-2	-3	-4	-5	6	
-20	71.0%	41.1%	84.1%	54.4%	77.2%	64.5%	65.4 ± 6%
-15	53.9%	35.4%	75.3%	57.6%	62.3%	67.5%	58.7 ± 6%
-10	56.5%	38.3%	72.9%	67.0%	64.8%	57.0%	59.4 ± 5%
-5	58.2%	57.1%	84.5%	56.2%	67.3%	58.8%	63.7 ± 5%
0	63.3%	58.4%	83.3%	56.9%	78.4%	69.3%	68.3 ± 4%
+5	68.1%	61.2%	71.2%	52.5%	87.7%	79.3%	70.0 ± 5%
Mean	61.8%	45.0%	78.6%	57.4%	73.0%	66.1%	63.7 ± 5%

測量方法為與同隻實驗動物另一正常眼數據作比較 (n=6)。在高眼壓模式持續 45 分鐘無給予藥物，七天後的結果。Mino-45：minocycline 45mg/kg/day, IP

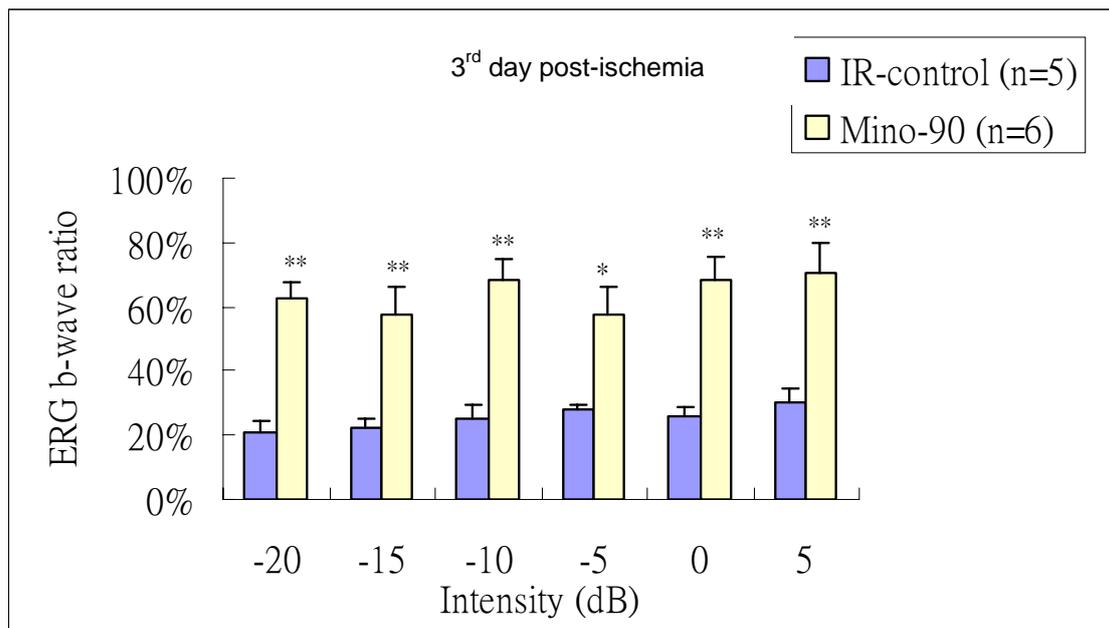


圖 3-2-3 以 minocycline 90mg/kg/day 治療(Mino-90)，使用不同光照強度記錄再灌流後第三天視網膜電波圖 b 波的變化；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 Mino-90 group 與 IR-control group 比較  $p < 0.05$ ；\*\*代表  $p < 0.01$ 。

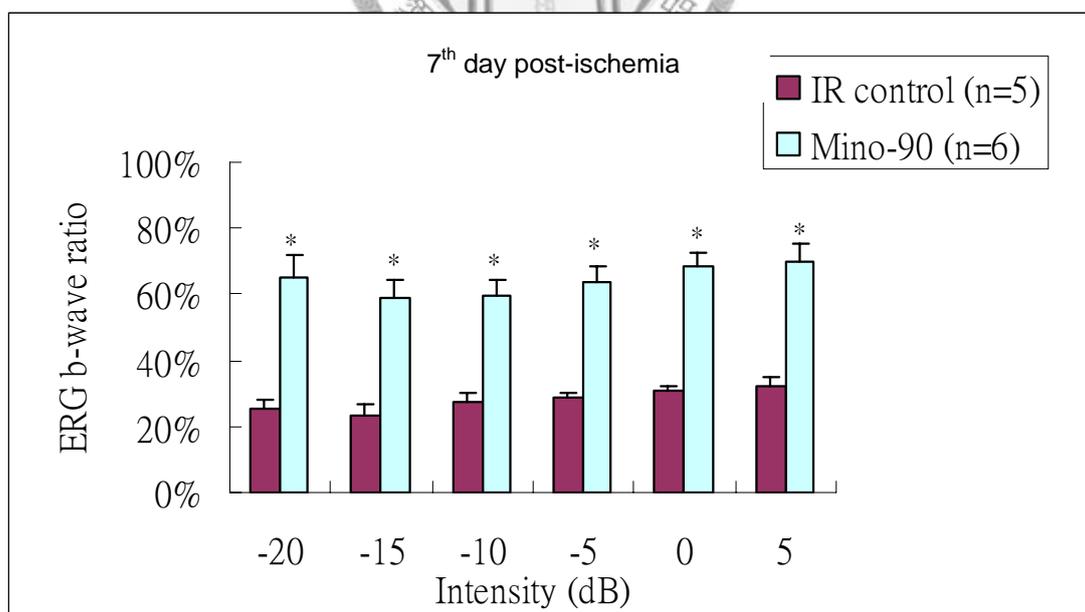


圖 3-2-4 以 minocycline 90mg/kg/day 治療(Mino-90)，使用不同光照強度記錄再灌流後第七天視網膜電波圖 b 波的變化；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。\*代表 Mino-90 group 與 IR-control group 比較其  $p < 0.01$ 。

**表 3-2-5. 使用不同光照強度記錄 ERG b-wave ratio 百分比 (MP 組)**

Rat No. Intensities (dB)	MP-1	MP-2	MP-3	MP-4	MP-5	Mean±SD
-20	66.5%	99.7%	35.7%	52.3%	58.8%	62.6 ± 10%
-15	59.5%	91.2%	34.1%	35.3%	61.3%	56.3 ± 10%
-10	64.1%	94.0%	36.8%	47.4%	71.3%	62.7 ± 10%
-5	83.3%	98.5%	48.4%	42.5%	65.7%	67.7 ± 11%
0	64.8%	93.6%	51.1%	49.8%	73.4%	66.5 ± 8%
+5	67.6%	92.3%	41.2%	50.5%	66.2%	63.6 ± 9%
Mean	67.6%	94.9%	41.2%	46.3%	66.1%	64.1 ± 10%

測量方法為與同隻實驗動物另一正常眼數據作比較 (n=5)。在高眼壓模式持續 45 分鐘無給予藥物，三天後的結果。MP: methylprednisolone, IV



**表 3-2-6. 使用不同光照強度記錄 ERG b-wave ratio 百分比 (MP 組)**

Rat No. Intensities (dB)	MP-1	MP-2	MP-3	MP-4	MP-5	Mean±SD
-20	62.3%	88.2%	45.8%	42.3%	62.5%	60.2 ± 8%
-15	53.3%	92.3%	35.4%	31.9%	71.4%	56.9 ± 11%
-10	53.6%	96.4%	38.6%	56.9%	60.9%	61.3 ± 10%
-5	57.2%	89.7%	44.7%	51.8%	65.3%	61.7 ± 8%
0	57.6%	89.9%	48.1%	41.2%	75.8%	62.5 ± 9%
+5	59.5%	88.2%	51.8%	47.9%	70.8%	63.6 ± 7%
Mean	67.8%	91.3%	42.5%	45.3%	67.8%	62.9 ± 9%

測量方法為與同隻實驗動物另一正常眼數據作比較 (n=5)。在高眼壓模式持續 45 分鐘無給予藥物，七天後的結果。MP: methylprednisolone, IV

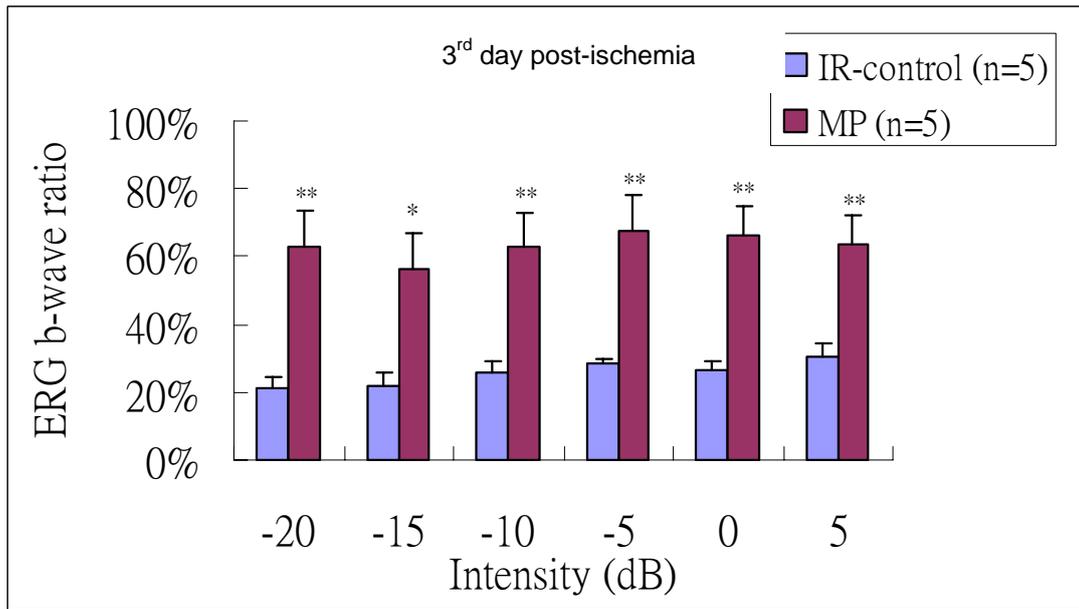


圖 3-2-5 以 methylprednisolone 治療 (MP)，使用不同光照強度記錄再灌流後第三天視網膜電波圖 b 波的變化；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。

