



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**CURCUMİN (ZERDEÇAL)'İN PRİMER ASTROGLIAL
HÜCRE HATTINDA PENİSİLİN İLE İNDÜKLENEN
ASTROSİT STRESİNE – ÖLÜMÜNE (NEKROSİS -
APOPTOSİS) KORUYUCU ETKİSİ**

NURİYE KURBETLİ

Temmuz 2021
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CURCUMİN (ZERDEÇAL)'İN PRİMER ASTROGLIAL HÜCRE
HATTINDA PENİSİLİN İLE İNDÜKLENEN ASTROSİT STRESİNE –
ÖLÜMÜNE (NEKROSİS - APOPTOSİS) KORUYUCU ETKİSİ**

ANATOMİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Nuriye KURBETLİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER

Denizli, 2021

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1 S. Meydan, M. Esrefoglu, S. Selek, E. Akbas Tosunoglu, O. Ozturk, **N. Kurbetli**, N. Bayındır, H. Bulut & I. Meral; **BIOTECHNIC & HISTOCHEMISTRY 2019, VOL. 94, NO. 4, 277–282**; "Protective effects of caffeic acid phenethyl ester and thymoquinone on toluene induced liver toxicity"

Ek-2 Selma Tekin, Çağatay Hilmi Öncel, Mehmet Bülent Özdemir, Yalın Tolga Yaylalı, Işık Tekin, Özcan Güneş, Simin Rota, **Nuriye Kurbetli**; **Journal of Stroke Medicine 1–6 © 2020 DOI: 10.1177/2516608520938552**; "Relationship Between N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide (NT-Pro BNP) Level, Infarct Type and Infarct Volume in Ischemic Cerebrovascular Disease."

Ek-3 Aygün D, **Kurbetli N**, Akyer Ş.P. "Türkiye'deki Anatomi yayınlarının bibliyometrik analizi" **Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi Temel Tıp Bilimleri Tam Metin Kitabı, 2020.**

Ek-4 Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onam Belgesi.

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Nuriye KURBETLİ

İmza:

ÖZET**CURCUMİN (ZERDEÇAL)'İN PRİMER ASTROGLIAL HÜCRE HATTINDA PENİSİLİN İLE İNDÜKLENEN ASTROSİT STRESİNE – ÖLÜMÜNE (NEKROSİS - APOPTOSİS) KORUYUCU ETKİSİ**

Nuriye KURBETLİ

Doktora Tezi, Anatomi AD.

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER

Temmuz 2021

Epilepsi dünya üzerinde 50 milyondan fazla insanı etkileyen önemli bir hastalıktır. Son yıllarda epilepsi mekanizmasında astrositlerin öne çıkması, hastalığın mekanizmasında ve sonuç olarak antiepileptik ilaç çalışmalarında değişikliklere sebep olmuştur. Genellikle epilepsinin sebebi hippocampus'taki sklerotik alanlar olarak bilinir. Gerçekte astrositler sklerotik dokuda glutamate salınımını başlatırlar. Glutamat çevredeki nöronları heyecanlandırır ve nöbet aktivitesi gerçekleşir. Deneysel epilepside penisilin, epilepsi modelinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılır. Bunların yanında önceki çalışmalar, Curcumin'in uygun konsantrasyonlarda nöron hücrelerini koruyabildiğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, nörodejeneratif hastalıklarda etkisi kanıtlanan Curcumin'in, penisilin tarafından primer astroglial hücre hattında indüklenen astrosit dejenerasyonu üzerindeki protektif etkisini göstermektir. Bu çalışma Curcumin'in penisilin neden olduğu astrosit ölümüne etkisi ile ilgili olan ilk çalışmadır. Bu amaçla, yeni doğan sıçan beyini ekstrakte edildi ve daha sonra mekanik olarak astroglial hücre süspansiyonuna ayrıldı ve son olarak kültür ortamında büyütüldü. Penisilin içermeyen ve 1000 IU penisilin içeren ortamlarda farklı curcumin konsantrasyonları (5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150 µM) kullanıldı. Penisilin astroglial hücrenin canlılığını istatistiki olarak anlamlı şekilde azaltırken, buna karşın curcumin, penisilin primer astroglial hücre hattına yol açtığı hasarı engelleyerek istatistiki olarak anlamlı derecede hücre canlılığını arttırdığı gözlemlendi. Örneklerden elde edilen cDNA'lar ile Bax, Bcl2, CDK6, P21 ve Cyclin D1 seviyeleri, Real-Time PCR cihazı ile ve "Comparative CT" analizi yapılarak belirlendi. Ek olarak Western Blot yöntemi ile p38 MAPK ve fosfo p38 MAPK, c June N terminali (JNK), AMPK alfa 1 ve fosfo AMPK alfa 1, kaspaz 3, asetil coA karboksilaz ve son olarak sitokrom c düzeylerine bakıldı. RT-PCR ve western blot sonuçlarının her ikisinde, penisilin uygulanan hücre hattı ile curcumin uyguladığımız penisilinli hücre hattı grupları arasında mekanizmayı açıklayıcı istatistiki olarak anlamlı farklar bulundu. Hücrenin hayatta kalmasının, curcumin'e kuvvetle bağlı olduğu gösterildi. Gördük ki curcumin potansiyel olarak p38 MAPK ve JNK'yi inhibe ederek hücre canlılığını artırır. Genel olarak, bu çalışma, curcuminin, hastalığın başlaması ve ilerlemesi sırasında gözlenen oksidatif stres, nöroinflamasyon, apoptoz ve astroglial kayıp gibi moleküler ve hücresel değişiklikleri değiştirmedeki potansiyel rollerine ek olarak epileptik nöbet semptomlarını hafifletebileceğini ortaya koymuştur. Curcumin'in epileptik nöbeti önleyen çoklu mekanizmalarıyla birleştirilmiş güvenlik profili, epilepsi tedavisinde bu maddenin umut verici bir yönüdür. Ancak, şu ana kadar mevcut kanıtlar başlangıç niteliğindedir; Epilepside uzun vadeli etkinliğini ve güvenliğini belirlemek için daha ileri klinik öncesi ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuçta; curcumin'in antiepileptik ajan olarak kullanılabilirliğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: curcumin, astrosit, penisilin, sıçan, yenidoğan, beyin, hücre kültürü, hücre ölümü, hücrenin hayatta kalması

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:2019SABE025).

ABSTRACT**PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN (CURCUMA LONGA) ON ASTROCYTE STRESS - DEATH (NECROSIS - APOPTOSIS) IN PRIMARY ASTROGLIAL CELL LINE**

Nuriye KURBETLİ

PhD Thesis in Anatomy

Supervisor: Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER (MD. PhD)

June 2021

Epilepsy is an important disease that affects more than 50 million people around the world. In recent years, the prominence of astrocytes in the mechanism of epilepsy has led to changes in the mechanism of the disease and, consequently, in antiepileptic drug studies. Often the cause of epilepsy is known as sclerotic areas in the hippocampus. In fact, astrocytes initiate the release of glutamate in the sclerotic tissue. Glutamate excites surrounding neurons and seizure activity occurs. In experimental epilepsy, penicillin is widely used to establish the epilepsy model. Besides, previous studies have shown that Curcumin can protect neuron cells at appropriate concentrations. The aim of this study is to show the protective effect of Curcumin, which has been proven to be effective in neurodegenerative diseases, on astrocyte degeneration induced by penicillin in the primary astroglial cell line. This is the first study on the effect of Curcumin on penicillin-induced astrocyte death. For this purpose, newborn rat brain was extracted and then mechanically separated into astroglial cell suspension and finally grown in culture medium. Different curcumin concentrations (5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150 μ M) were used in media without penicillin and containing 1000 IU penicillin. While penicillin statistically significantly decreased the viability of the astroglial cell, curcumin increased the cell viability statistically significantly by preventing the damage caused by penicillin to the primary astroglial cell line. The cDNAs and Bax, Bcl2, CDK6, P21 and Cyclin D1 levels obtained from the samples were determined by Real-Time PCR device and "Comparative CT" analysis. In addition, p38 MAPK and phospho p38 MAPK, c Jun N terminal (JNK), AMPK alpha 1 and phospho AMPK alpha 1, caspase 3, acetyl coA carboxylase and finally cytochrome c levels were measured by Western blot method. In both RT-PCR and western blot results, statistically significant differences were found explaining the mechanism between the penicillin-treated cell line and the curcumin-treated penicillin cell line groups. Cell survival has been shown to be strongly dependent on curcumin. We found that curcumin potentially increases cell viability by inhibiting p38 MAPK and JNK. Overall, this study revealed that curcumin may alleviate epileptic seizure symptoms in addition to its potential roles in modifying molecular and cellular changes such as oxidative stress, neuroinflammation, apoptosis, and astroglial loss observed during disease onset and progression. The safety profile of curcumin combined with its multiple mechanisms of preventing epileptic seizure is a promising aspect of this agent in the treatment of epilepsy. However, the evidence available so far is preliminary; Further preclinical and clinical studies are needed to determine its long-term efficacy and safety in epilepsy. In conclusion, we think that curcumin can be used as an antiepileptic agent.

Keywords: curcumin, astrocyte, penicillin, rat, newborn, brain, cell culture, cell death, cell survival

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 2019SABE025).

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince üzerimde büyük emekleri olan, her türlü sorunla yakından ilgilenerek anlayışla yol gösteren, tezimin planlanmasında ve yürütülmesinde rehberlik eden, bilimsel ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Şahika Pınar Akyer'e,

Doktora eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitimimin yanında tezimin her safhasında katkı ve emekleriyle desteğini gördüğüm, hoşgörü ve desteklerini lisansüstü eğitimimin ilk gününden beri hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR'e

Üzerimde emekleri bulunan, bilgi ve deneyimleri ile bana sağladıkları katkılarından dolayı Anatomi Anabilim Dalındaki değerli Hocalarım Sayın Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL'e, Sayın Doç. Dr. Özgür Barış DÖNMEZ'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR'a,

Her zaman hayatımda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her konuda fikir danışabildiğim, tez deneylerimin yapılmasında ve değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen sevgili Dr. Öğr. Üyesi Huri Bulut'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için deneysel çalışmalarda vermiş olduğu destek ve olanaklar için Sayın Dr. Öğr. Üyesi Onur Tokgün'e,

Deneylerim sırasında yaşadığım bir sorun neticesinde desteğini benden esirgemeyip deneysel çalışmalarımın bir kısmının ISUMKAM araştırma merkezinde tamamlanmasını sağlayan Sayın Prof. Dr. Engin Ulukaya'ya,

Tez çalışmam süresince her anlamda desteklerini gördüğüm, kendi çalışmaları gibi benimle çalışan, dostlukları ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan Arş. Gör. Dr. Danış Aygün'e, Gül Neşet'e, Büşra Çelikkaya'ya ve Kubilay İnci'ye

Çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı sevgili Hilal Şentürk'e,

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam süresince manevi olarak desteklerini hissettiğim sevgili asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her konuda desteklerini benden esirgemeyen, sevgileri ve fedakarlıkları ile bugüne kadar attığım her adımda hep yanımda ve arkamda duran, minnet duyduğum canım aileme,

Doktora eğitimim boyunca sınırsız sabır ve gayret gösteren, her zaman en büyük destekçim olan eşim Oğuzhan Kurbetli'ye

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nuriye KURBETLİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Anatomi.....	4
2.2. Epilepsi.....	5
2.2.1. Epilepsi Oluşumundaki Mekanizmalar.....	8
2.2.2. Deneysel Epilepsi Modelleri.....	9
2.3. Neuroglia Neurobiyolojisi.....	10
2.3.1. Astrositler.....	13
2.3.1.1. Astrositlerin Fonksiyonları.....	14
2.3.2. Astrositler ve Epilepsi.....	15
2.4. Curcumin	17
2.4.1. Curcumin'in Klinik Uygulamaları	18

2.4.2. Curcumin'in Kimyasal Yapısı	20
2.4.3. Curcumin'in Beyin Dokusuna Etkisi	21
2.4.4. Curcumin'in Antiepileptik Etkisi	22
2.5. Hipotez	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
3.1. Deney Hayvanları.....	24
3.2. Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması	24
3.3. Curcumin Dozlarının Hazırlanması.....	26
3.4. Sitotoksosite testi ile hücre canlılığının saptanması.....	26
3.4.1. Sitotoksosite Testi İçin Hazırlık	26
3.4.2. MTT testi uygulaması	27
3.4.3. TUNEL Yöntemi ile Apoptozis Belirlenmesi.....	27
3.4.3.1. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemi.....	28
3.5. RT-PCR Analizi.....	29
3.5.1. Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu	29
3.5.2. cDNA Dönüşümü	29
3.5.3. RT-PCR Analizi	30
3.6. Total protein izolasyonu	31
3.6.1. Bradford Protein Miktar Tayini	31
3.6.2. Western Blot Analizi	32
3.7. İstatistiksel Yöntemler	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Curcumin ve Penisilin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	35
4.2. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi	36

4.3. Apoptozisin Değerlendirilmesi	40
4.4. RT – PCR Verilerinin Değerlendirilmesi	42
4.5. Protein Miktar Analizi Sonuçları	43
4.5.1. Western Blot Deneyi Sonuçları	44
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ.....	64
7. KAYNAKLAR.....	65
8. ÖZGEÇMİŞ.....	76
9. EKLER.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.3. MSS ve PSS'nde bulunan neuroglia tipleri	12
Şekil 2.4: LTP sürecindeki üç parçalı sinaptik model	13
Şekil 2.5. İnsan sklerotik hipokampusunda astrosit benzeri hücreleri içeren, bahsedilen mekanizmaları temsil eden ve değişen fonksiyonel durumlarını gösteren bir şema	17
Şekil 2.6. Curcumin'in kimyasal yapısı	18
Şekil 3.1. Primer Astrosit Hücre Kültürü	25
Şekil 4.1. Curcumin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı	35
Şekil 4.2. Penisilin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı	36
Şekil 4.3. Tüm grupların 72. saatte hücre canlılığı	37
Şekil 4.4 Deneylerde kullanılan grupların 72. saatte hücre canlılığı	37
Şekil 4.5. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Kontrol grubu	38
Şekil 4.6. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Curcumin grubu	38
Şekil 4.7. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Penisilin grubu	39
Şekil 4.8. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Curcumin + Penisilin grubu	39
Şekil 4.9. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Kontrol grubu	40
Şekil 4.10. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Curcumin grubu	41
Şekil 4.11. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Penisilin grubu	41
Şekil. 4.12. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Curcumin + Penisilin grubu	42
Şekil 4.13. RT – PCR deneyi için analizi yapılan genlerin seviyeleri	42
Şekil 4.14. Bradford Deney Sonuçları	44
Şekil 4.15. p38 MAPK düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	44
Şekil 4.16. Gruplar üzerinde p38 MAPK düzeyleri	45
Şekil 4.17. Aktif caspase 3 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	45
Şekil 4.18. Gruplar üzerinde Aktif caspase 3 düzeyleri	46

Şekil 4.19. Asetil CoA Carboxylase düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	46
Şekil 4.20. Gruplar üzerinde Asetil CoA Carboxylase düzeyleri	47
Şekil 4.21. Cytochrome C düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	47
Şekil 4.22. Gruplar üzerinde Ctochrome C düzeyleri	48
Şekil 4.23. JNK 1 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	48
Şekil 4.24. Gruplar üzerinde JNK 1 düzeyleri	49
Şekil 4.25. Phospho AMPK düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	49
Şekil 4.26. Gruplar üzerinde phospho AMPK düzeyleri	50
Şekil 4.27. Phospho-p38 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	50
Şekil 4.28. Gruplar üzerinde Phospho-p38 düzeyleri	51
Şekil 4.29. AMPK Alpha-1 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü	51
Şekil 4.30. Gruplar üzerinde AMPK Alpha-1 düzeyleri	52

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Epilepsideki kanal mutasyonları	8
Tablo 2.2. Farklı Neuroglial Hücrelerin Yapısal Özellikleri, Lokalizasyon ve Fonksiyonları	11
Tablo 3.1. RT – PCR deneylerinde kullanılan primer gen dizileri	31

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

MSS	Merkezi sinir sistemi
EEG	Elektroensefalogram
GABA	Gama aminobütirik asid
Ach	Asetilkolin
PSS	Periferik sinir sistemi
BOS.....	Beyin Omurilik Sıvısı
LTP.....	Long-Term Potentiation (uzun etkili potansiyel)
TLE	Temporal lob epilepsisi
mGluR	Metabotropik glutamat reseptör
CA1	Kornu Ammonis 1
CA2	Kornu Ammonis 2
CA3	Kornu Ammonis 3
CA4	Kornu Ammonis 4
DMSO	Dimetil sülfoksit
COX	Siklooksijenaz
VEGF.....	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
NF _κ B.....	Nuclear Factor kappa B
IL	Interlökin
JAK-1	Janus Kinase 1
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3

C. longa	Curcuma Longa
TBI	Travmatik beyin hasarı
ROS	Reaktif oksidatif türleri
PTZ	Pentilentetrazol
IP.....	İntraperitoneal
IU	İnternational unit
C5	Curcumin 5 mikromolar
C10	Curcumin 10 mikromolar
C20	Curcumin 20 mikromolar
C25	Curcumin 25 mikromolar
C50	Curcumin 50 mikromolar
C75	Curcumin 75 mikromolar
C100	Curcumin 100 mikromolar
C150	Curcumin 150 mikromolar
JNK.....	c-Jun N-terminal kinaz
KBB.....	Kan beyin bariyeri
Kg.....	Kilogram
Mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
FBS	Fetal Bovine Serum
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
PBS.....	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
MTLE	Orta temporal lob epilepsisi
PTLE	Paradoksal temporal lob epilepsisi
EAAT	Uyarıcı Amino Asit Taşıyıcı
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit sentaz
SOD	Süperoksit dismutaz

GFAP	Glial fibriler asidik protein
MDA	Malondialdehit
Bcl2.....	B hücreli lenfoma 2
VDAC	Mitokondriyal voltaja bağlı anyon kanalı
STZ.....	Streptozotosin
CDK6.....	Protein kinaz 6
CDK	Sikline bağımlı kinaz
HCN	Siklik nükleotid kapılı kanal voltajı
ANI	Anizomisin
OGD	Oksijen-glukoz deprivasyonunda
AMPK	Aktif protein kinaz
ACC	Asetil-KoA karboksilaz
BC	Biotin karboksilaz
CT	Karboksiltransferaz

1. GİRİŞ

Epilepsi Yunanca 'kavramak, yakalamak, ele geçirmek' anlamına gelir. 'Epi' üstünde, üstünden, 'lipis' tutmak, tutup sarmak" kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Nöbet sözcüğü için İngilizce tutmak, yakalamak, ele geçirmek anlamındaki 'to seize' fiilinden türetilen 'seizure' kelimesi kullanılmaktadır (Swaiman KS 2005).

Epilepsi; epileptik nöbetler ortaya çıkarmaya meyilli bir beyin yapısı ve bunun yol açtığı nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçlarla karakterize bir beyin hastalığıdır. Epilepsi, tıpkı kanser gibi, tek bir hastalık bütünü değildir; beynin normal fonksiyonlarında bozulmaya yol açan, pek çok farklı sebepten kaynaklanabilen, birbirinden farklı nöbetlerle karakterize tabloların genel adıdır. Epilepsi nöbeti beyinde meydana gelen, normal olmayan aşırı veya senkronize aktiviteden kaynaklanan, geçici belirtiler ve/veya semptomlardır (Fisher, Boas et al. 2005).

Astrositler beyinde destekleyici ve homeostatik bir işlev sağlarlar ve birbirleriyle kimyasal sinyal yoluyla iletişim kurarlar. Astrositler, nöronlar arasındaki bilgi aktarımını algılar ve kontrol eder.

Astrositler nöronları çevreleyen hücre dışı boşlukta uygun iyon ve nörotransmitter seviyelerini korumak için hücre dışı boşluktan iyonları ve nörotransmitterleri hücreye taşır. Bu işlevler, elektriksel uyarıları ateşlemek ve sinaptik iletim yoluyla iletişim kuran nöronların zar potansiyelini korumak için gereklidir. Astrosit popülasyonları arasında hücreler arası bağlantı geçitleri yardımı ile gerçekleşen hücreler arası çiftleşme, elektrik yükü taşıyan aksonlar tarafından salınan potasyum iyonlarını "sifonlar" ve kan akışına karışıp boşaltımı yapılması için astrositik ağa gönderir. Astrositlerin bir diğer görevi de laktat ve glikoz vererek nöronlara fiziksel ve metabolik destek sağlamaktır (Marieb 1936/2017).

Astrositler, hem glukoz hem de glutamattaki benzersiz bozunmaları yoluyla beynin metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır (Hertz, Dringen et al. 1999). Astrositin bu süreçlerdeki önemi, normalde nöronlarda bulunmayan bazı anahtar enzimlere sahip olmasında yatar.

Epilepsi ile ilgili olarak insanlar üzerinde yapılabilecek çalışmalar sınırlıdır. Özellikle de hastalığın temeline yönelik incelemeler hayvan deneylerini zorunlu hale

getirmektedir. Bu çalışmalar için çeşitli hayvan epilepsi modelleri geliştirilmiştir (Alonso-deFlorida and Delgado 1958, Marangoz 1997, Kobow, El-Osta et al. 2013). Deneysel epilepsi modelleri, konvülzan etki yapan ilaçlar, GABA'erjik antagonistler, nörotoksinler ve lezyon uygulamaları ile ortaya çıkarılabilir. Penisilin kaynaklı deneysel epilepsi modeli bu modeller içerisinde yaygın kullanılanlardan birisidir (Marangoz 1997)

Curcuma longa rizomlarından türetilen ve zerdeçal olarak bilinen Curcumin, polifenolik bir moleküldür; biyoaktif bir bileşiktir ve vücudun farklı merkezi sinir sistemi bozukluklarında, özellikle prelinik çalışmalarda faydalıdır (Morales, Cerda-Troncoso et al. 2017, Shen, Wei et al. 2017, Wang, Liu et al. 2017). Oldukça lipofilik olan bu molekül, kendi başına veya farklı formülasyonlarda kan-beyin bariyerini aşabilir (Chiu, Lui et al. 2011, Zhang, Tian et al. 2014). Beyinde kaldığı süre boyunca farklı büyüme ve transkripsiyon faktörlerini, enzimleri ve sitokinleri etkilediği bilinmektedir fakat nöroprotektif etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir (Aggarwal, Sundaram et al. 2007).

Klinik öncesi çalışmalar, curcumin'in epilepsi bozukluklarının tedavisi için yararlı etkisini göstermiştir. Molekül, akut ve kronik epilepsinin kimyasal ve elektriksel modelleri dahil olmak üzere klinik öncesi çalışmalarda anti-nöbet potansiyeline sahiptir (Bharal, Sahaya et al. 2008, Jyoti, Sethi et al. 2009, Mehla, Reeta et al. 2010, Choudhary, Mishra et al. 2013).

Çalışmamızda curcumin'in penisilin ile indüklenmiş astrosit hücre hattında protektif etkisini göstermek istedik. Deneysel epilepsi modellerinden penisilinle oluşturulan modeli primer astrosit hücre hattına uygulayarak bir epilepsi mekanizması oluşturduk. Curcumin temporal lob epilepsi modelinde spontan tekrarlayan nöbet şiddetini azalttığı için anti-epileptojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (de Lanerolle and Lee 2005). Curcumin'in ayrıca antioksidan ve anti-enflamatuar yapısının da gözlenen anti-nöbet etkilerinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Fakat kesin mekanizma net değildir. Curcumin, biyoyararlanım sorunları çözülürse epilepsi bozukluğu olan hastalarda faydalı olabilir.

1.1 Amaç

Epilepsi hastalığı yaşam kalitesini düşüren kronik süreçli nörolojik bir hastalıktır. Curcumin'in nöronlar üzerindeki etki mekanizmasında glial hücreler de rol almaktadır. Literatürde curcumin'in epileptik sıçan korteksinde glial aktivasyonu belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bizim amacımız primer astroglial hücre hattında penisilin tarafından indüklenen astrosit hücre ölümü üzerine farklı konsantrasyonlarda curcumin

etkisinin gösterilmesi ve penisilin epilepsi modellerinin hücre kültürü düzeyinde yaptığı dejenerasyon ve hücre kaybı mekanizmasını kullanarak curcumin'in epilepsi mekanizması oluşturulmuş primer kortikal astrosit hücrelerindeki etkilerini incelemektir. Böylece curcumin'in antiepileptik ve biyolojik etkisinin moleküler mekanizması açıklanarak literatüre katkı sağlanacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Anatomi

Merkezi sinir sistemi (MSS), beyin ve medulla spinalis'den oluşur. Beyin ve medulla spinalis, periferden merkeze ve merkezden periferine doğru olan inanılmaz sayıdaki impulsların bağlantısını ve yönlendirilmesini gerçekleştirmesi açısından, birçok kişi tarafından, birbirine bağlı ağ olarak çalışan bilgisayarların "bulut" sistemine benzetilmektedir. Bu tür benzetmeler medulla spinalis'in bazı çalışmalarını açıklayabilmesine rağmen, insan beyninin harika karmaşasını tam anlamıyla ifade edememektedir. Bizler beyni gelişmiş biyolojik bir organ olarak da etkileyici bir bilgisayar ağı olarak da görsek veya basitçe bir mucize olarak düşünsük de bilinen en şaşırtıcı yapı olduğu oldukça açıktır.

Beynin sıradan görüntüsü bize onun olağanüstü yetenekleri ile ilgili bazı ipuçları vermektedir. Beyin iki avuç dolusu, pembe gri renkli, ceviz gibi yüzeyi girintili çıkıntılı, soğuk yulaf ezmesi kıvamında bir dokudur. Ortalama yetişkin bir insan beyni yaklaşık 1500 gram kadardır (Marieb 1936/2017).

Normal beyin fonksiyonları nöronların sürekli elektriksel aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Elektroensefalogram veya EEG bu tip aktiviteleri bazı açılardan kaydetmektedir. EEG saçlı deri üzerine elektrodların yerleştirilmesiyle ve bu elektrodların değişik kortikal bölgeler arasındaki voltaj farklarını ölçen bir cihaza bağlanması ile yapılmaktadır. Kaydedilen nöronal elektriksel aktiviteler beyin dalgaları olarak adlandırılmakta ve bu dalgalar substantia alba'daki aksiyon potansiyellerinden daha çok cortex yüzeyindeki sinaptik aktivitelerden kaynaklanmaktadır. Her birey parmak izlerinde olduğu gibi benzersiz beyin dalgası modeline sahiptir (Netter 2013).

Beyin dalgaları yaş, duyu uyarıları, beyin hastalıkları ve vücudun kimyasal durumuna bağlı olarak değişiklik göstermektedirler. EEG, epilepsi, uyku bozuklukları tanısında ve beyin fonksiyonu araştırmalarında kullanılmaktadır. Beyin dalgalarının frekanslarının çok yüksek veya çok düşük olması cortex cerebri fonksiyonlarında

meydana gelen problemleri düşündürmektedir ve her iki aşırı durumda da bilinçsizlik durumu mevcuttur. Spontan beyin dalgaları bilinç kapanması veya koma durumlarında bile olduğundan dolayı beyin dalgalarının olmaması beyin ölümünün klinik kanıtıdır (Marieb 1936/2017).

2.2. Epilepsi

Epilepsi, Dünya Sağlık Örgütü tarafından birçok etyolojik sebebi olan kronik serebral fonksiyon bozukluğu sonucunda görülen tekrarlayıcı nöbetler olarak tanımlanmıştır (Brodie and French 2000). Epilepsiler, paroksizmal serebral disritmi, nöbetler ve konvülsiyonlar ile karakterize, insan yaşamını mental ve fiziksel olarak olumsuz etkileyen, merkezi sinir sistemi bozukluklarının heterojen bir grubu olup, genel prevalansı %0,5 – 1 olarak kabul edilmektedir. Bunlar dünya çapında 65 milyon insanı etkileyen en yaygın epizodik beyin hastalıklarıdır (Patel, Acharya et al. 2020).

Epilepsi nörolojik hastalıklar arasında çocukluk ve ergenlik çağında en sık, yetişkinlerde ise nörovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ikinci hastalık olarak belirtilmektedir. Üçüncü dünya ülkelerinde ve birinci dünya ülkelerinin bazı bölgelerinde görülme oranı iki katına kadar çıkmaktadır (Andreoli TE 2000).

Epilepsi'nin tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. İslam'dan önce Şaman'ın (kam/baksı) yanısıra, o dönemde hekim rolünü üstlenmiş Otacı adı verilen kişiler de bitkisel ve hayvansal ürünler, bazı tuzlar ve metallere yararlanarak hastalıkları iyileştirmeye ve önlemeye çalışmıştır. Ayrıca, Altay Şamanları arasında epilepsi hastalarına İrımıcı dendiği ve bu kişiler nöbet geçirdiğinde gaipten haber verdiklerine inanıldığı bildirilmektedir. Divanü Lûgat-it Türk'te (XI. yy) Talgan-ig sözcüğü saranın karşılığı olarak ifade edilmektedir. Türkler İslam'ı kabul ettikten sonra XIV. yy sonları ve XV. yy'da Anadolu'da Türkçe yayınlanmış tıp kitaplarında epilepsiye önemli yer ayrıldığı ve bunlarda genellikle Galen'in, Dioskorides'in ve İbn-i Sina'nın etkileri olduğu görülmektedir. Bu eserlerde epilepsinin başa (beyne) ait hastalıklar arasında incelendiği ve tedavisinde genel olarak mistik olmayan (seküler) yaklaşımların yer aldığı belirtilmektedir. Ayrıca "sara" sözcüğünün Türklerdeki karşılığının uçuk veya tutarık olması dikkat çekmektedir. XIX. yy ikinci yarısından itibaren Türk tıbbında epilepsiye yaklaşımda batıdaki değişikliklerin izlendiği görülmektedir (Eşkazan 2004).