\*代表 MP group 與 IR-control group 比較  $p < 0.05$ ；\*\*代表  $p < 0.01$ 。

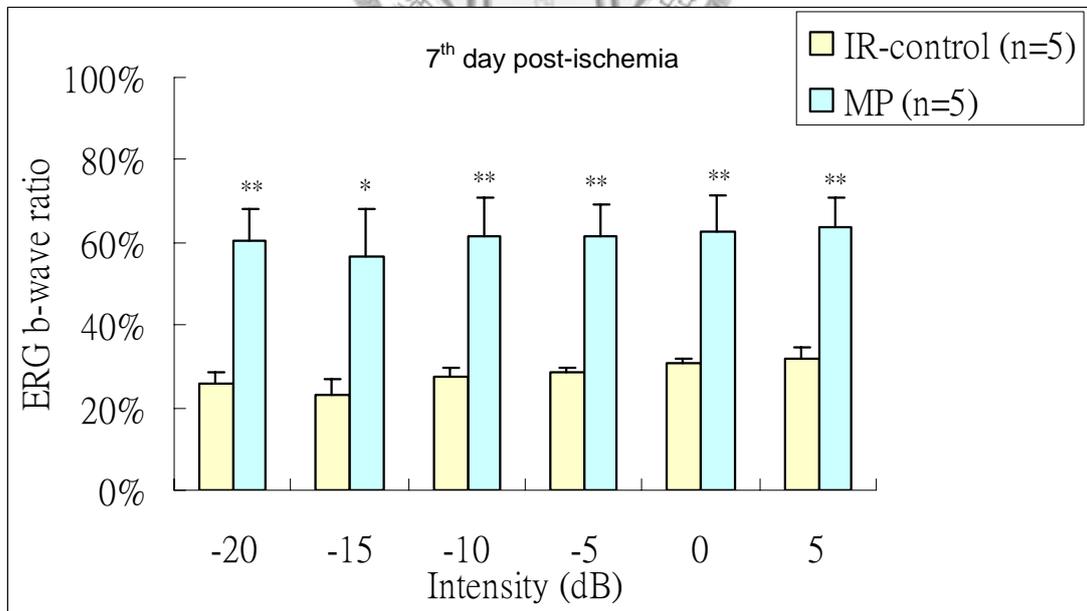


圖 3-2-6 以 methylprednisolone 治療 (MP)，使用不同光照強度記錄再灌流後第七天視網膜電波圖 b 波的變化；各組結果為平均值 ± 標準差，動物數目如圖示。

\*代表 MP group 與 IR-control group 比較  $p < 0.05$ ；\*\*代表  $p < 0.01$ 。

### 三、視網膜電波圖 a 波和 b 波綜合比較

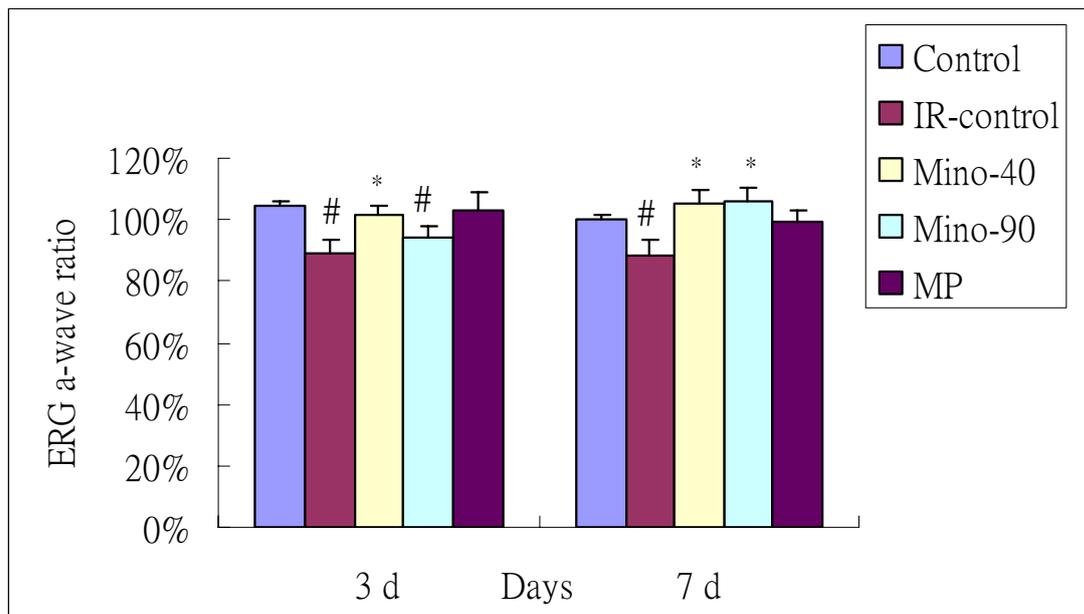
圖 3-3-1 與圖 3-3-2 為綜合比較不同藥物治療效果，利用視網膜電波圖 a-ratio 與 b-ratio 剩餘百分比來分析比較之間的保護效果。

#### A. A 波綜合比較圖：

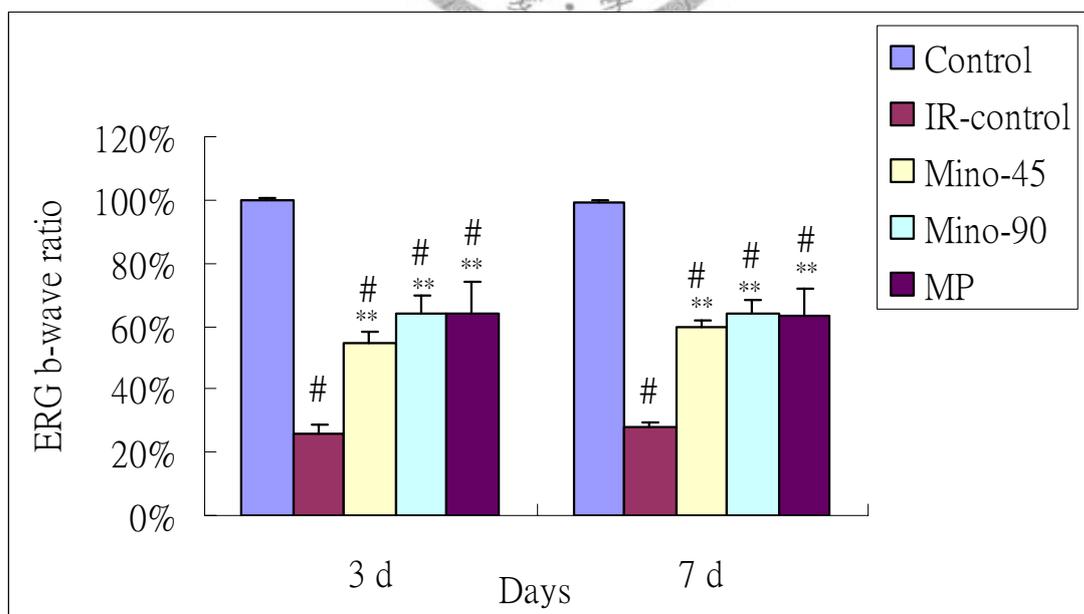
圖 3-3-1 表示 a 波在無治療組 (IR-control)、minocycline (Mino-45、Mino-90) 治療組以及 methylprednisolone(MP) 治療組，缺血再灌流後第三及第七天的變化。整體來說，IR-control 組的 a 波大約保留了  $88.0\% \pm 5\%$  (平均值 $\pm$ 標準差；n=5)；Mino-90 組約  $94.3\% \pm 4\%$  (n=6)；MP 組約  $99.4\% \pm 6\%$  (n=5)；而 Mino-45 反而有輕微升高約  $105.3\% \pm 4\%$  (n=6)。第三和第七天的 Mino-45 組及第七天的 Mino-90 組和 IR-control 組有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。三個治療組間無論第三或第七天都沒有顯著差異。

#### B. B 波綜合比較圖

圖 3-3-2 表示 b 波在無治療組 (IR-control)、minocycline (Mino-45、Mino-90) 治療組以及 methylprednisolone(MP) 治療組，缺血再灌流後第三及第七天的變化。整體來說，IR-control 組的 b 波大約保留了  $25.6\% \pm 2\%$  (平均值 $\pm$ 標準差；n=5)；Mino-45 組約  $57.5\% \pm 2\%$  (n=6)；Mino-90 組約  $64.1\% \pm 6\%$  (n=6)；MP 組約  $62.9\% \pm 8\%$  (n=5)。所有的治療實驗組無論第三和第七天都和 IR-control 組有顯著差異 ( $P < 0.01$ )；且和對照組 (control) 均有差異 ( $P < 0.01$ )。三個治療組間無論第三或第七天都沒有顯著差異。



3-3-1 不同藥物治療效果在第三和第七天視網膜電波圖 a 波的改變。IR-control 為無治療之 ischemia-reperfusion 傷害，Mino-45 和 Mino-90 代表每天每公斤 45mg 和 90mg 的治療，MP 為 methylprednisolone 治療。#代表與 control 組有顯著差異 ( $P<0.05$ )，\*代表與 IR-control 組有顯著差異 ( $P<0.05$ )。



3-3-2 不同藥物治療效果在第三和第七天視網膜電波圖 b 波的改變。#代表與 control 組有顯著差異 ( $P<0.01$ )，\*\*代表與 IR-control 組有顯著差異 ( $P<0.01$ )。

## 第二節 組織病理型態分析報告

### 一、各層視網膜厚度病變比較

視網膜組織病理的變化，由型態計量方法的結果來分析，圖 3-4-1 代表正常視網膜的各層結構、缺血再灌流病變後的視網膜型態、以及兩個劑量的 minocycline 與 methylprednisolone 治療後視網膜改變的情形。可看出視網膜缺血性病變後七天內層的厚度明顯減少，而其他三組治療組在組織切片上似乎能提供明顯的保護效果，使內層厚度不致於大幅減少。

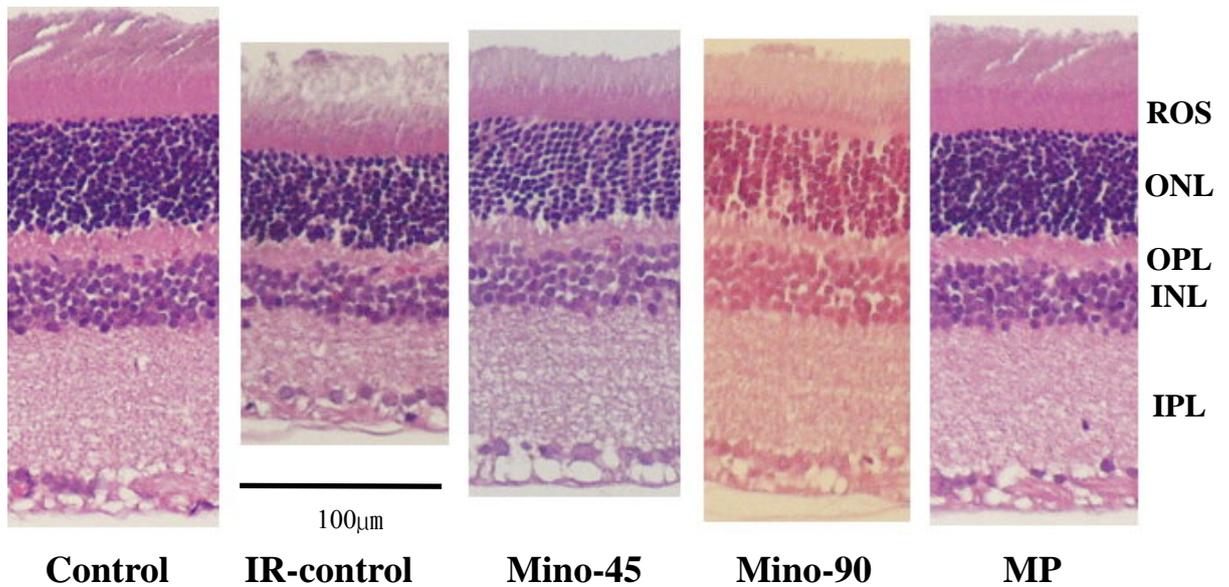


圖 3-4-1 大鼠視網膜組織病理型態檢查

Control 為正常大鼠視網膜各層構造；IR-control 為缺血再灌流七天後的病理切片，無任何的治療；Mino-45 與 Mino-90 為每天每公斤給予 minocycline 45mg 及 90mg 的治療組，缺血後七天的切片；MP 為 methylprednisolone 治療組，缺血後七天的切片結果。H&E 染色，100 倍，取樣寬長皆為 100 μm。視網膜感光細胞外層（ROS）、外核層（ONL）、外叢狀層（OPL）、內核層（INL）、內叢狀層（IPL）