Epilepsi, ilk kez İbni Sina tarafından tıp terminolojisinde yer almıştır. İbni Sina 'Epileptik nöbet beyinden kaynaklanır, duyuların kaybı ve düşme olur.' şeklinde epilepsiyi tarif etmiştir (Naderi, Acar et al. 2003). Eski çağlarda ise bu hastalığın Tanrı tarafından gönderilen bir hastalık olduğu düşünülmüştür.

Epilepsi terimi ilk defa 1874 yılında Jackson tarafından “epilepsi gri maddenin zaman zaman ortaya çıkan ani, aşırı hızlı ve lokal boşalmalarının adıdır” şeklinde betimlenmiştir (Jackson 1958). 1920 yılında Hans Berger’in ilk kez elektroensefalogram (EEG) kullanması ile epileptik nöbetler anlaşılmaya başlanmıştır (Berger 1929).

Epilepsi hastası olan bir kişi hiçbir uyarı olmadan kontrolsüz kasılmalar nedeniyle bilincini kaybederek yere düşebilir. Epileptik nöbetler bir grup nöronun elektriksel deşarjından dolayı oluşmaktadırlar ve kontrol altına alınmadıkları sürece diğer mesajların iletilmemesine yol açarlar (Netter 2013).

Epileptik bir nöbet, beyindeki anormal aşırı nöronal aktiviteden dolayı oluşan geçici semptomlara verilen addır. Epilepsi, nörobiyolojik, kognitif, psikolojik ve sosyal sonuçları olan ve epileptik nöbetler oluşturmaya kalıcı bir yatkınlık gösteren bir hastalıktır. Epilepsi tanımı için en az bir epileptik nöbet ortaya çıkmalıdır (Fisher, Boas et al. 2005). Epileptogenezis, spontan nöbetlerin oluşmasına neden olan moleküler ve hücrel değişiklikler kaskadının tetiklenmesi ile sonuçlanan beyin hasarı sürecini ifade etmektedir (Pitkänen and Lukasiuk 2009). Nöbetler epilepside karakteristik olan sürekli tekrar eden nöbetli hastalıklardan kaynaklanabileceği gibi; hipoglisemi, hiponatremi ve beyin metabolizmasındaki bunlara benzer geçici değişikliklere bağlı da oluşabilmektedir. Nöbet oluşumuna yol açan yaygın faktörler; metabolik anormallikler (hipoglisemi ve hiperglisemi, hiponatremi, hipokalsemi vs.), alkol yoksunluğu, akut nörolojik hasar (menenjit, ensefalit gibi enfeksiyonlar, inme, kafa travması), teofilin, trisiklik antidepresanlar gibi nöbet eşiğini düşüren ilaçlar ve çocuklarda yüksek ateştir. Epilepsiye yatkın serebral nöronların fonksiyonunun veya yapısının (makroskopik veya mikroskopik) değişmesine neden olan herhangi bir süreç epilepsiye eğilimi artırmaktadır. Epilepsiye sebep olabilen bazı yapısal beyin hastalıklarını konjenital (heterotopiler, kortikal displazi), dejeneratif (Alzheimer hastalığı), enfeksiyöz (menenjit, ensefalit, abse), travma, tümör, vasküler hastalıklar(vasküler malformasyon, inme, subaraknoid hemoraji) şeklinde özetleyebiliriz (Shneker and Fountain 2003).

Epilepsi her yüz kişiden birinde herhangi bir entellektüel bozukluk olmadan veya oluşturmada görülebilmektedir. Genetik faktörler önemli rol oynasa da kafa travmalarının, inmenin, enfeksiyonların veya tümörlerin sonucu olarak da epilepsi gözlenebilmektedir (EE Altay 1999).

Epileptik nöbetler görülme şekilleri veya ciddiyetlerine göre çok büyük farklılıklar gösterirler. *Absans nöbetler*, genel olarak *petit mal* olarak da bilinen bu nöbetler, birkaç saniye bilinç kaybıyla birlikte görülebilen hafif bir formdur. Tipik olarak küçük çocuklarda gözlenmekte ve sıklıkla 10 yaş civarında kaybolmaktadırlar. *Tonik-klonik nöbetler*, genel olarak *grand mal* olarak bilinen bu nöbetler epileptik nöbetlerin daha şiddetli ve konvulsif formudur. Etkilenen kişi bilincini kaybeder, sıklıkla yoğun kasılmalar sırasında kemikleri

kırılabilmekte, kas kontraksiyonları en sert şekli ile gözlenebilmektedir. Bu nöbet tipinde bağırsak ve mesane kontrolünün kaybı ve dilin ciddi ısırılması sık gözlenmektedir. Nöbetin süresi birkaç dakikadır ve ardından kaslar gevşer, etkilenen kişi uyanır ancak takip eden birkaç dakika boyunca kişinin oryantasyonu bozuktur (Netter 2013).

Epileptik nöbet geçirenlerin çoğu nöbet başlamadan önce tat, koku, ışık çakmaları gibi sensoriyal halüsinasyonlar deneyimlemektedir. Bu fenomen "aura" olarak adlandırılmakta ve kişiye yere uzanarak zemine düşmekten korunmak için zaman kazandırmaktadır. Yunanca'da "hava", Latince'de "esinti" anlamına gelen Aura; antik çağda Galen'in hocası Pelops tarafından damarlardaki kandan başa yayılan his olarak tanımlanmıştır. Galen ekolünü benimseyen bilimciler aurayı epileptik atakların geleceğini haber veren periferik bir his olarak tanımlamayı sürdürmüşlerdir. Aura hasta tarafından, nöbetten sonra tanımlanan retrospektif bir histir, gözlenebilir bulguları yoktur (Epilepsy 1981).

Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneğinin (International League Against Epilepsy – ILAE) uzun yıllar süren çalışmaları sonucunda, 1989 yılında epilepsi ve epileptik sendromlar; nöbet tipi, etyolojisi, nöbeti uyaran faktörler, başlangıç yaşı, tedavi seçimi gibi faktörleri de kapsayacak şekilde yeniden sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamada iki ana grup bulunmaktadır. İlk gruptaki epileptik sendromlar jeneralize epilepsileri, diğer grupta ise lokalizasyonla ilişkili epilepsileri içermektedir. Gerek jeneralize gerekse lokalizasyonla ilişkili epilepsiler kendi içlerinde nedene yönelik olarak idiyopatik (primer), semptomatik veya kriptojenik olarak ayrılırlar. İdiyopatik epilepsilerde herediter yatkınlık dışında altta yatan herhangi bir patolojik süreç yoktur. Semptomatik epilepsilerin ise bilinen veya şüphelenilen bir merkezi sinir sistemi bozukluğuna bağlı olarak geliştiği kabul edilir. Semptomatik olduğu düşünüldüğü halde sebebi bulunamayan epilepsilere de kriptojenik epilepsiler denir (Epilepsies and Syndromes 1989).

Epilepsi sıklıkla antiepileptik ilaçlarla kontrol altına alınabilmektedir. İlaçların nöbetleri engellemekte yetersiz kaldıkları durumlarda vagus sinir stimulatörü veya derin beyin stimulatörü uygulaması yapılabilmektedir. Bu cihazlar beynin elektriksel aktivitesini stabilize edebilmek amacı ile n. vagus'a veya direkt olarak beyine belirli aralıklarla akım vermektedirler. Devam etmekte olan araştırmalarda elektrotların beyne yerleştirilerek nöbetlerin öngörülmesi ve gelecek olan nöbetlerden kişinin korunması planlanmaktadır.

2.2.1. Epilepsi Oluşumundaki Mekanizmalar

Epileptogenezden sorumlu hücrel mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Epilepsi nöbetlerinin tümünde aynı mekanizmadan söz edilmez, fakat hepsinde artmış nöronal uyarılabilirlik ve senkronite gibi ortak özellikler mevcuttur.

Epileptojenik odak adını verdiğimiz beyin bölgelerindeki hücreler tam açıklanamayan nedenlerle artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler ve etraflarındaki normal hücreleri de bu duruma ortak ederler (Baykan, Gürses et al. 2004). Bazı epileptik sendromlarda genetik faktörlerin rolü gösterilmiştir. Örneğin, gen mutasyonları anormal iyonik kanal fonksiyonlarına yol açabilmekte ve anormal ağ bağlantılarını fazladan etkileyebilmektedir (Stafstrom 2006). Fakat monogenetik kalıtım şekilleri tanımlananlar (otozomal X'e bağlı, mitokondrial) hariç tutulursa, genetik analizler, fenotipik ve genotipik heterojenitenin işe karışması nedeniyle, epileptik sendromların kalıtım özelliklerini açıklamakta çoğu kez yetersiz kalmaktadır (Stafstrom 2009). Birçok epileptik durum için kompleks veya poligenik kalıtım söz konusudur. Tek gen epilepsilerinin çoğu, nöronal iyon kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Tablo 2.1) (Abad, Vilaplana et al. 2007). İyon kanallarındaki mutasyonlar eksitator ve inhibitör nörotransmisyonun etkinliğinin değişmesine yol açmakta; bunun sonucunda eksitator nörotransmisyonun artmasına ya da inhibitör fonksiyonun kaybına neden olmaktadır. İyon kanallarının dışında GABAerjik sisteme ait genetik bozukluklar da tespit edilmiştir. γ -aminobütirik asid (GABA) beyindeki nöronal eksitabilitenin ana inhibitörüdür, bu etkisini GABA_A ve GABA_B reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Kang and Macdonald 2009).

Tablo 2.1. Epilepsideki kanal mutasyonları

İyon Kanalı	Gen	Fenotip	Kalıtım
Sodyum	SCN1B	GEFS+	Tek gen
	SCN1A	GEFS+/SMEI	Tek gen
	SCN2A	BFNIC	Tek gen
Potasyum	KCNQ2	BFNIC	Tek gen
	KCNQ3	BFNIC	Tek gen
	KCND2	mTLE	Bilinmiyor
Klor	CLCN2	IGE	Tek gen
Kalsiyum	CACNA1A	CPS, GTCS	Tek gen
	CACNA1H	CAE, IGE	Kompleks
	CACNB4	IGE	Kompleks
Asetilkolin reseptörü	CHRNA4	ADNFLE	Tek gen
	CHRNA2	ADNFLE	Tek gen
	CHRN2	ADNFLE	Tek gen
GABA reseptörü	GABRG2	CAE/GEFS+FS	Tek gen
	GABRA1	ADJME,CAE	Tek gen

(ADNFLE: Otozomal dominant nokturnal frontal lobe epilepsi, BFNC: Benign ailesel neonatal konvulsyonlar, BFNIC: benign ailesel infantil konvulsyonlar, GEFS+: Febril nöbetli jeneralize epilepsi, SMEI: Süt çocukluğu dönemi şiddetli miyoklonik epilepsi, CPS: Kompleks parsiyel nöbetler, GTCS: Jeneralize tonik klonik nöbetler, mTLE: Mesial temporal lobe epilepsisi, ADJME: Otozomal dominant juvenil miyoklonik epilepsi, CAE: Çocukluk çağı absans epilepsisi)

Sekonder epilepsi sendromlarında glutamaterjik sistem önemli bir yer tutmaktadır. Birçok epilepsi çeşidinin aşırı glutamaterjik sinaptik iletim bozukluğundan kaynaklanabileceği öngörülmektedir (Alexander and Godwin 2006). Glutamat, beyindeki en önemli eksitator nörotransmitterdir (Moldrich, Chapman et al. 2003). Glutamatın veya

iyonotropik glutamat reseptör agonistlerinin, beyin kesitlerinde ve hayvanlarda konvulsif ve nonkonvulsif nöbetlere neden olduğu bildirilmektedir. Üstelik epilepsili hastalardaki gibi epileptik havyan modellerinde de glutamat ve aspartatın düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Moldrich, Chapman et al. 2003).

Temporal lob yapıları, özellikle hipokampus, amigdala ve piriform korteks, nöbet oluşturan veya epileptogenezisi tetikleyen beyin hasarına en duyarlı olan beyin yapılarıdır (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). Hipokampus, medial septal alandan yoğun kolinerjik impulslar almaktadır. Hipokampal dilimlerde de muskarinik asetilkolin (Ach) reseptörlerinin aktivasyonunun senkronize nöronal boşalım paterni oluşturduğu gösterilmiştir. Nikotinik Ach reseptör aktivasyonunun hem eksitatör hem de inhibitör modülatörleri etkileyebileceği öne sürülmektedir. Nörokimyasal deliller presinaptik Ach reseptörlerinin aktivasyonunun, Ach, GABA ve glutamat gibi nörotransmitterlerin salınımını arttıracaklarını göstermektedir (Roshan-Milani, Ferrigan et al. 2003). Entorinal korteks, bazal ön beyinden gelen zengin kolinerjik innervasyona sahiptir. Son zamanlarda klinik ve deneysel veriler entorinal korteksdeki kolinerjik aktivitenin epileptiform boşalımları devam ettirebileceğine ve artırabileceğine dikkat çekmektedir. Kolinerjik modülasyondaki değişikliklerin epileptik temporal korteksde nöbetleri başlatabileceği de belirtilmiştir. Birçok araştırmacı tarafından kolinerjik baskılanmayı takiben, artmış bir nöbet hassasiyeti veya artmış bir hipokampal nöbet aktivitesi bulunmuştur. (Kokaia, Ferencz et al. 1996, Ferencz, Kokaia et al. 1997, Silveira, Holmes et al. 2000, Ferencz, Leanza et al. 2001, Craig, Hong et al. 2008, Zimmerman, Njunting et al. 2008).

2.2.2. Deneysel Epilepsi Modelleri

İnsanlar üzerinde epilepsi ile ilgili yapılabilecek çalışmalar sınırlıdır. Epilepsinin fizyolojik temellerini aydınlatmak ve daha etkin tedavi yolları bulabilmek amacıyla hayvanlar üzerinde oluşturulan deneysel epilepsi modelleri kullanılmıştır. Deneysel bir epilepsi modelinde bulunması gereken özellikler şu şekildedir (Lösher 1994)

- 1- Nöbetler spontan şekilde tekrarlayabilmelidir.
- 2- İnsanlardaki epilepsi çeşitleri ile benzer olmalıdır.
- 3- Modeldeki EEG' nin biçimi, kullanılan epilepsi'ye benzemelidir.
- 4- Nöbetlerin frekansı, ilaçların etkisini akut veya kronik açıdan test etmeye yetecek ölçüde olmalıdır.
- 5- Antiepileptik ilaçların farmakokinetiği insanlardaki farmakokinetiğe benzer olmalıdır.
- 6- Antiepileptiklerin etkili olduğu plazma ve beyin seviyeleri, insanda ilgili nöbeti

önleyen seviye kadar olmalıdır.

Epilepsi çalışmalarında çok sayıda deneysel modelden faydalanılmaktadır. Bunun sebepleri; modeli oluşturacak klinik nöbetlerin çeşitliliği, modellerin klinik epilepsiyle tamamen aynı olmaması, çeşitli modellerden elde edilen sonuçların karşılaştırılarak test edilmesi ve geliştirilen yeni metodlara ve yeni şartlara daha uygun yeni modeller oluşturulması gerekliliğidir (Lösher 1994)

Çeşitli dozlarda birçok konvülsif ajanla (pentilenetrazol, bikukulin, pikrotoksin, penisilin vb.), elektro şoklarla, ses ve ışık gibi fiziksel uyarılarla veya genetik olarak epilepsiye yatkın hayvanlar kullanılarak epileptik modeller meydana getirilebilmektedir. Deneysel hayvanlarında, konvülsan bir madde korteksin yüzeyine tatbik edilerek epileptik bir odak meydana getirilebilir. Bu maksatla çok kullanılan maddelerden birisi de kristalize penisilindir (Marangoz 1997, Engel 2006)

Bikukulin'e (Pikrotoksin, GABAA-reseptörlerini bloke eder) yapısal olarak benzeyen ve GABA sistemiyle etkileşerek epileptik aktivite oluşmasını sağlayan penisilin, bu etkisini hem sistemik hem de lokal olarak sağlamaktadır (McCandless 1992, Walden, Straub et al. 1992, Marangoz 1997)

Muhtemelen penisilin GABA'nın etkisini bloklayarak epileptiform aktiviteye sebep olmaktadır. Penisilin *in vitro* hipokampus dilimlerinde inhibitör postsinaptik potansiyelleri önlemekte; asetilkolinin uyarıcı etkisini ve presinaptik uçlardan asetilkolin salgısını artırmaktadır. Penisilin korteks dilimlerinden glutamat salgısını artırdığı da bildirilmiştir. Ayrıca, penisilin parasinaptik yollardan ve kalsiyum üzerinden de etki ederek börs aktivitesine yol açabileceği tespit edilmiştir (Marangoz 1997).

2.3. Neuroglia Neurobiyolojisi

Neuroglia veya glial hücreler, homeostazı sürdüren, miyelini oluşturan, MSS ve periferik sinir sistemlerinde (PSS) nöronlar için destek ve koruma sağlayan neuronal olmayan hücrelerdir. Neuroglia'nın nöro iletimde herhangi bir rol oynamadığına uzun süredir inanılıyordu, ancak son gelişmeler, neuroglia'nın sinaps oluşumu ve sürdürülmesinde anahtar bir rol oynadığını göstermiştir.

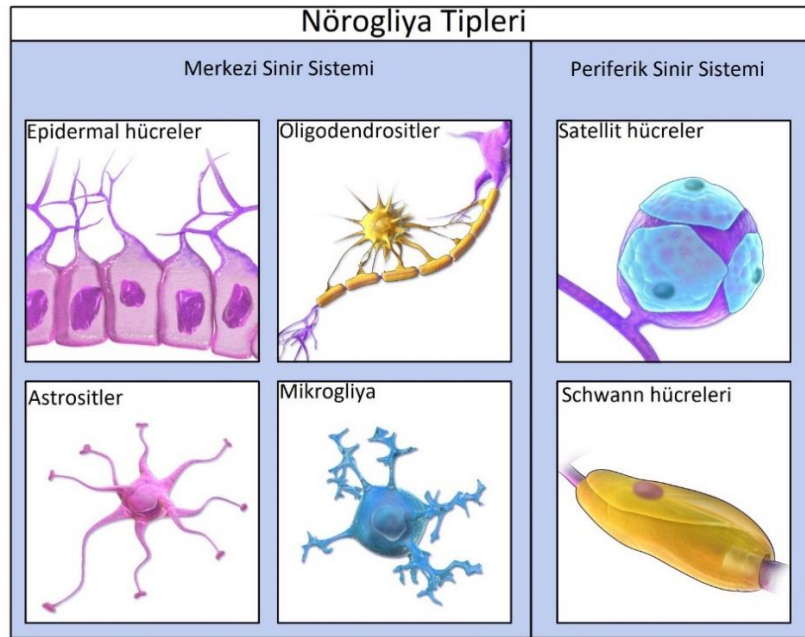
Neuronların aksine neuroglial hücreler uyarılamazlar, aksonları ve üzerlerinde sinaps yapan akson terminalleri yoktur. Neuronlardan daha küçük ve onların 5-10 katı fazla sayıdadır; beyin ve medulla spinalis'in total hacminin yarısı kadarını oluştururlar.

MSS'nde 4 tip neuroglial hücre vardır: (1) astrositler, (2) oligodendrositler, (3) mikrogliya, (4) ependima. Neuroglial hücrelerin yapısal özellikleri, lokalizasyon ve

fonksiyonlarının bir özeti Tablo 2.3'te verilmektedir. Şekil 2.2'de ise tipleri gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Farklı Neuroglial Hücrelerin Yapısal Özellikleri, Lokalizasyon ve Fonksiyonları

Neuroglial Hücre	Yapı	Yerleşim	Fonksiyon
Astroditler			
• <i>Fibröz</i>	Küçük hücre gövdesi, uzun silindirik uzantılar, sitoplazmik filamentler, perivasküler ayak	Substantia alba	Destekleyici çatı sağlamak, elektriksel izolatör olmak, nörotransmitterlerin yayılımını sınırlamak, K ⁺ iyonlarını tutmak, fagositik bir fonksiyona sahip olmak, ölen nöronların yerini almak, metabolitler ve hammaddeler için bir kanal oluşturmak, trofik maddeler üretmek
• <i>Protoplazmik</i>	Küçük hücre gövdesi, kısa kalın uzantılar, çok sayıda dal, az sayıda sitoplazmik filament, perivasküler ayak	Substantia grisea	
Oligodendrosit	Küçük hücre gövdesi, az sayıda ince uzantı, sitoplazmik filamentlerden yoksun	Miyelinli sinirler boyunca sıralar halinde, nöron hücre gövdeleri çevresinde	MSS'deki miyelini oluşturmak, nöronların biyokimyasını etkilemek
Mikroglia	Nöroglial hücrelerin en küçükleri, dikensi çıkıntıları olan dalgalı uzantılar	Bütün MSS'de yaygın	Normal MSS'de inaktif, hastalıkta çoğalır, monositlerle birlikte fagositioz
Ependima			
• <i>Ependimositler</i>	Şekli küboidal veya prizmatik, silya ve mikrovillili, junction'lar	Ventrikülleri, Canalis centralis'i döşer	BOS sirkülasyonu, BOS absorbe etme
• <i>Tanisitler</i>	Kapillerler üzerinde sonlanan uzun bazal uzantılar	Ventriculus tertius tabanını döşer	BOS'tan hipofizeoportal sisteme madde transportu
• <i>Koroidal epitel hücreleri</i>	Yan ve bazal yüzlerde katlantılar, tight junction'lar	Plexus choroideus'ların yüzeyini örter	BOS üretmek ve salgılamak



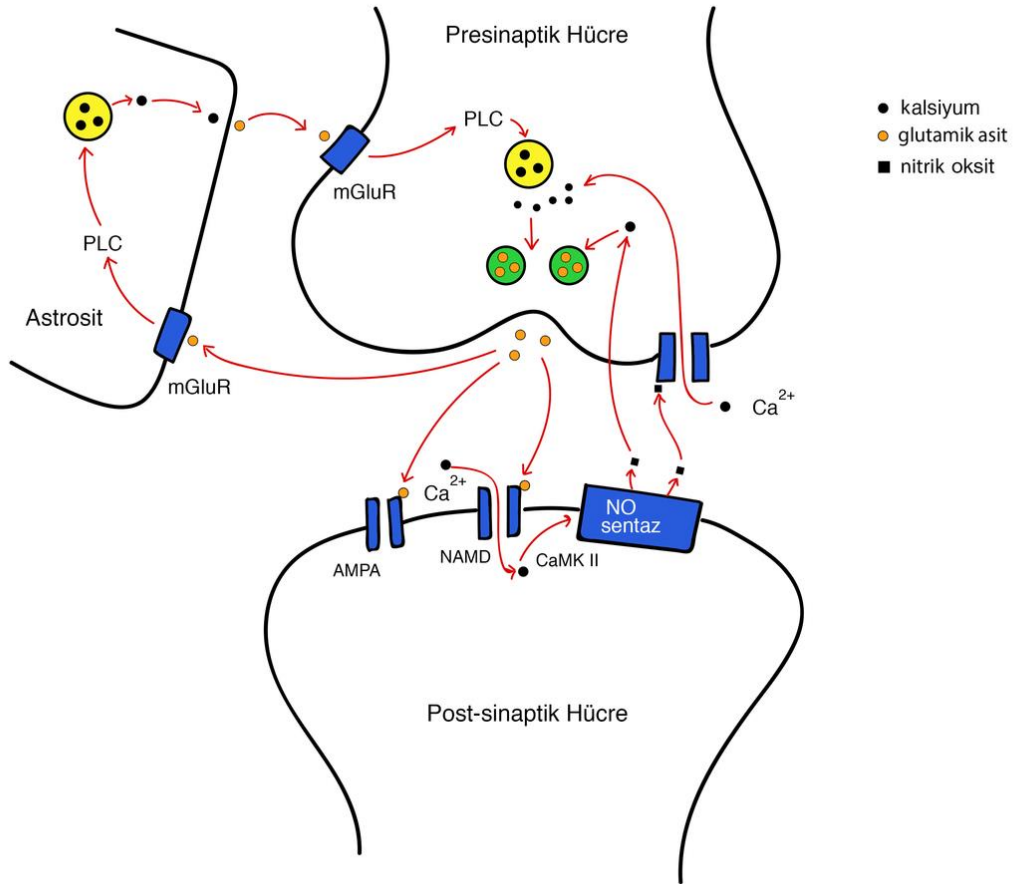
Şekil 2.3. MSS ve PSS'nde bulunan neuroglia tipleri.

Neuroglia hücrelerinin, bilişsel süreçlerin oluşumu ve öğrenmede etkin olan sinaptik bağlantıdaki rolü ancak son yıllarda ele alınmaya başlanmıştır. Bu çerçevede bu konuya yönelik yürütülen çalışmalar ağırlıklı olarak deneyseldir. Ancak neuroglia ve sinir hücreleri arasındaki sinyal iletişimine dair kimi süreçler deneysel olarak incelenememektedir.

19. yüzyılda yaş ile beyindeki nöron sayısının artmadığı, sadece nöronlar arasındaki haberleşmenin ve iletişimin kuvvetlendiği belirtilmiştir (Cajal 1894). Daha sonraki çalışmalarda, birlikte ateşlenen nöronlar arasındaki sinaptik bağlantının kuvvetlendiği bildirilmiştir (Hebb 1949). Günümüzde Hebbian öğrenme kuralı olarak bilinen bu mekanizma; hücrelerin, haberleşme kabiliyetlerini arttırmak için yeni sinaptik bağlantılar geliştirdiği veya birtakım metabolik değişikliklere uğradığı temeline dayanır. 1966 yılında Terje Lømo tarafından geliştirilmiş olan uzun süreli güçlenme (long-term potentiation, kısaca: LTP) sinapslardaki bu tür değişiklikleri ele almaktadır (Tewari and Majumdar 2012).

LTP, kısa ve yüksek frekanslı bir uyarılmayı takip eden sinaptik tepkideki uzun süreli artış olarak tanımlanır. Bu açıdan bakıldığında LTP aslında Hebbian kuralına benzemektedir; zayıf uyarıcı tetiklemeler bu mekanizmayı kendi başına harekete geçirmek için yeterli olmaz iken birçok aksonun eşzamanlı sinyal iletmesi için gerekli eşik değerini sağlamak suretiyle LTP'yi başlatır, ve bu durum aslında sinyallerin pekişimli olarak etki ettiğini göstermektedir (Baltacı, Mogulkoc et al. 2019).

Tüm bu çalışmalar, belirtilen süreçleri presinaptik bir hücre ile postsinaptik bir hücrenin iletişimi olarak kabul eder. Ancak son dönemlerde, bu süreçte aslında glia'daki astrosit hücrelerinin de önemli bir rol üstlendiği anlaşılmıştır ve böylelikle LTP, "üç parçalı sinaptik model" (tripartite synaptic model) halini almıştır (Perea and Araque 2007). Bu yeni yapıda presinaptik hücreden salınan glutamik asidin bir kısmı da astrosit hücrelerindeki mGluR reseptörlerine bağlanarak endoplazmik retikulum'dan hücre içerisine Ca^{2+} akışını sağlar ve bunun sonucunda astrosit hücresinden gliotransmitter olarak da bilinen nörotransmitter salınır. Bu süreçlerin bir kısmı Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: LTP sürecindeki "üç parçalı sinaptik model". (bilgisayar ortamında Meriç Atalar tarafından çizilmiştir.)

2.3.1. Astrositler

Astrositlerin (astrocytus) küçük bir hücre gövdeleri ile her yöne uzanan dallı uzantıları bulunur. İki tip astrosit vardır: Fibroz (astrocytus fibrosus) ve Protoplazmik (astrocytus protoplasmaticus) (Netter 2013) (Volterra and Meldolesi 2005).

Fibroz astrositler, başlıca substantia alba'da bulunurlar. Uzantıları sinir liflerinin arasından geçer. Herbir uzantı, uzun, silindirik, düzdür ve fazla dallanmaz. Hücre gövdesi ve uzantılar, sitoplazmalarında çok sayıda filament içerir (Marieb 1936/2017).

Protoplazmik astrositler sıklıkla, uzantılarının sinir hücreleri arasından geçtiği substantia grisea'da bulunurlar. Uzantıları, fibroz astrositlerinkine göre daha kısa, daha kalın ve çok dallıdır. Bu hücrelerin sitoplazması fibroz astrositlerinkinden daha az filament içerir (Marieb 1936/2017).