表 3-4-1 中的統計顯示各層視網膜厚度的實驗結果，分別指出外核層 (ONL)、內核層 (INL)、內叢狀層 (IPL) 及外限制膜至內限制膜 (OLM-ILM) 以及內叢狀層與外核層的比值分析 (IPL/ONL ratio) 的平均數據。實驗組別包括：正常未處理的視網膜 (Control)、高眼壓缺血病變未治療 (IR-control)、每天每公斤 45mg 及 90mg 的 minocyclin 治療組 (Mino-45、Mino-90) 及 methylprednisolone 治療組 (MP)。在 IPL/ONL 比值的評估中，再分析各組的 IPL/ONL 值與 control 組的 IPL/ONL 值相除的百分比，可大致比較出病變程度在 IPL/ONL 比值分析中的差異。IR-control 組比較結果只剩下 43.54%、Mino-45 和 Mino90 治療組顯示存留程度皆為 93% 左右，而 MP 治療組保護而剩存的百分比可高達 95.71%。

表 3-4-1 表示各層視網膜厚度在各實驗組中統計平均結果(±S.D.)

Thickness (µm) Groups	OLM-ILM	ONL	INL	IPL	IPL/ONL	
					Ratio	/Normal
<b>Control</b>	182.63 ± 1.22	46.34 ± 0.91	29.77 ± 0.55	70.38 ± 0.64	1.518	100.00%
<b>IR-control</b>	111.43 ± 8.68	39.28 ± 0.89	20.36 ± 0.52	25.98 ± 2.50	0.661	43.54%
<b>Mino-45</b>	173.73 ± 1.66	46.28 ± 0.63	28.27 ± 0.97	65.59 ± 0.68	1.417	93.32%
<b>Mino-90</b>	170.16 ± 2.22	44.90 ± 0.97	27.60 ± 0.44	63.86 ± 2.00	1.422	93.64%
<b>MP</b>	174.01 ± 2.05	44.73 ± 1.18	28.77 ± 0.52	65.02 ± 0.63	1.453	95.71%

Control 指未處理過的正常視網膜(n=6)，IR-control 為缺血病變後七天未治療(n=5)，Mino-45 與 Mino-90 為每天每公斤給予 minocycline 45mg 及 90mg 治療缺血性病後七天後的結果(n=6)，MP 為 methylprednisolone 治療缺血病變七天後結果(n=6)。外核層 (ONL)、內核層 (INL)、內叢狀層 (IPL) 及外限制膜至內限制膜 (OLM-ILM)，/Control 指每組 IPL/ONL 與正常值(Control)的百分比。

表 3-4-2 至表 3-4-5 針對各層視網膜厚度做個別評估與顯示每次實驗的最初數據統計整理。表 3-4-2 的 OLM-ILM 的統計結果說明整體視網膜

厚度而言，Student's *t*-test 顯示所有的組別包括 IR-control 組與給藥的 Mino-45、Mino-90、MP 治療實驗組與 control 對照組都有顯著差異 (*P* 值分別為 6.10655E-06、0.0015、0.0006、0.0044)；而 Mino-45、Mino-90 治療組與 MP 治療組與沒給藥的 IR-control 組也有顯著差異 (*P* 值分別為 2.01745E-05、3.82672E-05、8.09542E-05)。三個治療組之間沒有差異性。

表 3-4-3 的視網膜內叢狀層 (IPL) 的統計結果說明在視網膜內叢狀層厚度可為傷害指標，因為經 *t*-test 分析出內層厚度的確對於缺血傷害性較敏感也較顯著，可見 IR-control 組 Control 組有很大的顯著差異性 (*P* 值 1.55368E-08)。三個治療組 Mino-45、Mino-90、MP 組與 control 對照組皆有顯著差異 (*P* 值 0.0004、0.0111、0.0002)，但他們與 IR-control 對照組間確有極大的顯著差異 (*P* 值分別為 4.43799E-08、7.65032E-07、3.50901E-07)。而三個治療組之間則沒有差異性。

表 3-4-4 的視網膜外核層 (ONL) 的統計結果來看，相較之下外層厚度傷害性較內層小，以 IR-control 組與 control 組來說，仍有顯著差異性 (*P* 值 0.000392)，但差異比內叢狀層少得多；而三個治療組 Mino-45、Mino-90、MP 與 control 對照組則無顯著差異，反而與 IR-control 組有顯著差異 (*P* 值分別為 0.0001、0.00230、0.0063)。三個治療組之間沒有顯著差異。

表 3-4-5 的視網膜內核層 (INL) 的統計結果說明視網膜內核層厚度狀況，內核層雖屬內層，以厚度改變比較來看，傷害性比內叢狀層 (IPL) 小很多，IR-control 組與 control 正常組比較，有顯著差異性 (*P* 值 6.26545E-07)；治療組中 Mino-90 與 control 也有差異 (*P* 值為 0.0112)，其餘兩組沒有差異性。但 Mino-45、Mino-90、MP 三個治療組都與 IR-control 組有顯著的差異 (*P* 值為 8.15608E-05、1.93749E-06、3.08577E-06)。三個治療組之間沒有顯著差異。

表 3-4-2 外限制膜層至內限制膜層 (OLM-ILM) 厚度各組統計分析比較

OLM-ILM (μm)	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	Mean ± SD
<b>Control</b>	187.50	182.10	184.80	180.71	179.46	181.25	182.63 ± 1.22
<b>IR-control</b>	106.25	106.25	131.25	127.68	85.72		111.43 ± 8.68
<b>Mino-45</b>	172.32	175.89	176.79	166.07	175.00	176.34	173.73 ± 1.66
<b>Mino-90</b>	162.95	164.29	175.89	172.32	170.54	175.01	170.16 ± 2.22
<b>MP</b>	174.11	176.79	167.41	172.32	179.46		174.01 ± 2.05

Control 指未處理過的正常視網膜(n=6)，IR-control 為缺血病變後七天未治療(n=5)，Mino-45 與 Mino-90 為每天每公斤給予 minocycline 45mg 及 90mg 治療缺血性病後七天後的結果 (n=6)，MP 為 methylprednisolone 治療缺血病變七天後結果(n=6)。外限制膜至內限制膜 (OLM-ILM)，No.1 至 No.6 代表不同大鼠的視網膜厚度(μm)數據結果。

表 3-4-3 內叢狀層 (IPL) 厚度各組統計分析比較

IPL (μm)	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	Mean ± SD
<b>Control</b>	72.30	71.43	70.98	70.54	68.30	68.75	70.38 ± 0.64
<b>IR-control</b>	29.46	21.43	28.57	31.70	18.75		25.98 ± 2.50
<b>Mino-45</b>	63.57	66.96	67.87	66.00	65.02	64.16	65.59 ± 0.68
<b>Mino-90</b>	62.30	63.39	68.75	70.54	57.78	60.45	63.86 ± 2.00
<b>MP</b>	66.96	64.82	65.70	64.39	63.26		65.02 ± 0.63

Control 指未處理過的正常視網膜(n=6)，IR-control 為缺血病變後七天未治療(n=5)，Mino-45 與 Mino-90 為每天每公斤給予 minocycline 45mg 及 90mg 治療缺血性病後七天後的結果(n=6)，MP 為 methylprednisolone 治療缺血病變七天後結果 (n=6)。IPL，內叢狀層，No.1 至 No.6 代表不同大鼠視網膜厚度(μm)的數據結果。

表 3-4-4 外核層 (ONL) 厚度各組統計分析比較

ONL ( $\mu\text{m}$ )	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	Mean $\pm$ SD
<b>Control</b>	43.93	49.32	48.21	46.42	43.75	46.43	46.34 $\pm$ 0.91
<b>IR-control</b>	38.39	41.96	40.18	36.61	39.30		39.28 $\pm$ 0.89
<b>Mino-45</b>	46.43	45.54	43.75	46.43	48.21	47.32	46.28 $\pm$ 0.63
<b>Mino-90</b>	41.96	43.75	44.2	43.98	48.21	47.32	44.90 $\pm$ 0.97
<b>MP</b>	47.32	44.21	47.32	41.07	43.75		44.73 $\pm$ 1.18

Control 指未處理過的正常視網膜(n=6)，IR-control 為缺血病變後七天未治療(n=5)，Mino-45 與 Mino-90 為每天每公斤給予 minocycline 45mg 及 90mg 治療缺血性病後七天後的結果 (n=6)，MP 為 methylprednisolone 治療缺血病變七天後結果(n=6)。ONL，外核層，No.1 至 No.6 代表不同大鼠視網膜厚度( $\mu\text{m}$ )的數據結果。

表 3-4-5 內核層 (INL) 厚度各組統計分析比較

INL ( $\mu\text{m}$ )	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	Mean $\pm$ SD
<b>Control</b>	29.5	29.5	31.25	31.25	27.68	29.46	29.77 $\pm$ 0.55
<b>IR-control</b>	18.76	20.54	21.43	21.43	19.64		20.36 $\pm$ 0.52
<b>Mino-45</b>	27.68	27.68	29.46	24.11	30.36	30.35	28.27 $\pm$ 0.97
<b>Mino-90</b>	26.79	26.34	29.46	27.68	27.67	27.68	27.60 $\pm$ 0.44
<b>MP</b>	29.46	27.68	27.67	30.36	28.68		28.77 $\pm$ 0.52

Control 指未處理過的正常視網膜(n=6)，IR-control 為缺血病變後七天未治療(n=5)，Mino-45 與 Mino-90 為每天每公斤給予 minocycline 45mg 及 90mg 治療缺血性病後七天後的結果 (n=6)，MP 為 methylprednisolone 治療缺血病變七天後結果(n=6)。INL，內核層，No.1 至 No.6 代表不同大鼠視網膜厚度( $\mu\text{m}$ )的數據結果。

整體來說，視網膜缺血再灌流後，在不同實驗組別中的影響與治療效果，可看出整體視網膜厚度以 OLM-ILM 而言，所有組別的傷害都與 Control 有顯著差異，但有治療的組別也和未治療的 IR-control 組有顯著差異；ONL 與 INL 兩層顯示對於缺血性傷害較小，除了 IR-control 其餘各實驗組的結果皆無差異性存在，而 IR-control 本身與 Control 對照組的差異也沒有 IPL 那麼大；而最敏感的 IPL 內層可表現出在 IR-control 組及各治療組與 Control 比較皆有顯著差異，表示在各藥物治療後，仍然受到傷害，使厚度下降的情況出現。但 Mino-45、Mino-90、MP 組與 IR 組也表現出顯著差異，表示三個治療組亦有防止視網膜內層厚度減少的保護作用

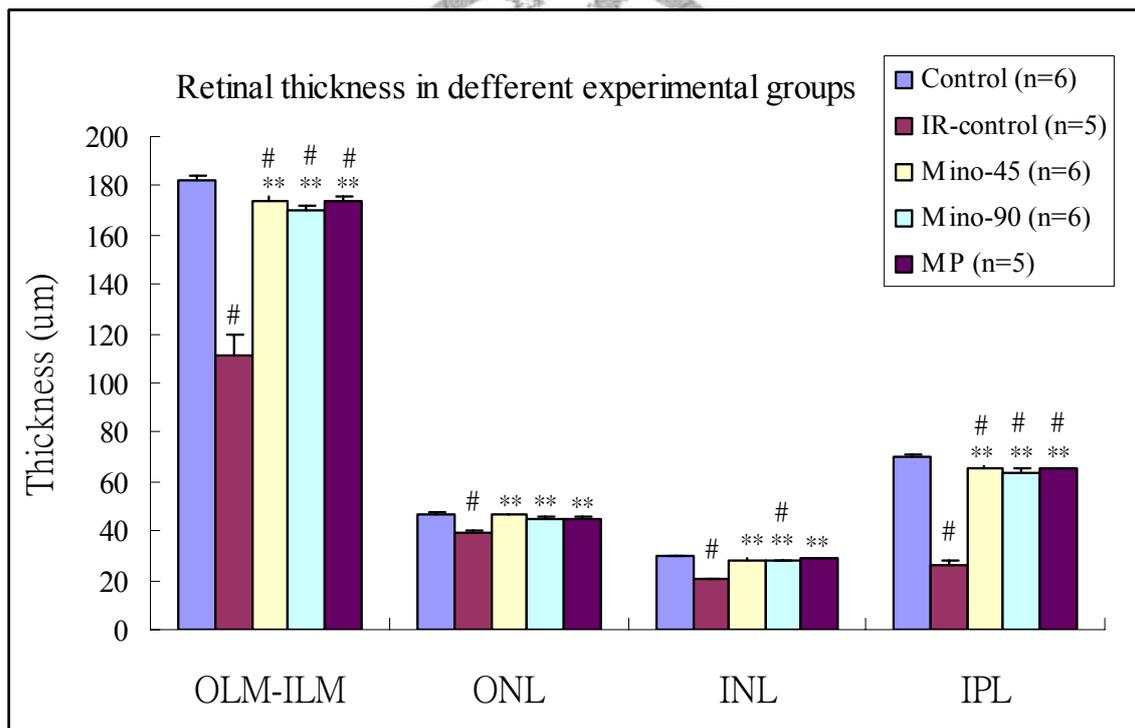


圖 3-4-2 各層視網膜厚度在各實驗組中的比較

Control 指未處理過之正常視網膜，IR-control 為無治療之 ischemia-reperfusion 傷害，Mino-45 和 Mino-90 代表每天每公斤 45mg 和 90mg 的治療，MP 為 methylprednisolone 治療。外核層 (ONL)、內核層 (INL)、內叢狀層 (IPL) 及外限制膜至內限制膜 (OLM-ILM)。#代表與 control 組有顯著差異 ( $P<0.01$ )，\*\*代表與 IR-control 組有顯著差異 ( $P<0.01$ )。

## 二、內叢狀層與外核層的比值分析 (IPL/ONL ratio)

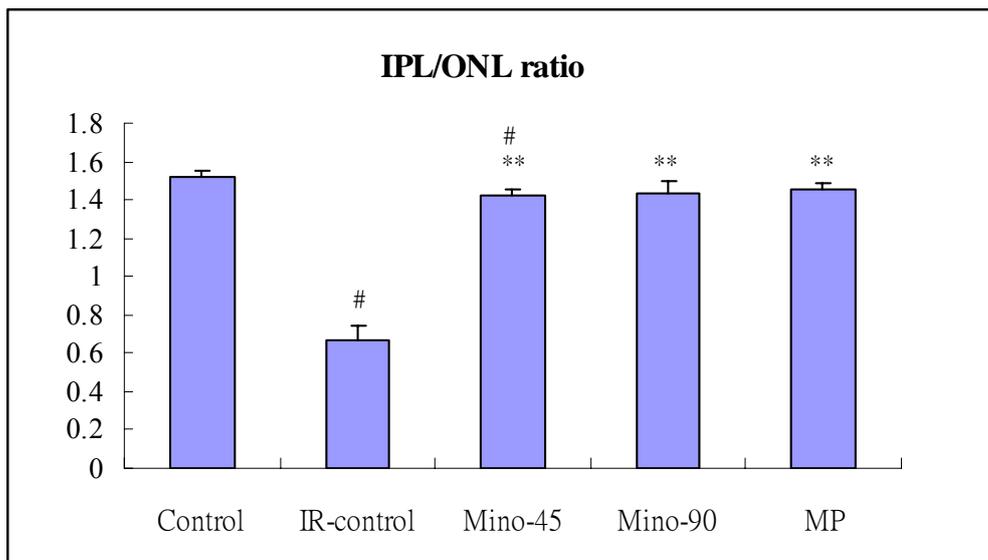
由前面的結果得知，視網膜對於缺血再灌流性的傷害在大鼠模式中，內層的傷害常常比外層嚴重，除了之前的各層厚度比較之外，內叢狀層與外核層的比值分析(IPL/ONL ratio)也被提出作為定量病理形態上的傷害的改變程度 (Saito *et al.*, 2005)。

表 3-4-6 與圖 3-4-3 為 IPL/ONL 的比值在各實驗組的數據與圖示，同樣也比較 IR-control 組的傷害程度與 Control 組的結果，表現出顯著差異 ( $P$  值  $1.20417E-07$ )；而 Mino-45 治療組與 Control 組也有顯著差異 ( $P$  值  $0.043$ )；但 Mino-90、MP 治療組與 Control 組比較卻無顯著差異性存在。另外比較出 Mino-45、Mino-90、MP 組與 IR-control 組的結果，都表示出顯著差異，代表三個治療組皆有保護效果。

表 3-4-6 內叢狀層/外核層比值 (IPL/ONL ratio) 各組統計分析比較

IPL/ ONL	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	Mean±S.D.
<b>Control</b>	1.65	1.45	1.47	1.52	1.56	1.48	1.52±0.03
<b>IR-control</b>	0.77	0.51	0.71	0.86	0.48		0.67±0.07
<b>Mino-45</b>	1.37	1.47	1.55	1.42	1.35	1.36	1.42±0.03
<b>Mino-90</b>	1.48	1.45	1.56	1.60	1.20	1.28	1.43±0.06
<b>MP</b>	1.42	1.47	1.39	1.57	1.45		1.47±0.03

Control 指未處理過的正常視網膜(n=6)，IR-control 為缺血病變後七天未治療(n=5)，Mino-45 與 Mino-90 為每天每公斤給予 minocycline 45mg 及 90mg 治療缺血性病後七天後的結果(n=6)，MP 為 methylprednisolone 治療缺血病變七天後結果(n=6)。IPL/ONL，內叢狀層/外核層比值，No.1 至 No.6 代表不同大鼠的數據結果。



**圖 3-4-3 內叢狀層/外核層比值 (IPL/ONL ratio) 各實驗組統計圖**

Control 指未處理過的正常視網膜，IR-control 為無治療之 ischemia-reperfusion 傷害，Mino-45 和 Mino-90 代表每天每公斤 45mg 和 90mg 的治療，MP 為 methylprednisolone 治療。IPL/ONL，內叢狀層/外核層比值。#代表與 control 組有顯著差異 ( $P<0.05$ )，\*\*代表與 IR-control 組有顯著差異 ( $P<0.01$ )。



## 第四章 討論

### 第一節 視網膜缺血性病變的模式

在選擇實驗動物研究視網膜缺血性病變上，大鼠模式為最接近人類，因為比起其他實驗動物如兔子等，大鼠的視網膜血管構造與人類較相符，病變特色也是以視網膜內層細胞受損為主，就如本研究實驗顯示的結果 (Osborne *et al.*, 2004)。故考量解剖構造、病變模式、經濟性與操作方便性而言，本實驗選擇大鼠為視網膜缺血性研究的動物模式。

在不同青光眼的研究模式中，本實驗是使用高眼壓方式造成眼底血管壓迫而造成完全的缺血，此模式廣泛應用在研究視網膜缺血的病變，相似的病變如青光眼性的視神經病變或後期糖尿病性視神經病變等。會選用此模式的原因如操作簡單，不需非常複雜且昂貴的器具或手術方法來引起病變，掌握缺血時間可精確的控制，且可較單純的討論其血管性缺血的因素造成的神經病變，因其急性的高眼壓在拔除針頭之後，眼壓馬上就降回正常值，就單純眼壓因素而言不會再影響之後的病變 (Osborne *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2004)。

另外，在缺血時間的選擇，本實驗參考了 1991 年 Hughes 實驗了多個時間因素，來定量分析大鼠視網膜傷害程度的差異 (Hughes, 1991)，但就病理上的病變型態而言，可能需要超過 45 分鐘的缺血，才可觀察到神經病變型態 (Osborne *et al.*, 2004)。我們在實驗前也有進行一些前導實驗 (pilot study)，使用 30 與 60 分鐘的完全缺血來看看差異性，結果也顯示 30 分鐘的缺血，三天後的視網膜電波圖結果 b 波雖然有下降，但並不顯著，且七天後的切片結果是無差異的；60 分鐘則不論在視網膜電波圖或切片結果都顯示有相當的破壞。因為我們探討藥物治療的效果與評估，不適合使用過長的缺血時間，以免傷害太嚴重，而無法比較出不同藥物的保護效果，故我們選擇 45 分鐘的缺血時間來進行研究。

## 第二節 神經保護藥物的選擇

本文所使用的 minocycline 為已知的四環素的第二代衍伸物，近年來有很多神經傷害的動物模式，例如大腦的缺血傷害、腦部的創傷、亨丁頓舞蹈症 (Huntington disease)、帕金森氏病(Parkinson disease)等中被證實有保護的效果 (Yrjanheikki *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2001; Tikka & Koistinaho, 2001; Arvin *et al.*, 2002)。視網膜方面，minocycline 也被發現在光傷害引發的感光細胞死亡模式中，能提供保護的效果 (Baptiste *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004)；另外 Levkovitch-Verbin 等人以些微升高的青光眼模式以及截斷視神經的模式，發現 minocycline 能延緩神經節細胞(RGCs)的死亡 (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2006)。但目前至今尚無任何相關的實驗或研究有提到 minocycline 與視網膜缺血再灌流的關連性。Minocycline 在臨床上的用途，除了抗微生物的作用，年來才較重視其抗發炎反應、神經保護的效果，也應用於風濕性關節炎、急性腦部創傷等 (Elewa *et al.*, 2006)。本實驗的目的為利用 minocycline 對於缺血再灌流性的保護特性，與已證實對大腦神經、抗炎症、抗氧化的作用理論基礎，嘗試用在視網膜視神經的缺血再灌流模式中，探討是否也具有相當的效果。