Astrosit uzantılarının çoğu kan damarlarının üzerinde (perivaskuler ayak -proc. vascularis) genişleyerek sonlanır, kapillerlerin dış yüzeyleri üzerinde hemen hemen tam bir örtü oluştururlar. Astrosit uzantılarının önemli bölümü, merkezi sinir sisteminin dış ve iç yüzeylerinde birbirleriyle karşılaşarak buralarda membrana limitans gliae superficialis ve periventricularis meydana getirirler. Dış glia membranı pia mater'in altında bulunur. İç glia membranı beyindeki ventriküller ve medulla spinalis'teki canalis centralis'i döşeyen ependimanın altında yer alır.

Astrosit uzantıları, pek çok aksonun başlangıç segmentinin ve Ranvier boğumlarındaki aksonun çıplak segmentinin çevresinde bolca bulunurlar. Akson sonlanmaları çoğu yerde diğer sinir hücrelerinden ve bunların uzantılarından, astrosit uzantılarının oluşturduğu kılıflar tarafından ayrılmıştır (Netter 2013).

2.3.1.1. Astrositlerin Fonksiyonları

Dallanan uzantıları ile astrositler, sinir hücreleri ve sinir lifleri için destekleyici bir ağ oluşturur. Embriyoda bunlar immatur nöronların göçü için iskelet görevi yaparlar. Nöronlar arasındaki sinaptik temas yerlerini sarar; akson sonlanmalarını komşu ve ilgisiz nöronların etkilerinden korumada elektriksel yalıtıcı olarak hizmet ederler. Sinapslarda salgılanan nörotransmitter maddelerin yayılmasına karşı bariyerler de oluşturabilirler. Astrositlerin, akson terminallerinden salgılanan gamma aminobutirik asit (GABA) ve glutamik asiti absorbe ederek bu nörotransmitterlerin etkisini sınırladığı gösterilmiştir. Astrositlerin, ekstrasellüler aralıktan K⁺ fazlasını çekebildikleri görülür. Sitoplazmalarında glikojen depo ederler. Norepinefrine yanıt olarak glikojen glikoza parçalanabilir ve kullanılmak üzere çevredeki nöronlara salgılanabilir (Perea and Araque 2007).

Astrositler, dejenere olan sinaptik akson sonlanmalarını tutarak fagositler gibi görev yapabilir. Hastalık nedeniyle nöronların ölümünü takiben çoğalır ve önceden nöronlar tarafından işgal edilen alanları doldururlar; bu olaya gliosis yerleşimi denir. Metabolitlerin veya ham maddelerin kan kapillerlerinden nöronlara geçişi sırasında astrositler perivaskuler ayakları aracılığı ile bir kanal görevi yapabilmektedirler.

Astrositler gap junction'lar ile biraraya geldikleri için, iyonlar ekstraselluler ortama girmeden bir hücreden diğerine geçebilirler. Astrositler, komşu nöronlar üzerinde trofik etkisi olan maddeler üretebilirler (Lee, Mane et al. 2007).

2.3.2. Astrositler ve Epilepsi

Astrositler, insan beyindeki nöbet odaklarının önemli bir bileşenini oluşturur. Uzun bir süredir nöbet oluşumunda astrositlerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu hücrelerin benzersiz biyolojisi daha iyi anlaşıldıkça, nöbet odaklarındaki kesin rolleri yeniden dikkat çekmektedir (de Lanerolle, Lee et al. 2010).

Gliotik skar oluşumu, insan epilepsisinin belirgin bir özelliğidir. Kronik fokal epilepside neredeyse değişmez gliotik skar varlığı, birçok kişinin hastalıkta glia için fizyolojik bir rol önermesine yol açmıştır (Penfield 1930, Harris 1975).

Epilepside astrositlerin rolü üzerine yapılan ilk çalışmalar, çoğunlukla alümina veya kobalt gibi kimyasalların hayvan beyinlerinin korteksine topikal olarak uygulanmasıyla indüklenen gliotik yaralar üzerinedir. Yazarlar, incelemelerinin sonucunda, "astrositlerin, üç yoldan herhangi biriyle epileptogeneze varsayımsal olarak katkıda bulunabileceğini belirtmişler: (1) önceden normal nöronlarda nöronal hiperaktivitenin başlaması, (2) anormal nöronlarda epileptik patlamanın teşvik edilmesi ve (3) nöronal hiperaktiviteyi nötralize edememe ve durdurumama". Bununla birlikte, "glial yaraların nöronal morfolojiyi mekanik olarak bozduğu bulgusu dışında, astrositlerin nöbetlere neden olduğuna dair kanıtların neredeyse tamamen eksik olduğunu" eklemiştir (Tiffany-Castiglioni E 1986).

İlerleyen yıllarda astrositlerin biyolojisi ve fizyolojisi konusunda edinilen bilgiler sonucunda astrositlerin epilepsideki rolüne ilişkin bilgiler artmıştır. İlk olarak 1880'de 'hipokampal skleroz' veya 'Ammon'un boynuz sklerozu' olarak tanımlanan temporal lob epilepsisi (TLE) nöbetlerinin temporal lobdan, özellikle hipokampustan kaynaklandığı belirtilmiştir (Sommer 1880). Tıbbi olarak inatçı epilepsinin kontrolü için ameliyat olmuş hastalardan alınan hipokampal örneklerin incelenmesi, hipokampal sklerozlu vakaların yaklaşık %40-65'ini ortaya çıkarmıştır. Bu tip hastalarda hipokampal eksizyon cerrahisi, sklerozu olmayanlara göre daha iyi bir cerrahi sonuca sahiptir (de Lanerolle, Kim et al. 2003). Yapılan çalışmalarda sklerotik hipokampuslarda %50'den fazla nöron kaybı görülmüştür. Ayrıca glial yoğunluk, sklerotik olmayan hipokampuslara ve nörolojik olarak normal otopsi kontrollerine kıyasla yaklaşık %80 artmıştır (Petroff, Errante et al. 2003, Cohen-Gadol, Pan et al. 2004).

Fizyolojik koşullar altında, astrositlerdeki Ca²⁺ sinyalleri mGluR'lerin aktivasyonuna neden olur. Epilepsi (Aronica, Van Vliet et al. 2000, Steinhäuser and

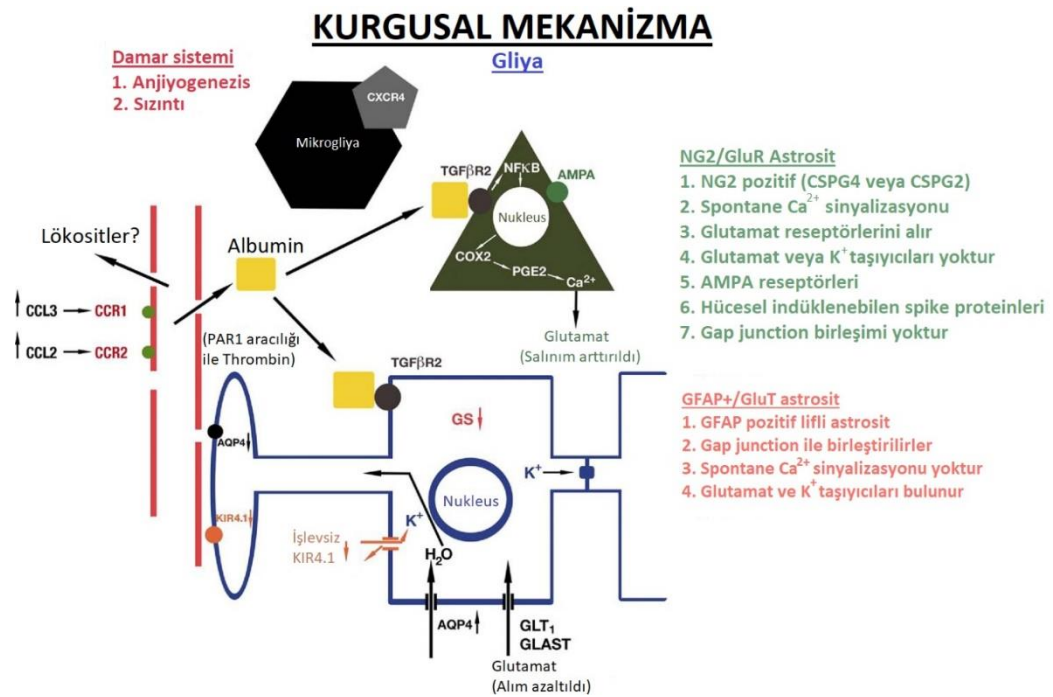
Seifert 2002) hayvan modellerinde ve TLE'li hastalardan alınan hipokampal örnekte reaktif astrositlerde mGluR'lerin protein ekspresyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Tang and Lee 2001). Ayrıca, TLE'li hastalardan türetilen hipokampal kültürlenmiş astrositler, Ca²⁺ sinyallerinde artış göstermiştir (Eid, Williamson et al. 2008).

Normal işleyen beyinde, nöronlar tarafından hücre dışı boşluğa salınan glutamat, astrositlere alımla temizlenir ve glutamine dönüştürülür. Bu glutamin, astrosit tarafından hücre dışı boşluğa salınır ve buradan nöronlar tarafından alınır ve glutamata sentezlemek için kullanılır. Bu süreç, glutamat-glutamin döngüsü olarak bilinir (Petroff OAC 2004). İnteriktal dönemde glutamat-glutamin döngüsü, sklerotik hipokampusta önemli ölçüde azalırken, sklerotik olmayan hipokampusta normaldir (Petroff, Errante et al. 2002). Astrositik Ca²⁺ sinyallerinin ve glutamat salınımının epileptiform aktivitenin oluşumundaki potansiyel rolü son çalışmalarla desteklenmektedir (Kang, Xu et al. 2005, Tian, Azmi et al. 2005).

Daha önceki bilgilere dayanarak, sklerotik hipokampustaki astrositler, nöbet oluşumunu çeşitli yollarla etkileyebilir. Hipokampus'un temel girdi kaynağı, girus parahipokampalis'in bir parçası olan entorhinal kortektir. Entorhinal korteksten gelen efferentler, bir temporoammonik yol aracılığıyla CA1 alanına bazı bağlantılarla birlikte, dentat granül hücrelerinin apikal dendritleri üzerinde perforan yol ve sinaps olarak hipokampus'a uzanır. Granül hücrelerin aksonları (yosunlu fiber aksonlar), CA3 nöronlarında, en belirgin olarak yosunlu hücreler olmak üzere hiler nöron bağlantıları ile sinapsa uzanır. CA3 bölgesindeki nöronlar, Schaffer bağlantıları olarak bilinen aksonlarının bağlantılarını CA1 alanına ve oradaki nöronlar üzerindeki sinapslara yansıtır. CA1 nöronlarından gelen aksonlar da subiculuma projeksiyon yapar, subiculum hipokampus'tan beyin diğer bölgelerine efferentlerin ana kaynağıdır. "Üç sinaptik yol", hipokampus'tan iyi anlaşılmalı bir projeksiyon sistemidir, ancak hipokampal bölgeler arasında daha az anlaşılmalı başka anatomik bağlantılar da vardır (Witter, Groenewegen et al. 1989). Sklerotik hipokampusta, hem girus dentatus'ta hem de hipokampus proper'da (Ammon boynuzu) önemli nöronal kayıp bildirilmiştir (Babb, Brown et al. 1984). CA1 alanındaki nöronların, yaralanmaya en duyarlı oldukları belirtilmiştir (Sommer 1880). Bölge reaktif astrositlerle doludur ve hipokampus'un sertleşmesi ya da sklerotik değişimi ile sonuçlanır. Son çalışmalar, girus dentatus'ta hiper uyarılabilir dentat granüler nöronlarla sonuçlanan bir dizi yeniden yapılanma değişiklikleri bildirmektedir (de Lanerolle and Lee 2005). Sklerotik hipokampus'un subiküler bölgesi, reseptör ekspresyonunda ve sinaptik girdilerde daha ince değişiklikler meydana gelebilmesine rağmen, önemli nöronal kayıp göstermemesi bakımından dikkat çekicidir (Kim, Guimaraes et al. 1990, Fisher, Sperber et al. 1998). Bu, Alzheimer hastalığı, şizofreni ve benzeri gibi hipokampusla ilgili diğer nörolojik bozukluklardan oldukça farklıdır, burada

subikulum önemli nöronal hasar gösterir. Entorhinal korteksin ayrıca, özellikle üçüncü tabakalarda ve daha az ölçüde ikinci tabakada olmak üzere, bir miktar gliosis ile nöronal kayıplara sahip olduğu bildirilmiştir (Du, Eid et al. 1995). TLE hastalarının hipokampusundaki derin elektrotlarla yapılan çalışmalar, nöbet aktivitesinin bu tür hipokampuslardan ve özellikle bunların içindeki en sklerotik bölgelerden kaynaklandığını göstermektedir (Babb, Lieb et al. 1984).

Astrositler, epilepside, glutamat salınımı ve zayıf K⁺ klirensi yoluyla nöbet aktivitesini sürdüren mekanizmalara, epileptojenik hale gelen beyin bölgelerinde yapısal değişiklikler yoluyla bir nöbet odağının oluşumuna katılmayı içeren çeşitli roller oynayabilir (Şekil 2.5). Epileptogenez sürecinde astrositlerin bu rollerinin her birinin dikkatlice incelenmesi, epilepsi için daha etkili farmakoterapi için fikir verebilir.

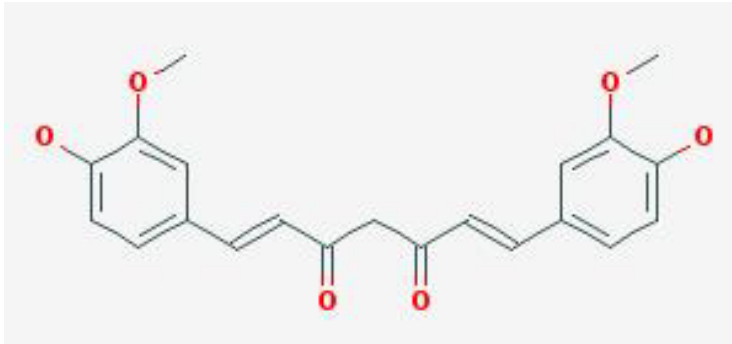


Şekil 2.5. İnsan sklerotik hipokampusunda astrosit benzeri hücreleri içeren, mekanizmalarını ve değişen fonksiyonel durumlarını gösteren bir şema (Aşağı doğru küçük aşağı ok düzenlenmiştir; uzun oklar akış yönünü gösterir) (de Lanerolle, Lee et al. 2010).