另外，在脊椎神經或大腦的傷害中，最常被使用來保護神經的便是類固醇類的藥物，其中又以 methylprednisolone 最常被提出來，無論在實驗或臨床上的資料很多 (Slivka & Murphy, 2001; Baptiste & Fehlings, 2006)。目前國內外的一些獸醫眼科專科醫師在治療急性青光眼時，在給予 mannitol 降眼壓之前，會先給予 methylprednisolone 保護視網膜減少再灌流的傷害 (Rhee *et al.*, 2006)，但類固醇對於視網膜能提供保護效果的確切證據，有待進一步研究證明。除了神經方面的研究，其他如器官的移植、心血管手術、皮瓣移植等顯微手術，臨床上經常會建議例行給予類固醇，在動物實驗中也證實 methylprednisolone 能有效的減少因缺血傷

害造成的一系列炎症反應、細胞水腫壞死等現象 (Askar & Bozkurt, 2002; Muratore *et al.*, 2003; Chimalakonda & Mehvar, 2004; Saidi *et al.*, 2007; Pulitano & Aldrighetti, 2008)。因考慮在臨床或實驗上，methylprednisolone 已被廣泛使用來對抗缺血再灌流所造成的組織傷害，以及提供神經保護效果，因此我們將他利用在視網膜缺血病變模式，來探討定量評估是否也視網膜神經保護的效果，並與 minocycline 做的對照比較。

### 第三節 視網膜電波圖討論

#### 一、視網膜功能評估的選擇

神經保護的效果經常以組織病變型態來評估，但其實對於神經保護藥物的效果，在功能的評估比較能反映臨床上的使用。動物的視覺功能可以紀錄視網膜和視覺皮質的激發電位來評估。視網膜電波圖 (electroretinography, ERG) 呈現出視網膜的活動，並可以區分出不同層細胞的反應；而視覺激發電位 (visual evoked potentials, VEPs) 則可反映出視覺皮質以下的所有視覺途徑功能，並可以允許動物清醒或移動時測量，排除了因麻醉而影響電生理活動 (Bernstein *et al.*, 2003)。2008 年 Jehle 等人的實驗提高大鼠的眼內壓到 120 mmHg 造成視網膜缺血病變，並以不同的缺血時間來評估這些電生理的敏感性，實驗結果顯示 VEPs 比 ERG 能感受到更短時間的傷害，而 ERG 中的震盪電位 (oscillatory potentials, Ops) 對於缺血性傷害比 a 波和 b 波更為敏感，但所有電生理的參數所提供的價值還是遠遠超過病理型態學的評估 (Jehle *et al.*, 2008)。而本實驗考量針對大鼠 VEPs 的儀器器材取得不易，震盪電位不易精確的紀錄定量，並且大鼠 ERG 的 a、b 波能穩定的偵測，缺血傷害也都能明顯的反應在波型上，如此對於藥物保護的效果也較能精確定量，因此本實驗採用 ERG 作為視網膜功能的評估工具。

本次實驗使用的視網膜電波圖儀器 (BPM-100 System, ERG/VEP)為多年來常在獸醫臨床上使用。使用方式已於材料方法段落中提過。記錄電極是以隱形眼鏡形式貼覆住該檢查眼角膜上，但我們使用的隱形眼鏡電極 (contact lens, ERG-jet®)並非特製訂做的，而是使用已商品化用在小動物的產品，所以電極的大小較不適用於大鼠的角膜，所接收的雜訊較大。在經過多次的試驗調整後，我們已能接收到非常完美波型，雜訊也都控制在 10 $\mu$ V 以下，如此測量出來的視網膜電波圖結果不會受雜波干擾，可信度高；另外整個實驗均使用同一種隱形眼鏡記錄電極，結果也是與自己另一側正常做比較來減少誤差。

## 二、統計視網膜保護效力結果與文獻之討論

對於高眼內壓導致視網膜缺血的傷害模式中，大致可以看出視網膜功能的改變與傷害。本實驗結果也證明，以評估缺血性病變最常用的 b 波來看，Mino-45 與 Mino-90 兩組的 b 波保留分別為 57.5% $\pm$ 2%、64.1% $\pm$ 6%，與未治療的 IR-control 組 25.6% $\pm$ 2%有極顯著的差異 (見圖 3-3-2)；就結果而言，每天每公斤給予腹腔注射 45 mg 的 minocycline，可以明顯的降低高眼內壓導致視網膜缺血的傷害；但在提高濃度至每天每公斤 90 mg 時，得到的效果雖然 b 波的整理保留平均大於 45 mg，但沒有達到顯著差異。至於類固醇 methylprednisolone 投予的結果，b 波保留約 62.9 $\pm$ 8%，與未治療組有顯著差異，但與兩個劑量的 minocycline 治療組都沒有顯著差異，根據統計的結果，我們可以推測在大鼠的視網膜缺血模式中，兩個劑量的 minocycline 對於視網膜的缺血性傷害，能提供與 methylprednisolone 差不多功能上的保護效力。

針對實驗的結果，我們可以由視網膜電波圖的 b 波看出 minocycline 具有保護視網膜功能的效果，雖然無法達到完全的保護。因本實驗採取

的是以極高的眼內壓造成完全的缺血，對視網膜非常嚴重傷害的模式，任何的神經保護藥物對於抗細胞凋零、抗氧化傷害、抗炎症等一連串的細胞連鎖反應必須全面的、強而有力的，才能在如此劇烈的破壞下，提供保護神經細胞的效果，因此我們假定只要在病理上有多一些細胞被保留下來免於遭受破壞都被認定有神經保護的作用。而 minocycline 不但在組織病理層面上，且在電生理方面都有顯著的差異，也就是 minocycline 對於視網膜這種缺血性傷害，能提供”功能性保護”，但對於視力被保留的程度其精確的定量還未非常明瞭。

至於探討 minocycline 提供神經保護的機制有不少，但目前針對視網膜缺血再灌流的傷害研究很少。另外，有許多探討基質金屬酵素 (MMPs) 在視網膜傷害中所扮演角色的相關研究陸續被發表，一些常見疾病如老年性黃斑部病變、糖尿病性視網膜病變、青光眼等，發現有 MMPs 短暫的增加現象 (Sivak & Fini, 2002)。而在實驗動物的研究中也發現，給予 kainate、NMDA、氯化鉀等藥物產生興奮性細胞毒性，都有看到 MMP 第九型 (MMP-9) 表現量與活性增加的現象 (Mali *et al.*, 2005; Manabe *et al.*, 2005)。Zhang 等人有報告證實於缺血傷害後 3-76 小時間 MMP-2 和 MMP-9 有顯著的增加，其高峰分別達正常的 6 倍及 15 倍 (Zhang *et al.*, 2002)。2007 年 Mathalone 等人非但證實此理論，也是首次將 minocycline 應用在大鼠的視網膜缺血性傷害；在他們的實驗裡，minocycline 可以顯著的減少視網膜結構因缺血而遭受的破壞，並且 *in vitro* 的結果顯示可以抑制大量 MMP-9 和 MMP-2 的活性 (Mathalone *et al.*, 2007)。

除了抑制金屬基質酵素的活性以外，還有其他機制被提出來解釋 minocycline 提供神經保護的效果。Yoo 等人發現大鼠高眼壓缺血模式下，會有鋅聚集的現象，並進一步導致視網膜細胞的死亡；而四環素則藉由螯合鋅離子而使金屬基質酵素無法活化 (Yoo *et al.*, 2004)。Baptiste 證明

minocycline 可藉由抑制 caspase-3 的活化而達到抗細胞凋零的效果 (Baptiste *et al.*, 2004)。此外，minocycline 可抑制微膠質細胞的活化來幫助視網膜抵擋因光傷害所造成的感光細胞的損失 (Zhang *et al.*, 2004)。Minocycline 並能抑制誘發 caspase 的活動、p38 的磷酸化、及減少因活性氧分子(ROS)、NO、過氧化氫等對組織造成的氧化傷害 (Lin *et al.*, 2001; Zemke & Majid, 2004)。綜合上述，我們可得知 minocycline 可藉由抑制金屬基質酵素活化及其他機制來達到神經保護的效果，但值得注意的是目前沒有一篇報告有直接證據闡明 minocycline 在不同機制的角色，但多數作者認為 minocycline 主要干擾較上游的物質，來阻止一連串的細胞凋零、細胞毀滅的途徑發生。儘管上述種種活體外 (in vitro) 實驗證實許多不同的機制，尚未有人直接驗證 minocycline 在活體上 (in vivo)，對於大鼠的視網膜缺血性傷害，是否能提供“功能性的保護”，而根據本實驗結果，minocycline 是臨床上易取得的藥物，並且在眼部組織急性缺血性傷害中，可能在降低視網膜功能受損上，具有某種程度上的重要性。

本實驗所選用的兩個 minocycline 劑量分別為每天 45 mg/kg 及 90 mg/kg，兩個劑量投予下視網膜電波圖顯示的結果，都明顯的比對照組的 b 波損失的少，雖然無法達 100% 的保護，但因本實驗採取極強烈的缺血性破壞，也可能因此而無法達到跟沒缺血的眼睛一樣。而根據統計的結果，較高劑量的 90 mg/kg 平均來看保留的 b 波似乎比 45 mg/kg 來得多，但在統計上是沒有顯著差異的，有可能兩個濃度在保護的效果上是沒差異的，高劑量的投予不一定對視網膜是比較理想的；另外也許因電生理的變因多，使得統計上無法將差異顯現出來。

而本實驗的劑量與方式是根據先前許多急性神經創傷動物模式中，有神經保護效果的劑量 (表 4-1)，多數的腦部急性創傷動物模式，採取高劑量的 90mg/kg/day 的 minocycline 投予並證實有保護效果 (Elewa *et al.*,

2006)。在大鼠的亨丁頓舞蹈症模式下，每天 5 mg/kg 的劑量就可以延緩病程的進展 (Chen *et al.*, 2000)；在小鼠的肌萎縮性脊髓側索硬化症模式下，每天 10 mg/kg 可以延遲疾病的發生 (Zhu *et al.*, 2002)；然而在腦部急性創傷或梗塞缺血等模式，則必須投予較高的 45 mg/kg 才能有效的減緩組織的傷害 (Sanchez Mejia *et al.*, 2001)；甚至在大鼠腦部缺血實驗中，投予更高的 90-180 mg/kg/day，也沒有觀察到明顯的副作用 (Yrjanheikki *et al.*, 1998)。