2.4. Curcumin

Curcuma longa, güney ve güneydoğu tropikal Asya'da yaygın olarak yetiştirilen zencefil ailesine ait sarı çiçekli, çok yıllık otsu bir bitkidir. Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinin kökünden izole edilen ve insanlar için toksik olmayan, aynı zamanda da halk

arasında köri olarak bilinen bir baharattır. Moleküler ağırlığı 368,37 g/mol olan curcumin'in erime noktası ise 183°C' dir. Suda çözünmeyen fakat DMSO, etanol ve asetonda çözünebilen bir kimyasal yapıya sahiptir (Şekil 2.6) (Liu and Chen 2013). Bazı kanser türlerinde, curcumin'in kanserli hücrelerin bölünmesini durdurarak, hücreleri ölüme götürdüğü saptanmıştır. Anti-kanser bir ajan olarak curcumin'in etkisine bakıldığında, pek çok doku ve organlarda tümör oluşumunun baskılandığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Limtrakul, Lipigorngoson et al. 1997, Ushida, Sugie et al. 2000). Ayrıca curcumin'in antioksidan özelliği sayesinde ise alkolün, radyasyonun, ilaçların ve ağır metallerin çeşitli organlar üzerinde oluşturduğu hasarı önlediği saptanmıştır (Ushida, Sugie et al. 2000, Hatcher, Planalp et al. 2008).



Şekil 2.6. Curcumin'in kimyasal yapısı

Epidemiyolojik çalışmalarda, Doğu Hindistan'da kanser insidansının düşük olduğu saptanmış ve bu durumun sebebinin bölgede curcumin'in yüksek oranda kullanılmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür (Mohandas and Desai 1999, Anto, Mukhopadhyay et al. 2002). Curcumin'in kanser hücreleri üzerinde, kaspaz-8'i aktive ederek Bid üzerinden dış apoptotik yolağı etkilediği; sitokrom-c salınımı, kaspaz- 3, 9 aktivasyonu ve PARP kesilimi ile de iç apoptotik yolağı etkilediği belirlenmiştir (Anto, Mukhopadhyay et al. 2002). Bunun yanında curcumin, çeşitli hormonların sentezini ve salınımını düşürerek hücre proliferasyonuna ket vurduğu ve apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir (Miller, Chen et al. 2008, Schaaf, Shan et al. 2009). Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada curcumin kullanımıyla meme kanserinin akciğer metastazları insidansında büyük ölçüde azalma görüldüğü belirtilmiştir (Aggarwal, Shishodia et al. 2005).

2.4.1. Curcumin'in Klinik Uygulamaları

Curcumin üzerine yapılan çalışmalar curcumin'in anti-karsinojenik, anti-inflamatuar etkinliğini ortaya koymuştur. Bu etkinlik pek çok kanser türünde *in vitro* ortamda ispatlanmış olmasına rağmen *in vivo* ortamda ise fare modelleri üzerinde metastazı engelleyici ve tümör baskılayıcı rolünün olduğunu göstermiştir (Aggarwal,

Ichikawa et al. 2006). Klinik vakaların çoğunda curcumin'in günlük 8.000 mg doz uygulamasının tedavi edici etkin bir rolde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca curcumin'in günlük ilaç uygulama dozunun 12.000 mg olarak daha etkin olacağı üzerinde çalışmalar da yer almaktadır (Cheng, Hsu et al. 2001).

Pre-klinik çalışmalarda meme kanseri hastalarına curcumin merhemi uygulanmış ve sonucunda lezyon büyüklüğü, kaşıntı ve ağrılarda meydana gelen anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Aggarwal, Yuan et al. 2013). Yapılan bir diğer çalışmada ise curcumin'in karaciğer kanser hücrelerinde hücre siklusunu durdurarak sitotoksik etki gösterdiği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur. Farelerdeki hepatokarsinoma hücrelerinde curcumin'in metastaza karşı etkisi COX ve VEGF'nin anlatımının azalmasına bağlı olarak açıklanmıştır (Aggarwal, Kumar et al. 2003). Ayrıca kötü huylu beyin tümörü (glioblastoma) hücrelerinde curcumin'in terapötik etkinliğine bakılmış ve curcumin'in bu hücreler üzerinde NF- κ B sinyal yolağını inhibe ettiği bulunmuştur (Ambegaokar, Wu et al. 2003, Nagai, Kurimoto et al. 2005, Dhandapani, Mahesh et al. 2007). Bu kanser türünün ksenograft modelinde; tümör büyümesinin büyük ölçüde inhibe edilmesi ve otofajinin indüklenmesi curcumin tarafından sağlanmıştır. Tedavisi curcumin ile gerçekleştirilen grubun tümör hacimlerinde ise yaklaşık 3 kat düşüş olduğu saptanmıştır (Aoki, Takada et al. 2007).

Pankreas kanserine sahip kişilerde curcumin ile yapılan klinik çalışmalarda hastalığı stabil devam eden kişilerin sitokin seviyelerinde (IL-6, IL-8, IL-10 reseptör antagonistleri) anlamlı artışlar görülürken belirgin bir tümör gerilemesi de tespit edilmiştir (Dhillon, Aggarwal et al. 2008). Curcumin'in lenfomada etkisine bakıldığında, JAK-1 ve STAT3 aktivitesini engelleyerek çoğalmayı inhibe ettiği ve böylece apoptozu indüklediği saptanmıştır (Uddin, Hussain et al. 2005). Fare ksenograft modelinde ise oral curcumin (50-200 mg/kg) uygulanmasının lenfoma hücrelerinin gelişimini durdurduğu gösterilmiştir (Goel, Kunnumakkara et al. 2008). Akciğer kanserinde ise cis-diamin-dikloroplatin ile curcumin'in kombine olarak kullanımı sonucunda lenfatik metastazlı tümör gelişiminin engellendiği saptanmıştır (Ichiki, Mitani et al. 2000).

Sağlıklı hücre üzerine toksik etki göstermemesi, antioksidan ve anti-karsinojen aktivitesinin yüksek olması, düşük molekül ağırlığa sahip olması curcumin'in ideal bir kemoterapötik ajan olmasını sağlamaktadır (Aggarwal, Kumar et al. 2003). Ancak düşük biyoyararlanıma sahip olmasından ötürü çeşitli analoglarının sentezlenmesi ya da kombin tedavilere geçilerek etkinliğinin artırılması gerekmektedir. Farmakolojik etkinliği yüksek analoglar, nanopartiküller ve biyoyararlanımı daha yüksek, toksik etkileri daha az bileşikler elde edilmeye çalışılmalıdır (Toptaş 2016).

2.4.2. Curcumin'in Kimyasal Yapısı

Curcumin; halk arasında “zerdeçal” olarak bilinen ve geleneksel Uzak Doğu tıbbında yaygın olarak kullanılan, *Curcuma longa* (*C. longa*)'nın rizomlarından elde edilen, çok yönlü farmasötik etkinliği bilinen antioksidan özelliğine sahip polifenolik bir bileşiktir. Curcumin'in uzun yıllar sindirim, solunum hastalıklarında kullanımı bilinmektedir. Günümüzde Uzak Doğu ülkeleri başta olmak üzere birçok ülkede tatlandırıcı, baharat ve gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Curcumin'in antioksidan, antikanserojenik, antimitojenik, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral, anti-inflamatuar, anti-nosiseptif gibi çok yönlü farmasötik etkileri çeşitli deneysel çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Curcumin birçok hastalığın tedavisinde etkili olmasında ana etkenin güçlü antioksidan etkisi olduğu düşünülmektedir (Becit, Aydın et al. 2017).

Zerdeçalın ana bileşeni curcumin, bis-demethoksi curcumin ve demethoksi curcumin'dir. Sarı bir fenolik pigment olan curcumin, süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve nitrik oksidi aktif makrofajlardan uzaklaştırarak etkili bir antioksidan görevi görür. Curcumin, polifenollere bağlıdır, antioksidan ve radikal temizleme özelliklerine sahiptir. Curcumin, E vitaminden birkaç kat daha iyi bir radikal temizleyicidir. Serbest radikalleri temizler ve lipid peroksidasyonunu ve hidroperoksit oluşumunu engeller. Curcumin'in oksidatif stres modülasyonu ile asetilasyon ve deasetilasyonu düzenlediği belirtilmiştir (Akbay and Pekcan 2016).

Curcumin, direkt antioksidan aktiviteye ek olarak enflamatuar enzimlerin aktivitesini inhibe ederek veya glutatyon sentezini artırarak dolaylı antioksidan özellikler de göstermektedir. *Curcuma longa*'dan izole edilen bileşenlerin güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu ve lipid oksidasyonu üzerinde çok önemli olduğu ifade edilmiştir (Akbay and Pekcan 2016).

Oksidatif stres, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nöronal hücre hasarı ve hipoksi gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde ve özellikle sinir sistemi hastalıklarında rol oynamaktadır. Bu konuda curcumin'in değişik biyolojik etkenlerinin yanı sıra terapötik etkilerini ön plana çıkmaktadır. Curcumin'in serbest radikal temizleyicisi, indirgeyici madde ve DNA hasar inhibitörü olarak antioksidan etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Noorafshan and Ashkani-Esfahani 2013).

Curcumin'in ağızdan alınan büyük bir kısmı dışkı tarafından atılmaktadır ve bir kısmı da konjugatlar yoluyla idrarla atılmaktadır. Curcumin'in IV ve IP uygulandığında ve uygulamadan hemen sonra metabolize edilerek dışkı ile atıldığı saptanmıştır. Curcumin'in bağırsaktan düşük absorpsiyonu, karaciğerden yüksek metabolizma ve safranın hızlı atılımı, curcumin'in plazma ve dokularda düşük seviyede olmasını

açıklamaktadır. Bu nedenle curcumin'in biyoyararlanımının düşük olduğu ve yarı ömrünün oldukça kısa olduğu sonucuna varılmıştır (Pan, Huang et al. 1999).

2.4.3. Curcumin'in Beyin Dokusuna Etkisi

Curcumin'in bilişsel işlev üzerindeki nöroprotektif etkileri epidemiyoloji açısından çeşitli prelinik ve klinik modellerde araştırılmıştır. Düzenli curcumin tüketiminin daha iyi bilişsel işleve sahip olmak için yeterli bir takviye olduğu kaydedilmiştir (Noorafshan and Ashkani-Esfahani 2013). Curcumin'in nöroplastinin ve onarımın önemli bir yolağı olan nörogenezis'i uyarabildiği saptanmıştır (Cole, Teter et al. 2007).

Hayvan modellerindeki bazı ön çalışmalar, serebral iskemi/reperfüzyon hasarı, travmatik beyin hasarı, ensefalopati, beyin tümörü ve nöroinflamasyon içeren diğer nörolojik hasarlarda curcumin kullanımının anlamlı olduğu ve nörolojide çeşitli yararlı etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Noorafshan and Ashkani-Esfahani 2013).

Curcumin'in nöro-koruyucu etkisinin kan-beyin bariyerindeki bozulmanın düzeltilmesi ve beyin ödeminin azaltılmasında anti-oksidan, anti-inflamasyon ve anti-apoptotik etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Yuan, Liu et al. 2017).

Vücuda dışarıdan yapılan etkilere karşı bir reaksiyon olan inflamasyon, canlı dokuların yaralanmaya karşı reaksiyonudur. İnflamasyon sonucunda proinflamatuvar sitokinler ve reaktif oksidatif türleri (ROS) gibi nörotoksik faktörler üreten mikroglia ve astrositlerin aktivasyonu ile tetiklenerek nöronal hasara ve daha sonraki bilişsel sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle nöral hasarda ortaya çıkan pro-inflamatuvar sitokinler ve oksidatif stres Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozuklukta görülen hafıza bozukluğu ve diğer kognitif eksiklikler ile ilişkili olabilmektedir (Mishra and Palanivelu 2008).

Nöroprotektif etkinliğine rağmen curcumin'in kullanımı zayıf emilim, hızlı metabolizma ve hızlı sistemik eliminasyon nedeniyle sınırlıdır. Bununla birlikte en zorlu faktör curcumin'in düşük su çözünürlüğüdür (Normal pH'ta 0.4 µg/ml). Kemirgenler üzerinde klinik öncesi çalışmalar ve insanlar üzerindeki klinik çalışmalarda 10-12 g/ml oral yoldan curcumin verildikten sonra serumda curcumin (50 ng/ml) düzeyinin çok düşük olduğu dolayısıyla curcumin'in biyoyararlanımının düşük olduğu ortaya konulmuştur (Ullah, Liang et al. 2017).

Anand ve ark., (2007) deneysel hayvan çalışmalarında curcumin'in yüksek dozlarının bile güvenli olduğunu bildirmişlerdir. Bunun, zayıf curcumin emiliminden, hızlı metabolizmadan ve hızlı sistemik eliminasyondan ve dolayısıyla plazma ve dokulardaki düşük seviyelerden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Anand, Kunnumakkara et al. 2007).

2.4.4. Curcumin'in Antiepileptik Etkisi

Curcumin çok az yan etkiye sahiptir ve kan beyin bariyerini kolayca geçer (Mishra and Palanivelu 2008). Bazı deneysel çalışmalar, epilepsi ve biliş karşı yararlı etkilerini göstermiştir. Bir çalışma, sıçanlarda curcumin'in diyetle alımının, epileptik nöbetleri azalttığını ve demir kaynaklı epilepside epileptogenez ile ilişkili biyokimyasal değişiklikleri önlediğini bildirmiştir (Jyoti, Sethi et al. 2009).

Curcumin bir antioksidan olduğundan ve oksidatif stres, demir kaynaklı epileptogenezde önemli bir rol oynadığından, demir kaynaklı epilepside antiepileptik bir etki gösterebilir (Jyoti, Sethi et al. 2009). Bir çalışmada, doza bağımlı bir şekilde curcumin ile ön tedavi, oksidatif stres ve bilişsel bozuklukla ilişkili pentilentetrazol kaynaklı nöbetleri iyileştirmiştir (Mehla, Reeta et al. 2010). Bu çalışma curcumin'in epileptik hastalarda daha iyi nöbet kontrolü ve daha az bilişsel bozulma gibi avantajlara sahip olma potansiyelini göstermektedir. Bu sonuçlar, bu nedenle, curcumin'in hem nöbetleri önlemek hem de nöbetin neden olduğu hafıza bozukluğuna karşı koruma sağlamak için epilepside bir yardımcı madde olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Choudhary vd. (2013) ayrıca curcumin tedavisinin, pentilentetrazol modeli oluşturulan farelerde nöbet şiddetini ve hafıza bozukluğunu önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Curcumin ayrıca çoklu hedefli yaklaşımda nörotransmitter seviyesini modüle ederek PTZ sonrası kindling modeli ile epileptik yapılan farelerde davranış, öğrenme ve hafıza bozukluklarını iyileştirir. Curcumin tedavisi, beyindeki asetilkolinesteraz aktivitesini önemli ölçüde azaltarak serotonin düzeyini doza bağlı olarak yükselttiği için hayvanlarda öğrenme ve hafıza eksikliğinde iyileşmeye neden olabilmektedir. Curcumin'in ayrıca farelerde artan mevcut elektroşok nöbet modelinde önemli antikonvülsan etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Bharal, Sahaya et al. 2008). Yine curcumin'in potansiyel antikonvülsan etkisini ve davranış üzerindeki düşük toksisite potansiyelini göstermektedir, bu nedenle epilepsi gibi nöbet bozukluklarında kullanım için iyi bir aday olabileceği belirtilmektedir (Gupta, Briyal et al. 2009). Gupta ve ark. (2009) ayrıca curcumin'in kainik asit kaynaklı nöbetlere karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Gupta, Briyal et al. 2009).