Animal Model and Type of Injury	Minocycline Dosage	Therapeutic Window	Outcome
Rat focal ischemia, TMCAo (90 min) <sup>14</sup>	45 mg/kg i.p. b.i.d. on day 1, then 22 mg/kg i.p. b.i.d. for 2 days	Pretreatment: 2-4 hrs after insult:	76% infarct reduction (72 hrs) 63% reduction
Rat focal ischemia, embolic clot <sup>15</sup>	45 mg/kg i.p. b.i.d. on day 1, then 22.5 mg/kg i.p. b.i.d. on day 2	1 hr after insult	42% infarct reduction (48 hrs)
Mouse focal ischemia, PMCAo <sup>16</sup>	90 mg/kg i.p.	Pretreat 60 min before or 30 min after insult	Reduced infarction and brain swelling
Rat focal ischemia, TMCAo (90 min) <sup>17</sup>	3 and 10 mg/kg i.v.	4 hrs (3 mg/kg), 5 hrs (10 mg/kg)	40-50% infarct reduction (24 hrs)
Gerbil global ischemia <sup>18</sup>	45 mg/kg i.p. x 1, then 90 mg/kg i.p. b.i.d. on day 1, then 45 mg/kg after 36 hrs	Pretreatment: 30 min after insult:	Increased survival of CA1 neurons from 10% to 77% Increased survival to 71%
Rat neonatal hypoxia-ischemia <sup>10, a</sup>	45 or 22.5 mg/kg i.p.	Immediately before or after insult	Robust protection before and at 30 min, but not at 3 hrs
Rat spinal cord injury <sup>20</sup>	50 mg/kg i.p. b.i.d. for 2 days	30 min after insult	Improved function
Rat spinal cord injury <sup>21</sup>	90 mg/kg i.p. x 1, then 45 mg/kg i.p. for 5 days	1 hr after insult	Enhanced long-term hind-limb locomotion, coordinated motor function, and hind-limb reflex recovery
Mouse spinal cord injury <sup>22, b</sup>	50 mg/kg	1 hr after insult	Improved hind-limb function and strength, axonal sparing, superior to methylprednisolone
Mouse traumatic brain injury <sup>23</sup>	90 mg/kg i.p. x 1, then 45 mg/kg i.p. b.i.d. until sacrifice	Pretreatment or 30 min after insult	Improved function (Rotorod test), decreased lesion size
Rate intracerebral hemorrhage <sup>24, c</sup>	45 mg/kg i.p. b.i.d. on day 1, then 22.5 mg/kg i.p. x 1	1 hr after insult	Improved function

**表 4-1 不同急性神經傷害的動物模式中，minocycline 的投予方法、使用劑量與保護效果。(Elewa *et al.*, 2006)**

相較之下 Minocycline 的效果在視網膜活體上 (*in vivo*) 的實驗相關文獻很少，每給予 90mg/kg/day 的 minocycline 可以保護大鼠對抗光傷害，減少感光細胞的損失 (Zhang *et al.*, 2004)；Levkovitch-Verbin 等人報告至少要 15 mg/kg/day 的劑量才能在青光眼模式下有保護效果，而每天給予 22.5 mg/kg 或 45 mg/kg 則能達到最大的保護效果，他們並發現若能再傷

害之前投予 minocycline，其保護效果會明顯的比傷害發生後給予來得好 (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2006)。Minocycline 有很好的組織穿透力，有研究指出，到腦部的濃度約為血漿中的 30-40%，Shimazawa 等指出，在 90 mg/kg 的給予下，minocycline 到達視網膜的濃度足夠提供神經保護的效果 (Shimazawa *et al.*, 2005)。而本實驗的結果大致與 Levkovitch-Verbin 等人符合，給予了 45 mg/kg 即有很好功能上的保護效果。

雖然 methylprednisolone 在神經保護的相關研究很多，但其對視網膜影響方面的文獻也很少，Rhee 等人發現 topiramate 這種抗癲癇藥物引起的急性閉鎖性青光眼，可以用 methylprednisolone 加上 mannitol 迅速的改善，效果能持續至高張溶液消失後還繼續，並能有效的改善此藥物引起的發炎反應 (Rhee *et al.*, 2006)。另外雖然兔子高眼壓模式下的引起缺血再灌流傷害和大鼠不太一樣，兔子的視網膜是外層傷害較嚴重，但 Uckermann 等人發現，玻璃體內注射類固醇 triamcinolone，可以減少再灌流初期微膠細胞和炎症細胞的活躍，進而保護視網膜感光細胞避免遭受破壞 (Uckermann *et al.*, 2005)。

### 三、不同光源強度的使用與討論

若使用大範圍不同強度的光源強度，來刺激視網膜產生電流，可獲得較完整視網膜功能上的資訊；並有助於我們瞭解 b 波敏感性的範圍、最大的波幅，進一步進行視網膜功能上細微的分析。目前幾乎多數的研究報告是利用單一光源刺激來評估視網膜的功能變化，2004 年 Mukaida 等人便使用許多不同光源強度，來刺激視網膜誘導出電流，發現在某些強度使用時，敏感度會增加，稱作“dip”現象，會加強並誇張傷害的程度，讓我們在初期初變就可偵測到，但此並非代表實質性傷害的程度，故使用時需注意定量病變上的數據，當然建議每次評估時使用所有可能的光

源強度去探測病變的程度 (Mukaida *et al.*, 2004)。

在本實驗中，未治療 IR-control 組再灌流後第三及第七天結果，平均波幅來看不論在哪種光源強度刺激下，a 波皆有輕微的減少(參考圖 3-1-4 及 3-1-5)。比較 a-ratio 的變化，第三天的-15dB、-5dB 及 0dB 的光源強度中，IR-control 和對照組比較，測得有顯著差異( $P < 0.05$ )，而第七天則為測得-5dB、0dB、+5dB 三組有顯著差異。在 Mukaida 的實驗中，a 波於缺血後有輕微下降，但未達顯著差異，沒有發現 dip 現象，因此沒有多加討論，而將研究比較重心擺在 b 波的變化。另外，他們的實驗也發現當缺血越久傷害越大時，a 波的出現會延期，本實驗沒有注意到此現象，可能跟傷害的時間有關連，在 Mukaida 的實驗中當缺血 60 分鐘的傷害後，a 波會延至大約-20dB 才會出現，而我們採取 45 分鐘的缺血時間，可能需要更低的刺激才會觀察到，但我們最低的刺激強度也只得-20dB，可能因此沒觀察到。而本實驗中雖然有幾個光源達顯著差異，但似乎跟光源強弱沒有直接關係，有趣的是-5dB 及 0dB 的光源強度在缺血後第三、第七天都分別與有對照組比較，測得有顯著差異，一般來說缺血傷害對 a 波的影響較小，而是否 a 波的”dip”落在這兩個光源強度附近，目前很少有不同光源強度的文獻可以佐證，只能有待未來進一步鑽研。

在 b 波的方面，於缺血後第三、第七天的視網膜電波圖結果，無論何種光源強度的刺激，IR-control 的 b-ratio 與對照組比較均有極顯著的差異性，也沒觀察到”dip”現象 (參考圖 3-1-4 及 3-1-5)。原因可能為我們所使用的儀器，光源強度範圍設定無法低至-30dB，在上述 Mukaida 的實驗中使用的強度最低可至 $-5.73 \log \text{cd-s/m}^2$ ，約等於-55dB，但本實驗使用最低的強度僅至-20dB，而 dip 的出現也大約在-15dB 和-20dB 之間，故假使有 dip 出現在本實驗，也會呈現在最低光照強度的結果，無法明顯展示出凹下去再上來的典型 dip 現象，不過仔細觀察本實驗 b-ratio 的平均統計

結果，於-15dB 和-20dB 兩個光源強度時的確差異比較大，只可惜沒能測更低，無法獲得更完整的資訊。另外還有一點值得注意的是，根據 Mukaida 的研究結果，“dip”現象為某些強度使用時，會加強並誇張傷害的程度，但其實正常的視網膜中，其 b 波的電波圖結果也有輕微 dip 現象，隨缺血傷害越大 dip 的現象與明顯（圖 5-1），而本實驗並非直接比較 b 波波幅值的改變，而是觀察 b-ratio 的變化，以實驗眼比較正常對側眼，因正常眼的 b 波也有 dip 現象，因此相除之下，雖然缺血仍會使 dip 變加強，但與直接觀察 b 波波幅，b-ratio 的比值會減少誇張傷害的程度。故實驗若採取單一光源觀察視網膜的功能時，除了要避開某些會誇張傷害程度的光源強度以外，比較 b-ratio 的變化可能比直接觀察 b 波波幅來得客觀。

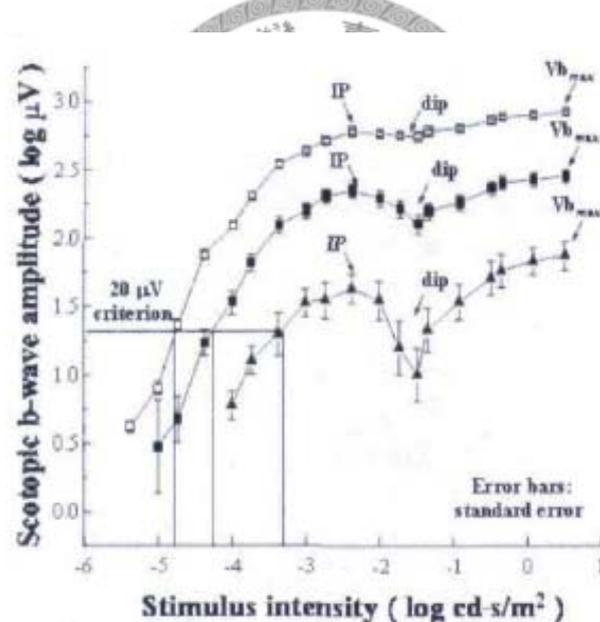


圖 5-1 視網膜 b 撥波幅與不同刺激光源極度的關連性比較圖 (Mukaida *et al.*, 2004)。於光源強度約-20 至-15dB 之間，b 波波幅會突然的減少，稱為”dip”現象。原因可能為 a 撥需要較強的光源刺激才會出現，而此段剛好是負波的 a 波被激發開始出現的強度，因此抵銷正波的 b 波波幅，才會出現突然下陷的趨勢。

而就治療組來看，用 t-test 統計在 b-ratio 的結果中，使用不同光源強度在 Mino-45、Mino-90、MP 組與對照組和無治療的 IR-control 組都有顯

著差異，無法有足夠證據顯示不同的光源強度可偵測並誇大傷害程度，也不向前述的 dip 現象 (參考圖 3-2-1 及 3-2-6)，但與非治療的 IR-control 組結果類似其 b-ratio 的平均統計結果，也是於-20dB 至-10dB 光源強度時的確差異比較大。故上述結論為，若以低光源強度探測傷害或保護效果，有可能會加強並誇大顯示的數據來表示病變或保護的效力。以此實驗來說，使用從低至高的不同光源強度刺激來評估病變或保護效果，是一種很有效且可細微比較出病變差異程度的方法。

#### 第四節 組織病理型態的討論

##### 一、缺血再灌流對病理型態上之影響

在 1991 年 Hughes 實驗 30 到 180 分鐘的視網膜缺血時間的影響，病理切片時間選擇缺血後兩週來比較。發現要造成視網膜不可逆的傷害，內層需要超過 30 分鐘缺血，外層要超過 90 分鐘 (Hughes, 1991)。另外，Jehle 等人發現，發現大鼠視網膜厚度的減少在缺血病變後，內層的傷害大於外層，只要超過 45 分鐘的缺血，一半以上的 RGCs 會損失 (Jehle *et al.*, 2008)。2003 年 Grozdanic 等人以 110mg 的高眼壓造成缺血持續 60 分鐘，病理的結果顯示視網膜每層都有受影響變薄，尤以內層越靠近中央的部分厚度損失越嚴重，而靠周邊的 ONL 厚度幾乎沒有減少；但不管外層或內層，其細胞排列結構都有嚴重的混亂，顯示在缺血性傷害後，即使視網膜厚度損失不多，但保留下來的視網膜不一定是具有功能性的 (Grozdanic *et al.*, 2003)。