Bununla birlikte, curcumin bazı epilepsi modellerinde etkili bir antiepileptik etkiye sahip görünmemektedir. Curcumin'in pentilentetrazol ile uygulanması, pentilentetrazol kaynaklı nöbetlerin gelişimini engelleyememiştir (Kaur, Bal et al. 2014), ayrıca kainik asit kaynaklı nöbetlerde epileptogenez ile ilişkili hücre ölümünü önlemesine ve kainik asit kaynaklı status epileptikus'un şiddetini azaltmasına rağmen (Shin ve diğerleri, 2007), kainik asit kaynaklı nöbetlerin başlangıcını geciktirmede başarısız olmuştur (Sumanont, Murakami et al. 2007). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, curcumin'in, kemirgen

temporal lob epilepsisinin nöbet sonrası epileptikus modelinde nöbet sıklığını azaltmadığı bulunmuştur (Drion, Borm et al. 2016). Görünüşe göre curcumin'in faydalı etkileri modele bağlıdır ve bazı modeller için geçerliiyken diğerleri için geçerli olmayabilir. Sonuçta epilepsi tek ve belirli bir hastalık değil klinik özellikleriyle tanımlanan nörolojik bozukluklar grubudur. Epilepsiyle ilgili temel mekanizmaları açıklamak, farklı epileptik nöbetlerin temelinde bulunan patolojik olayları belirlemek amacıyla birçok epilepsi modeli geliştirilmiştir. Epilepsiyle ilgili sorunlara cevap verebilecek tek bir model yoktur, model üzerinde yapılan çalışmalar ancak o modeli ilgilendiren temel mekanizmaları aydınlatılabilir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar curcumin'in elektriksel nöbet aktivitesini büyük ölçüde azalttığını, sadece apoptotik hücre ölümüne giden sinyal yolunu doğrudan bloke etmekle kalmayıp, aynı zamanda dolaylı olarak nöronal hücre ölümünün korunmasını desteklediğini göstermektedir (Agarwal, Jain et al. 2011). Ayrıca curcumin'in hem nöbetleri önlemek hem de nöbetin neden olduğu hafıza bozukluğuna karşı koruma sağlamak için epilepside bir yardımcı madde olarak bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Jyoti, Sethi et al. 2009).

2.5. Hipotez

Bu çalışmada hipotezimiz; primer astroglial hücre hattında penisilin tarafından indüklenen astrosit hücre ölümü üzerine curcumin'in etkisi olduğudur ve penisilin epilepsi modellerinin hücre kültürü düzeyinde yaptığı dejenerasyon ve hücre kaybı mekanizmasını kullanarak curcumin'in epilepsi mekanizması oluşturulmuş primer kortikal astrosit hücrelerinde destekleyici etkilerinin varlığıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DeneY Hayvanları

Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından PAU HADYEK-2019/11 no'lu çalışmamız 07.03.2019 tarihi ve 2019/02 sayı ile onaylanmıştır. İlgili etik kurul belgesi EK-4' de sunulmuştur.

Çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi DeneY Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen yenidoğan (d1-d2) Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Primer astrosit hücre kültürü için tek bir anneden doğan toplam 3 adet üç günlük rat yavrusu kullanıldı.

Çalışma Grupları; Grup I, Kontrol grubu, herhangi bir madde uygulanmadı. Grup II, Curcumin grubu, astrosit hücre kültürüne çeşitli curcumin (Sigma-Aldrich, C1386) dozları uygulandı. Grup III, Penisilin grubu, astrosit hücre kültürüne 1000 IU penisilin G (iecilline 800.000 IU) uygulandı. Grup IV Curcumin + Penisilin grubu, astrosit hücre kültürüne çeşitli curcumin dozları ve 1000 IU penisilin G uygulandı.

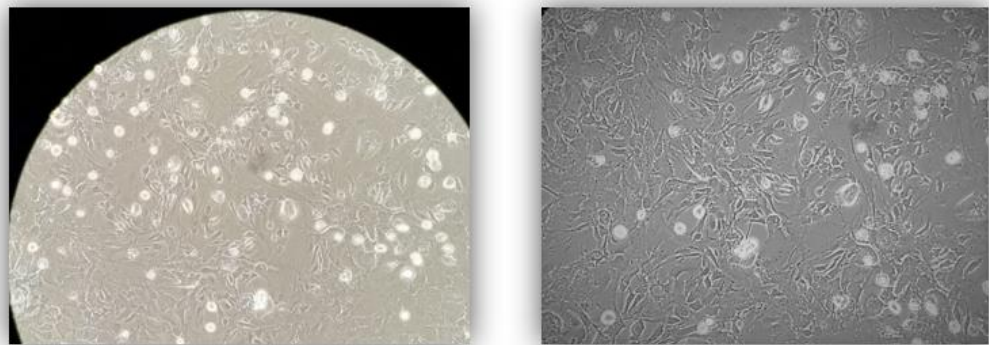
3.2. Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması

Astrosit primer hücre kültürü %95'in üzerinde saflıkta astrosit hücrelerinin elde edildiği kanıtlanmış olan McCarthy ve de Vellis yöntemlerinden modifiye edilerek hazırlanmış Cole de Vellis yöntemi ile hazırlandı (McCARTHY and De Vellis 1980, Shahr 1989). Rat yavrularına steril şartlarda hiçbir anestezi maddesi uygulanmadan servikal dislokasyon ile dekapitasyon işlemi yapıldı. Kan damarları ve meninkslerinden ayrılan beyin dokusu *Hanks Buffered Salt Solution* (HBSS, 100 ml, Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 500 µl gentamisin (Gentamisin, 10 mg/10 ml, G1397 Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 5 ml fungizon içeren kültür kabına konuldu. Fungizon hazırlanması için 10 ml nukleaz free içinde 250 mg toz Amphotericin B (A2411 Sigma-Aldrich Amphotericin B from *Streptomyces* sp.) ile stok çözelti hazırlandı. 15 ml'lik falcon tüpe; stok 25 µg/ml

Amphotericine B, 5 ml Penicillin-Streptomycin (P0781 Sigma-Aldrich), 5 µl Amphotericine eklendi. Beyin dokusu neşter ile parçalanıp, jöle kıvamına gelene kadar HBSS ile pipetaj yapılarak mekanik olarak bozuldu. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda medium atıldı. 20 ml HBSS içine Trypsin 500 µl (T4049 Sigma-Aldrich Trypsin/EDTA, 100 ml, 0.25%, USA), DNaz-I 50 µl (DNase I recombinant, RNase-free, 10 U/µl, Roche, Mannheim, Germany) eklenip 37 °C'de 30 dk- 1 saat aralığında çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tripsini inaktive etmek için 3 ml Fetal Bovine Serum (FBS)(12103C Fetal Bovine Serum Sigma-Aldrich USA origin, suitable for cell culture) eklenerek iyice karıştırıldı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atıldı, üzerine 10 ml HBSS eklendi, ikinci kez santrifüj edildi. Bu işlem üç kere tekrarlandıktan sonra üst faz atıldı, üzerine 5 ml HBSS eklenerek pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu yetmiş mikronluk filtreden geçirildi ve 15 ml'lik falkona alındı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek medium uzaklaştırıldı. Pellet 1 ml HBSS ile homojenize edildikten sonra hücre süspansiyonu 10 ml Astrosit media ile tekrar homojenize edildi. Sadece astrosit hücrelerinin üremesine izin veren astrosit media; 500 ml DMEM-F12, 5 ml fungizon, %15 fetal bovine serum, 5 ml L-glutamine, 500 µl insülin ile hazırlandı. Dört adet T25'lik Poly-D-Lysine kaplı flaskların her birine önce 2,5 ml Astrosit media verilip ardından her birinin üzerine 2,5 ml hücre süspansiyonu eklendi. 37 °C'de %5 CO² ve %95 nem içeren inkübatörde inkübe edildi.

Bulanık görüntüde olan fakat hücre gelişimi ve yapışması gözlenen kültür değiştirildi. Her flask için kültür 1 ml HBSS ile yıkanarak 5 ml astrosit media eklendi. 37°C'de %5 CO² ve %95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Takibinde 3-4 günde bir astrosit besiyeri değiştirildi. Astrosit hücreleri bitişik duruma gelene kadar çoğaldığında 1/3 oranında pasajlanarak hücre kültürü devam ettirildi ve deneylerde değişik pasajlara ait astrosit kültürleri kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Primer Astrosit Hücre Kültürü.

3.3. Curcumin Dozlarının Hazırlanması

Curcumin (*Curcuma longa* (Turmeric), powder C1386 Sigma-Aldrich) ticari olarak satın alınmıştır. Yavaş yavaş ısıtılarak DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, D2650 Sigma-Aldrich)'da çözülüp filtreden geçirilmiştir. 10 mM/ml stok Curcumin elde edilmiştir. Curcumin'in 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM 75 µM, 100 µM, 150 µM dozlarında 8 farklı konsantrasyonu hazırlanarak, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonunda doza bağımlı araştırması yapılmıştır. Tüm çalışmalar 3 tekrarlı olarak sürdürülmüştür.

3.4. Sitotoksikite testi ile hücre canlılığının saptanması

Örneklerin hücre kültürü üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için uygulanan MTT testi Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi kolorimetrik ölçümlere dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir.

Curcumin'in belirtilen dozlarda besiyeri içerisinde çözdürülerek kullanımı ile hücrelerin çoğalması üzerinde inhibisyona yol açıp açmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, yapılacak uygulamaların hücre ölümü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla MTT testi kullanılmıştır.

3.4.1. Sitotoksikite Testi İçin Hazırlık

Laminar flow kabiniinde astrosit hücreleri, astrosit media içeren 75 cm² flask içine alındı. Hücreler, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Mikroskop ile hücrelerin canlılığı, kontaminasyon durumu incelendi. Laminar flow kabiniinde hücre kültür süspansiyonu flasktan cam pipet ve vakum yardımıyla şişe tabanına değmeden dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücreler iki kez 2 – 3 ml PBS ile yıkandı ve ardından flaska 5 ml tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi. İnkübatörde 3-5 dakika süreyle bekletilerek hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandı. Pipetajla attıktan sonra 10 ml besiyeri eklenerek tripsin-EDTA uzaklaştırıldı. Santrifüj tüpüne alınan hücre süspansiyonu 25°C'de 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Laminar flow kabiniinde süpernatant atıldı, dipte toplanan hücre pelleti 2 ml besi yerinde homojenize edildi.

Elde edilen hücre süspansiyonundan 50 ml alındı üzerine 50 ml tripan – blue çözeltisi eklenerek süspansiyon edildi. Süspansiyondan 20 µl thoma lamina eklendi. Hücreler mikroskopta sayıldı. Canlı hücre sayısı; Ortalama Hücre Sayısı x 5.000

formülüne göre hesaplandı. Hücre süspansiyonu daha fazla hücre elde etmek için dilüe edildi. Her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plağa ekim yapıldı. Hücreler, %5 CO² ve %95 nem içeren inkübatörde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besi yeri uzaklaştırıldı.

24 saatlik inkübasyondan sonra 96'lık plağın her kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklendi. Hazırlanan curcumin dozları (5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM) üç tekrarlı olmak üzere astrosit medyuma ilave edildi (100 µl olan besiyeri üzerine 100 µl konsantrasyonu ayarlanan curcumin eklendi). Epilepsi mekanizması oluşturmak için kullandığımız penisilin (300 IU, 500 IU, 1000 IU, 1500 IU ve 2000 IU) dozları da sitotoksik dozun belirlenmesi için plakaya ilave edildi. Madde uygulanan hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat süreli inkübasyondan sonra MTT yöntemi uygulandı.

3.4.2. MTT testi uygulanışı

Test maddeleri ile 37°C'de %5 CO²'de 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen hücre dizisini içeren 96 kuyucuklu mikrolakanın her kuyucuğuna 100 µl MTT çözeltisi eklendi. 37°C, %5 CO² ve %95 nem içeren etüvde 4 saat daha inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon süresinin sonunda MTT çözeltisi atıldı. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Çözünmeyi sonlandırmak için plak yatay çalkalayıcıda 5 dk çalkalandı.

Çalkalama işlemi sonrasında hücreler, mikrolak okuyucu spektrofotometre (Promega) ile 450 nm absorpsiyon değerinde ölçüldü. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre viabilite eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri hesaplandı.

3.4.3. TUNEL Yöntemi ile Apoptozis Belirlenmesi

TUNEL uygulaması için kullanılan apoptoz tarama kiti 11 684 809 910 Roche In Situ Cell Death Detection Kit, AP 'dur. In Situ Cell Death Detection Kit, hücrelerde ve dokularda tek hücre seviyesinde apoptotik hücre ölümünü tespit etmek ve ölçmek için kesin, hızlı ve basit, radyoaktif olmayan bir teknik olarak tasarlanmıştır. -15 — -25°C'de saklanmalıdır.

TUNEL reaksiyonu, apoptozis sırasında üretilen DNA zinciri kırılmalarını tercihli olarak etiketleyerek in situ olarak tanınmalarını sağlar (Gavrieli, Sherman et al. 1992, Kressel and Groscurth 1994). Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. DNA polimerazın yanı sıra

terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) etiketli nükleotidlerin in situ DNA zincir kırıklarına dahil edilmesi için kullanılmıştır. Bu basit ve hızlı prosedürün ana avantajı, DNA zincir kırıklarını etiketlemek için floresan-dUTP kullanılmasıdır. Bu, ikincil anti-floresin-AP konjugatının eklenmesinden önce TUNEL reaksiyonundan hemen sonra floresan mikroskobu ile DNA fragmentasyonunun saptanmasına izin verir.

Deney prosedürü: hücre kültürü \longrightarrow fiksasyon \longrightarrow örneklerin permeabilizasyonu \longrightarrow TUNEL reaksiyon karışımının eklenmesi \longrightarrow Floresan mikroskobu ile örneklerin analizi.