本實驗使用的視網膜缺血時間為 45 分鐘，病理評估時間為缺血後一週，在模式比較上是屬於較弱的傷害，原因為我們的目的在評估神經保護的效果，不止討論病理的結果，也需討論到視網膜電波圖對視網膜功能性的分析，故需考慮到強度適中的缺血病變，而選擇 45 分鐘的缺血時間。

另外 Neufeld 等人也提到在此模式中，最少也需要 45 分鐘的缺血時間，才有可能造成足夠、可觀察到的神經退化病變 (Neufeld *et al.*, 2002)。

## 二、病理結果的統計與文獻之討論

就病理整體評估而言，本實驗和過去的研究結果類似，發現大鼠視網膜厚度的減少在缺血病變後，內層的傷害大於外層 (Hughes, 1991; Osborne *et al.*, 2004)。正常的視網膜各層厚度值與不同實驗組別的結果可見表 3-4-1 與圖 3-4-2 所示，在缺血病變後，幾乎視網膜所有結構層都有受到影響，尤其是 OLM-ILM 層與 IPL 層最為明顯。因為視網膜內層傷害較顯著，而 OLM-ILM 層與 IPL 層皆包括視網膜內層，故在統計上容易表現出顯著差異；另一方面，ONL 層與 INL 層破壞較為輕微，主要原因可能為 ONL 層屬視網膜外層，在大鼠的模式中傷害較不顯著，故厚度下降的表現必較不顯著；視網膜內核層 (INL) 的統計結果，以厚度改變比較來看，傷害性比內叢狀層 (IPL) 小很多，INL 層雖為視網膜內層，但此層主要為細胞本體，傷害性為細胞數目減少或細胞內器官的病變，整體厚度在較強烈傷害才容易下降 (Buchi, 1992)。Mukaida 等人認為，內核層由 amacrine、bipolar、horizontal、Müller cells 等細胞核組成，而他們對缺血再灌流傷害的感受性都不一樣，而 Müller cells 對缺血性傷害有極大的抵抗性，和 b 波的產生也沒有直接的關連，在嚴重的缺血傷害後，此層剩餘的細胞核大多為 Müller cells，也因此 b 波的下降低往往大於病理上 INL 層所呈現的結果 (Mukaida *et al.*, 2004)。

在整體厚度 OLM-ILM 的統計結果，包括 IR-control 組與所有治療組都和 control 組有顯著差異，表示 45 分鐘的視網膜缺血病變，確實使整體視網膜厚度下降；雖然有統計上顯著差異，但整體看來，沒給藥治療的 IR-control 組 OLM-ILM 厚度只剩 control 的六成左右，而其他三個治療

組：Mino-45、Mino-90、MP 組則保留九成以上，且統計結果與 IR-control 有顯著差異。代表的意義是以整體視網膜厚度 (OLM-ILM) 的評估而言，這三個治療組別雖無法提供百分之百的視網膜保護效果來防止受損，但仍表現有蠻大的保護效力。

之前在大鼠視網膜缺血病變的實驗中，IPL 層是公認傷害較明顯的視網膜層 (Hughes, 1991; Buchi, 1992; Osborne *et al.*, 1999; Goldblum & Mittag, 2002; Osborne *et al.*, 2004)。以 IPL 評估結果，可見 IR-control 組內叢狀層厚度與 control 組比較，有極顯著的下降，表示高眼壓製造的視網膜缺血傷害會讓 IPL 有明顯厚度下降。三個治療組 Mino-45、Mino-90、MP 組與 control 對照組皆有顯著差異，但與 OLM-ILM 的情況類似，IPL 厚度在沒給藥治療的 IR-control 組不到 control 組的四成，而其他三個治療組皆保留九成以上，且統計結果與 IR-control 有顯著差異。而三個治療組之間則沒有差異性。表示三個治療組雖然有 IPL 厚度下降的病變傷害，但下降的非常輕微，對於視網膜保護效果算相當不錯，可防止視網膜內層厚度的大量下降，並且對於內叢狀層，三個治療組之間的保護效力是差不多的。

另外提到 IPL/ONL 比值的討論，可見表 3-4-6 與圖 3-4-3 所示。指出 IR-control 組與 control 組有顯著差異，表現出視網膜缺血病變在 IPL/ONL 比值的評估可造成顯著性傷害。Mino-90、MP 治療組與 Control 組比較卻無顯著差異性存在。另外比較 Mino-45、Mino-90、MP 組與 IR-control 組的結果，都表示出顯著差異，而 Mino-45 治療組與 Control 組比較的 IPL/ONL 比值有下降 ( $P$  值 0.043)，表示在每天 45mg/kg 的 minocycline 治療後發現仍有視網膜傷害發生；但另一方面 Mino-45 組與 IR-control 組有顯著差異 ( $P < 0.01$ )，顯示在 45mg/kg 的 minocycline 治療後，視網膜 IPL/ONL 比值並不會像無治療組 IR 下降的程度，即代表 Mino-45 是有保

護視網膜內層的能力。而其他兩組 Mino-90 與 MP 組與 control 組比較無顯著差異 ( $P>0.05$ )，表示在 90 mg/kg minocycline 和 methylprednisolone 治療後，IPL/ONL 的比值與正常組無異，無任何視網膜內層厚度下降的趨勢，表現出極好的視網膜保護效果。

這種大鼠缺血再灌流的模式，並觀察其病理型態的變化，應用在其他不同的神經保護藥物，過去的文獻中有不少的發現。Hirooka 等人在 2006 年使用 D-Allose 來治療大鼠視網膜缺血再灌流傷害，此模式亦選擇 130 mmHg 眼壓持續眼壓持續 45 分鐘的視網膜完全缺血，同樣評估第七天的視網膜厚度 (Hirooka *et al.*, 2006)。Riazi-Esfahani 等人利用紐西蘭白兔的高眼壓模式 150mmHg 持續 60 分鐘，在病理結果上觀察到 morphine 有保護視網膜對抗缺血再灌流傷害的效果 (Riazi-Esfahani *et al.*, 2008)。Saito 等也是利用此模式證明 NS-7 可以減少缺血再灌流傷害後內叢狀層的減少 (Saito *et al.*, 2005)。本實驗所選用的神經保護藥物 minocycline 也曾被利用在此模式並觀察其病理變化，Mathalon 等人則利用每天 5 mg/kg 的 minocycline 使用在大鼠高眼壓缺血模式上，製造 140mmHg 持續 90 分鐘的缺血，其病理的結果有明顯的保護作用，但內叢狀層還是有明顯的減少，與本實驗結果相比損失很多，可能是因為採取的劑量不同所致 (Mathalone *et al.*, 2007)；Levkovitch-Verbin 等人也報告每天至少要 15 mg/kg 的劑量才能在青光眼模式下有保護效果 (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2006)。

## 第五節 評估藥物保護效果

根據本實驗的結果以及前述的討論，每天每公斤投予 45mg 及 90mg 的 minocycline 對於大鼠視網膜缺血再灌流的傷害模式，其在視網膜電波評估，雖然無法達到百分之百功能上的保護效果，但比起未治療的組別

相比，兩個劑量的 minocycline 確實能顯著的減少缺血再灌流所造成的傷害，並保留的部分的視網膜功能。而病理上的評估，對於視網膜內層或外層的損失，兩種劑量的 minocycline 顯示都有保護作用，保留的大部分九成以上的構造。而比較 methylprednisolone 的治療效果，發現非但在視網膜電波圖上，以及病理上呈現的結果，其所呈現的保護效果，幾乎和兩組 minocycline 治療組的結果差不多，也是在病理型態上展現了很好的保護，在功能上展現了部分的保護效果。



## 第五章 結論

視網膜的缺血性傷害在許多眼科疾病，如青光眼或糖尿病視網膜病變等，扮演重要角色，常會造成視力受損或喪失，也是目前醫師與獸醫眼科醫師面臨的挑戰之一，故視網膜神經保護的概念近年來也漸被引入至臨床眼科上。

本實驗的目的，是希望能多選擇一些取得容易的常用藥物，分析看除了藥物本身已知的使用功能之外，是否也具有有良好的視網膜神經保護能力。測試一些在之前研究中，對於其他器官如腦、肺、肝等證實具缺血性保護效果的藥物，在本實驗以大鼠視網膜缺血模式，來準確定量及比較藥物的視網膜保護效果，以供臨床醫師考量或更提供進一步的研究指標。

Minocycline 近年來在許多腦部或脊椎的急性傷害中，被發現有神經保護的效果，而類固醇則為神經疾病傷害中常使用作為保護神經的藥物，因此本實驗選擇 minocycline 和 methylprednisolone 作為研究對象。而此兩種的藥物在本研究的整體視網膜評估上，神經保護的效果是差不多的。在功能方面的視網膜電波圖檢查結果分析，此兩種要藥物能提供中等程度的保護效力；而在缺血後七天的病理型態結果顯示兩種藥物的確具有不錯的視網膜神經保護效力。其確實的視網膜保護效果，對於臨床上使用的效益有待評估，可能必須進一步進行一些不同的試驗及評估方法，看是否能更精確的去定量他們的保護效力。另外，目前在臨床上的視網膜病變，往往是在缺血已發生後才就診治療，而本實驗給予藥物的治療時間點在缺血前後皆有給予。故未來可針對給予藥物的時間點或劑量上再深入研究，利用本實驗的動物模式，去進一步評估藥物的視網膜保護效果。

## 第六章 參考文獻

- Akdemir G, Ergungor MF, Sezer M, Albayrak L, Daglioglu E & Kilinc K. (2005). Therapeutic efficacy of intraventricular cyclosporine A and methylprednisolone on a global cerebral ischemia model in rats. *Neurol Res* **27**, 827-834.
- Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin SZ, Paul SM & Holtzman DM. (2002). Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* **52**, 54-61.
- Ashley RA. (1999). Clinical trials of a matrix metalloproteinase inhibitor in human periodontal disease. SDD Clinical Research Team. *Ann N Y Acad Sci* **878**, 335-346.
- Askar I & Bozkurt M. (2002). Protective effects of immunosuppressants and steroids against ischemia-reperfusion injury in cremaster muscle flap at microcirculatory level. *Microsurgery* **22**, 361-366.
- Baptiste DC & Fehlings MG. (2006). Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma* **23**, 318-334.
- Baptiste DC, Hartwick AT, Jollimore CA, Baldrige WH, Seigel GM & Kelly ME. (2004). An investigation of the neuroprotective effects of tetracycline derivatives in experimental models of retinal cell death. *Mol Pharmacol* **66**, 1113-1122.
- Bernstein SL, Guo Y, Kelman SE, Flower RW & Johnson MA. (2003). Functional and cellular responses in a novel rodent model of anterior ischemic optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 4153-4162.
- Bonne C, Muller A & Villain M. (1998). Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol* **30**, 275-280.
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC & Yong VW. (2002). Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* **125**, 1297-1308.
- Buchi ER. (1992). Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell

layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* **55**, 605-613.

Buchi ER, Suivaizdis I & Fu J. (1991). Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica* **203**, 138-147.

Chao HM & Osborne NN. (2001). Topically applied clonidine protects the rat retina from ischaemia/reperfusion by stimulating alpha(2)-adrenoceptors and not by an action on imidazoline receptors. *Brain Res* **904**, 126-136.

Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH & Friedlander RM. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* **6**, 797-801.

Chidlow G, Schmidt KG, Wood JP, Melena J & Osborne NN. (2002). Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology* **43**, 1015-1025.

Chimalakonda AP & Mehvar R. (2004). Effects of duration of ischemia and donor pretreatment with methylprednisolone or its macromolecular prodrug on the disposition of indocyanine green in cold-preserved rat livers. *Pharm Res* **21**, 1000-1008.

Danton GH & Dietrich WD. (2003). Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 127-136.

Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP & Paul SM. (2001). Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14669-14674.

Egeblad M & Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161-174.

Elewa HF, Hilali H, Hess DC, Machado LS & Fagan SC. (2006). Minocycline for short-term neuroprotection. *Pharmacotherapy* **26**, 515-521.

Fan LW, Lin S, Pang Y, Rhodes PG & Cai Z. (2006). Minocycline attenuates

hypoxia-ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat. *Eur J Neurosci* **24**, 341-350.

Foulds WS & Johnson NF. (1974). Rabbit electroretinogram during recovery from induced ischaemia. *Trans Ophthalmol Soc U K* **94**, 383-393.

Fox C, Dingman A, Derugin N, Wendland MF, Manabat C, Ji S, Ferriero DM & Vexler ZS. (2005). Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 1138-1149.

Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R, Munchow S, Dikopoulos N, Lippek F, Langrehr JM, Dietel M, Neuhaus P & Nussler AK. (2004). Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surgery* **135**, 203-214.

Goldblum D & Mittag T. (2002). Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. *Vision Res* **42**, 471-478.

Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA & Rifkin BR. (1991). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med* **2**, 297-321.

Granit R. (1933). The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol* **77**, 207-239.

Greenwald RA, Moak SA, Ramamurthy NS & Golub LM. (1992). Tetracyclines suppress matrix metalloproteinase activity in adjuvant arthritis and in combination with flurbiprofen, ameliorate bone damage. *J Rheumatol* **19**, 927-938.

Grozdanic SD, Sakaguchi DS, Kwon YH, Kardon RH & Sonea IM. (2003). Functional characterization of retina and optic nerve after acute ocular ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 2597-2605.

Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW & Cordeiro MF. (2005). Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**,

175-182.

Gustavsson C, Agardh CD, Hagert P & Agardh E. (2008). Inflammatory markers in nondiabetic and diabetic rat retinas exposed to ischemia followed by reperfusion. *Retina* **28**, 645-652.

Hayreh SS & Weingeist TA. (1980). Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischaemia. *Br J Ophthalmol* **64**, 818-825.

Hewlett KA & Corbett D. (2006). Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. *Neuroscience* **141**, 27-33.

Hirooka K, Miyamoto O, Jinming P, Du Y, Itano T, Baba T, Tokuda M & Shiraga F. (2006). Neuroprotective effects of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 1653-1657.

Hughes WF. (1991). Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* **53**, 573-582.

Jehle T, Wingert K, Dimitriu C, Meschede W, Lasseck J, Bach M & Lagreze WA. (2008). Quantification of ischemic damage in the rat retina: a comparative study using evoked potentials, electroretinography, and histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 1056-1064.

Jian Liu K & Rosenberg GA. (2005). Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* **39**, 71-80.

Johnson MA & McPhee TJ. (1993). Electoretinographic findings in iris neovascularization due to acute central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol* **111**, 806-814.

Levkovitch-Verbin H, Kalev-Landoy M, Habet-Wilner Z & Melamed S. (2006). Minocycline delays death of retinal ganglion cells in experimental glaucoma and after optic nerve transection. *Arch Ophthalmol* **124**, 520-526.

Lin S, Zhang Y, Dodel R, Farlow MR, Paul SM & Du Y. (2001). Minocycline blocks

nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* **315**, 61-64.

Lipton P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* **79**, 1431-1568.

Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kuhnert AV, Williams SK, Neusch C, Bahr M & Diem R. (2007). Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation. *Neurobiol Dis* **25**, 514-525.

Mali RS, Cheng M & Chintala SK. (2005). Intravitreal injection of a membrane depolarization agent causes retinal degeneration via matrix metalloproteinase-9. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 2125-2132.

Manabe S, Gu Z & Lipton SA. (2005). Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4747-4753.

Mathalone N, Lahat N, Rahat MA, Bahar-Shany K, Oron Y & Geyer O. (2007). The involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat retinal ischemia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **245**, 725-732.

Mukaida Y, Machida S, Masuda T & Tazawa Y. (2004). Correlation of retinal function with retinal histopathology following ischemia-reperfusion in rat eyes. *Curr Eye Res* **28**, 381-389.

Muratore A, Ribero D, Ferrero A, Bergero R & Capussotti L. (2003). Prospective randomized study of steroids in the prevention of ischaemic injury during hepatic resection with pedicle clamping. *Br J Surg* **90**, 17-22.

Narfstrom K. (2002). Workshop in veterinary electroretinography. In *American College of Veterinary Ophthalmologists*, pp. 1-8. Denver, Colorado, USA.

Neufeld AH, Kawai S, Das S, Vora S, Gachie E, Connor JR & Manning PT. (2002). Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase. *Exp Eye Res* **75**, 521-528.

Nickells RW. (1999). Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* **43 Suppl 1**,

S151-161.

Nickells RW & Zack DJ. (1996). Apoptosis in ocular disease: a molecular overview. *Ophthalmic Genet* **17**, 145-165.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M & Melena J. (2004a). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* **23**, 91-147.

Osborne NN, Cazevielle C, Carvalho AL, Larsen AK & DeSantis L. (1997). In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res* **751**, 113-123.

Osborne NN, Melena J, Chidlow G & Wood JP. (2001). A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. *Br J Ophthalmol* **85**, 1252-1259.

Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP & Nash MS. (1999). Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* **43 Suppl 1**, S102-128.

Osborne NN, Wood JP, Chidlow G, Casson R, DeSantis L & Schmidt KG. (2004b). Effectiveness of levobetaxolol and timolol at blunting retinal ischaemia is related to their calcium and sodium blocking activities: relevance to glaucoma. *Brain Res Bull* **62**, 525-528.

Pearl JM, Nelson DP, Schwartz SM, Wagner CJ, Bauer SM, Setser EA & Duffy JY. (2002). Glucocorticoids reduce ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis in immature hearts. *Ann Thorac Surg* **74**, 830-836; discussion 836-837.

Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V & Moroni F. (1990). Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* **10**, 1035-1041.

Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW & Peeling J. (2003). Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol* **53**, 731-742.

- Pulitano C & Aldrighetti L. (2008). The protective role of steroids in ischemia-reperfusion injury of the liver. *Curr Pharm Des* **14**, 496-503.
- Rhee DJ, Ramos-Esteban JC & Nipper KS. (2006). Rapid resolution of topiramate-induced angle-closure glaucoma with methylprednisolone and mannitol. *Am J Ophthalmol* **141**, 1133-1134.
- Riazi-Esfahani M, Kiumehr S, Asadi-Amoli F, Lashay AR & Dehpour AR. (2008). Morphine pretreatment provides histologic protection against ischemia-reperfusion injury in rabbit retina. *Retina* **28**, 511-517.
- Rifkin BR, Vernillo AT & Golub LM. (1993). Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol* **64**, 819-827.
- Safa R & Osborne NN. (2000). Retinas from albino rats are more susceptible to ischaemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Res* **862**, 36-42.
- Saidi RF, Chang J, Verb S, Brooks S, Nalbantoglu I, Adsay V & Jacobs MJ. (2007). The effect of methylprednisolone on warm ischemia-reperfusion injury in the liver. *Am J Surg* **193**, 345-347; discussion 347-348.
- Saito S, Ohashi M, Naito A, Fukaya Y, Suzuki Y & Araie M. (2005). Neuroprotective effect of the novel Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> channel blocker NS-7 on rat retinal ganglion cells. *Jpn J Ophthalmol* **49**, 371-376.
- Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M & Friedlander RM. (2001). Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* **48**, 1393-1399; discussion 1399-1401.
- Schmidt M, Giessl A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U & Burmester T. (2003). How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem* **278**, 1932-1935.
- Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM & Vidal-Sanz M. (1996). Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 2002-2014.

- Shibuki H, Katai N, Kuroiwa S, Kurokawa T, Arai J, Matsumoto K, Nakamura T & Yoshimura N. (2002). Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 528-536.
- Shimazawa M, Yamashima T, Agarwal N & Hara H. (2005). Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage. *Brain Res* **1053**, 185-194.
- Sivak JM & Fini ME. (2002). MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* **21**, 1-14.
- Slivka AP & Murphy EJ. (2001). High-dose methylprednisolone treatment in experimental focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* **167**, 166-172.
- Smith DL, Woodman B, Mahal A, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Lowden PA, Bates GP & Hockly E. (2003). Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. *Ann Neurol* **54**, 186-196.
- Smith GG & Baird CD. (1952). Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* **35**, 133-136.
- Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK, Bisti S, Gargini C, Cervetto L, Merin S & Peer J. (1999). Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* **18**, 689-735.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R & Koistinaho J. (2001). Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* **21**, 2580-2588.
- Tikka TM & Koistinaho JE. (2001). Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* **166**, 7527-7533.
- Uckermann O, Uhlmann S, Pannicke T, Francke M, Gamsalijew R, Makarov F, Ulbricht E, Wiedemann P, Reichenbach A, Osborne NN & Bringmann A. (2005). Ischemia-reperfusion causes exudative detachment of the rabbit retina. *Invest*

*Ophthalmol Vis Sci* **46**, 2592-2600.

Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, Ferrante RJ, Kristal BS & Friedlander RM. (2003). Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10483-10487.

Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG & Yong VW. (2003). Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* **126**, 1628-1637.

Wood JP, Schmidt KG, Melena J, Chidlow G, Allmeier H & Osborne NN. (2003). The beta-adrenoceptor antagonists metipranolol and timolol are retinal neuroprotectants: comparison with betaxolol. *Exp Eye Res* **76**, 505-516.

Xu L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J, Hill WD, Feuerstein G & Hess DC. (2004). Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol* **4**, 7.

Yong VW, Power C, Forsyth P & Edwards DR. (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **2**, 502-511.

Yoo MH, Lee JY, Lee SE, Koh JY & Yoon YH. (2004). Protection by pyruvate of rat retinal cells against zinc toxicity in vitro, and pressure-induced ischemia in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1523-1530.

Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T & Koistinaho J. (1998). Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15769-15774.

Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH & Koistinaho J. (1999). A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13496-13500.

Zeevalk GD & Nicklas WJ. (1992). Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg<sup>2+</sup> block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem* **59**, 1211-1220.

Zemke D & Majid A. (2004). The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. *Clin Neuropharmacol* **27**, 293-298.

Zhang C, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D & Tso MO. (2004). Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2753-2759.

Zhang X, Sakamoto T, Hata Y, Kubota T, Hisatomi T, Murata T, Ishibashi T & Inomata H. (2002). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Eye Res* **74**, 577-584.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS & Friedlander RM. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* **417**, 74-78.