Gerekli solüsyonlar:

- ✓ PBS
- ✓ Fiksasyon Solüsyonu - PBS içinde %4 paraformaldehit (pH: 7,4)
- ✓ Permeabilizasyon Solüsyonu - %0,1 sodyum sitrat içinde %0,1 Triton X-100

3.4.3.1. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemi

50.000 hücre ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra maddeler (Kontrol grubu, Curcumin grubu (5 μ M), Penisilin grubu (1000 IU) ve Curcumin + Penisilin grubu) eklendi. Sonraki gün Besiyeri + PBS + Tripsin'de hücreler ayrı falkonlara toplandı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atıldı, pelletlerin üzerine 100 μ l paraformaldehit eklenerek 5-6 kez pipetajlandı. 5 dk bekletildi. Pozitif lam üzerine fiksasyon solüsyonu dikkatlice yayıldı. 60 dk 15°C – 25°C'de üstü açık şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda lamlar iki kere PBS'e daldırılıp çıkarıldı, kurumaya bırakıldı. Lamaların üzerine 100 μ l permeabilizasyon solüsyonu eklendi ve +4°C'de inkübe edildi.

TUNEL solüsyonu hazırlandı; 4 örnek için, 25 μ l Enzim + 225 μ l Label = 250 μ l. Lamaların üzerine 50 μ l TUNEL solüsyonu eklendi, 60 dk karanlık ortamda 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında üç kez PBS solüsyonunda yıkandı. Kuruduktan sonra flouresan mikroskobunda incelenerek görüntü alındı.

3.5. RT-PCR Analizi

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle çok az

miktarda RNA ile oluşan mesajlar saptanabilir, ekspresyon miktarı da tesbit edilebilir (Santagati, Garnier et al. 1997).

3.5.1. Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu

Kültürden toplanan hücreler 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet üzerine Qiazol trizol reaktifi eklendi, oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. 200 µl kloroform eklenip vortex yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında beklendi. 12000 rpm'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj ardından karışım, aşağıda pembe fenol-kloroform fazına, bir interfaza ve üstte renksiz bir aköz faza ayrılır. RNA yalnızca aköz fazda bulunur. Aköz faz 500 µl izopropanol içeren yeni bir tüpe aktarıldı. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında beklendi. 12000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice atıldı. Pellet üzerine 1 ml Etanol eklenerek vortexlendi. RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için 7500 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin kapakları açık tutularak %70'lik Etanol uzaklaştırılıp RNA pelleti kurumaya bırakıldı. Pellet miktarına bağlı olarak 25 – 30 µl RNase free suda çözüldü. 60°C'de 10 dk bekletildi. -80°C'ye kaldırıldı.

İzole edilen RNA konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü. A260/A280 oranına göre saflıkları belirlendi.

3.5.2. cDNA Dönüşümü

cDNA sentezi için "Thermo Scientific™ RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche) kullanıldı. Çalışma boyunca kitin tüm bileşenleri -20°C'de saklandı. Reaktifleri belirtilen sırayla buz üzerinde steril, nükleaz içermeyen bir tüpe eklendi:

Template RNA	Toplam RNA	1,5 µl
Primer	Oligo (dT) ₁₈ primer	1 µl
Su, nükleaz-free		9,5 µl
Toplam Hacim		12 µl

65°C'de 5 dakika denatüre edildi. Sonrasında buz üzerinde 1 dk bekletildi, spin atırıldı ve tekrar buza koyuldu.

Bileşenler belirtilen sırayla eklendi:

5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl

10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

Pipetlenerek karıştırıldı ve kısa bir süre santrifüj edildi. Oligo(dT) 18 cDNA sentezi için, 42°C'de 60 dakika inkübe edildi. 5 dakika boyunca 70°C'de ısıtılarak reaksiyon sonlandırıldı.

Ters transkripsiyon reaksiyon ürünü, PCR uygulanana kadar (bir haftadan daha az süreyle) -20°C'de saklandı. Daha uzun süreli saklama için -70°C önerilmektedir.

3.5.3. RT-PCR Analizi

cDNA'ya dönüştürülen örnekler A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix Kit kullanılarak Corbett Rotor – Gene 6000 (QIAGEN) cihazında analiz edildi.

Reaksiyon karışımı hazırlanmadan cDNA örnekleri 1/5 oranında nükleaz free ile dilüe edildi.

	20 µl PCR Reaksiyon	10 µl PCR Reaksiyon	Son Kons.
2X qPCR SYBRGreen MasterMix	10 µl	5 µl	1X
ROX Dye (50X)	0.4 µl (0.04µl)	0.2 µl	1X (0.1X)
Forward Primer (10 µM)	0.2 - 2 µl	1 µl	0.1- 1 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.2 - 2 µl	1 µl	0.1- 1 µM
RNase-Free Distile Su	20 µl'ye kadar	2.8 µl	

Reaksiyon döngüsü her örnek için en az iki tekrarlı yapıldı.

PCR Adımı	Sıcaklık (° C)	Zaman	Döngü
İlk Denatürasyon	95	300 sn.	1
Denature	95	10- 30 sn. (15 sn)	25- 40
Anneal (Tavlama)	55- 68 (60)	10- 60 sn. (60 sn.)	
Erime Eğrisi	65- 95	2- 5 sn. / adım	1

Tüm primerler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarından temin edildi. RT-PCR deneyleri için kullanılan primerler Tablo 3.1'de gösterilmektedir. Tüm primerler 5' → 3' yönünde listelendi.

Tablo 3.1. RT – PCR deneylerinde kullanılan primer gen dizileri.

Hedef Gen	Forward primer dizisi	Reverse primer dizisi
CYCLIN-D1	CAGACCAGCCTAACAGATTTTC 21	TGACCCACAGCAGAAGAAG 19
CDK-6	TTGTGACAGACATCGACGAG 20	GACAGGTGAGAATGCAGGTT 20
P21	AGTATGCCGTCGTCTGTTCG 20	GAGTGCAAGACAGCGACAAG 20
BCL-2	ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC 24	AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC 24
BAX	CGGCGAATTGGAGATGAACTGG 22	CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC 24
GAPDH	AACGACCCCTTCATTGAC	TCCACGACATACTCAGCAC

3.6. Total protein izolasyonu

Hücrelerin 6 kuyucuklu steril plağa ekilerek, 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda %80-90 yoğunluğa ulaşmış plak önce serum fizyolojik ile 3 defa yıkandı. 300-500 µl Ripa buffer ile buzun üstünde 3 dk bekletildi. Cell screyper ile hücreler toplandıktan sonra buz içerisinde 30 dk bekletildi. Steril bir ependorfa aktarıldı ve -80°C’de saklandı.

Örnekler -80°C’ den alınarak 37°C’ ye gelene kadar bekletildi. 2 dk maksimum hızla vorteks yapıldıktan sonra 10 dk buzda inkübe edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. 1000 µl’lik pipetle 30 kez dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra 15 dk buzda inkübe edildi, bu işlem 2 defa tekrarlandı. 200 µl’ lik pipetle 30 kez pipetaj yapıldı, ardından 15 dk buzda inkübasyona bırakıldı. 2 dk maksimum hızla vorteks yapılarak 10 dk buzda bekletildi. +4 c’de 16000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant -80°C’ ye kaldırıldı.

3.6.1. Bradford Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin miktar tayini Bradford tekniği kullanılarak yapıldı. 2,5 mg BSA tartıldı. 1 ml steril filtreli distile suda (dH₂O) çözüldü. Ana stoktan 100 µl alınıp üzerine 10 ml dH₂O eklenerek 25 µg’lık standart hazırlandı. 0 µg, 1 µg, 2.5 µg, 5 µg, 12.5 µg ve 25 µg’lık dilüsyonlarda ölçüm yapıldı.

Total proteinden 5µl alınarak üstüne 495 µl dH₂O ile 1/100 sulandırıldı. 1/100 sulandırılmış örnekten 80 µl alınıp 720 µl dH₂O eklendi (1/1000). 200 µl Bradford dye eklenerek 5-10 sn vortekslenildi ve 15 dk inkübasyona bırakıldı. Her örnekten 2 tekrarlı olmak üzere 200 µl alındı ve 595 nm dalga boyunda absorban ölçümleri yapıldı. Standartların absorban/konsantrasyon grafiği elde edildi. Absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.6.2. Western Blot Analizi

Western Blot deneyi İstanbul İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi (İSÜMKAM)'nde yapıldı. Western Blot analizi için jelle yüklenecek örneklerin protein konsantrasyonu BCA assay kit (ThermoFisher, ABD) kullanılarak hesaplandı. BCA analizi için; örnekler 1:10 oranında dilue edildi. Sığır serum albümin (BSA) standartları hazırlandı (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0,0625 mg/ml).

- Kitin içerisinde çıkan Working solution, Reagent A ve Reagent B oranı 1:50 olacak şekilde hazırlandı.
- Örnekler ve standartlardan 25 µl, working solutiondan 175 µl 96 kuyucuklu mikrolaplara pipetlendi.
- Plak, 37°C de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Sonuçlar 562 nm dalga boyunda plak okuyucuda (Thermo Scientific Microplate Reader, ABD) okundu.
- Sonuçlar lineer grafik çizilerek hesaplandı ve her örneğin 35 µg olacak şekilde sulandırılması yapıldı.

Örneklerin hazırlanması: jellerdeki her bir kuyu örnek için 13,5 µl örnek + 13,5 µl 2x Laemmli sample buffer ependorf içine konuldu. Ağız parafilmle kapatılarak 95°C'de 5-10 dk inkübe edildi ve daha sonra örnekler en az 10 dk buz üstünde bekletildi.

- Jeller, Bio-Rad TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit'inin hazırlanış şekline göre hazırlandı.
- Donan jeller tanka yerleştirildi ve 1x Running buffer ile gereken hizaya kadar dolduruldu.
- Hazırlanan jellerdeki kuyucuklara, her bir örnek için 17 µl, protein ladder (BLUltra Prestained Protein Ladder, BIO-HELIX - PM001-0500) için ise 6 µl yükleme yapıldı.
- Yüklenen örnekler Biorad western blot sisteminde 120 mV akımda 1 saat yürütüldü.
- Jeldeki protein örneklerinin yürümesi tamamlandıktan sonra jel aparatındaki camlar birbirinden ayrılarak ve jel kısa süreliğine distile suda bekletildi.
- Transfer işlemi için PVDF membran metonal içerisinde 30 sn bekletilerek aktive olması sağlandı.
- Daha sonra PVDF membran sırasıyla, distile suda 3 dk, transfer bufferda 5 dk bekletilerek hazır hale getirildi.

- Transfer aşaması için kasetin en altına; pad ve onun üstüne gelecek şekilde sırasıyla PVDF membran, jel ve pad konuldu ve 30 dk'lık transfer protokolü seçilerek blotlama işlemi gerçekleştirildi.
- Transfer sonrası membran %5'lik BSA içeren TBS-T içerisinde 37°C'de 1 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.
- 1 saatin sonunda membran TBS-T ile 5'er kez 5 dk yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra %2,5'luk BSA içeren TBS-T içerisine 1:300 olacak şekilde primer antikor ilave edildi ve karışım membranın üzerine konuldu. (Çalışmada kullanılan her bir antikor için bu işlemler tekrar edildi. Kullanılan primer antikorlar: bsm-50185M p38 MAPK (6a1) Monoclonal Antibody, bsm-33199M Cleaved Caspase 3 Antibody, bs-2745R Asetil CoA Carboxylase Antibody, bs-0013R Cytochrome C Antibody, bs-0501R JNK1 + 3 Polyclonal Antibody, bs-4002R Phospo AMPK alpha-1/2 (thr 183/thr 172) Antibody, bs-2210R p38 MAPK (Thr180 + Tyr182) Antibody (Phospho p38), BSM-33236M AMPK alpha-1 Monoclonal Antibody, Bioss Antibodies)
- Membran primer antikor ile +4°C'de bir gece inkübe edildi.
- Bir gece inkübasyonun ardından membran TBS-T ile 3'er kez 10 dk yıkandı.
- Ardından %2,5'luk BSA içeren TBS-T içerisine 1:1000 olacak şekilde sekonder antikor (anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG antikor, Cell signaling Tech., ABD) içeren karışım membrane üzerine konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından membran 3 kez 10'ar dk TBS-T ile yıkandı.
- Görüntüleme işlemi için Western Blotting Luminol Reagent kitindeki (Thermo Fisher, ABD) reagentlardan 3'er ml alınarak falkonda karıştırıldı. Karışım daha sonra, yıkanmış membran ile en az 1 dk. karanlıkta inkübe edildi.
- Antikora ait oluşan bantlar, Vilbert Laurmart Fusion Fx5 cihazında görüntülendi ve değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Yöntemler

Değerler, 96 bağımsız deneyden ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel çalışmada önce varyans analizi ve eşleştirilmemiş t testi (bağımsız örneklem t testi) yapılmıştır. Daha sonra varyans analizindeki anlamlılığın hangisinden kaynaklandığını belirlemek için StatView yazılımı (Abacus kavramları, Berkeley, CA, ABD) kullanılarak post-hoc test yapılmıştır. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

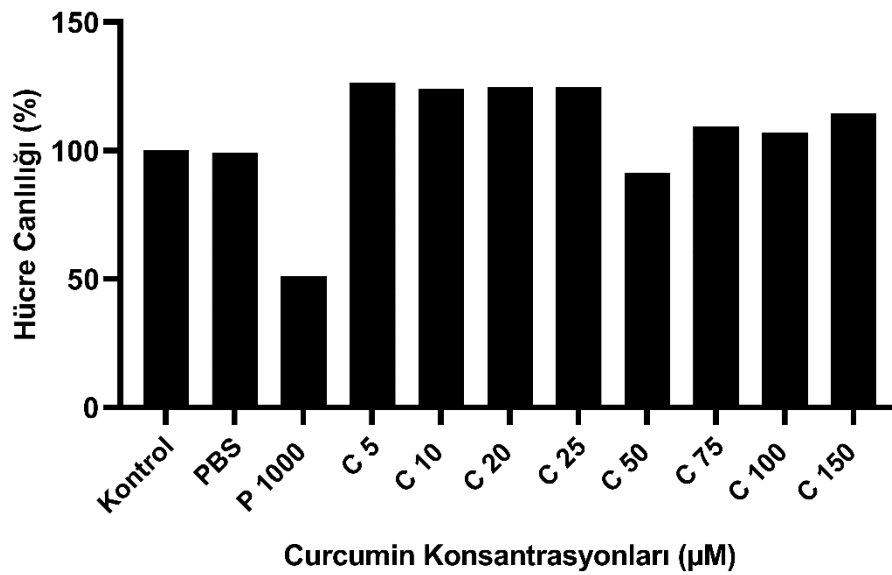
Real-Time PCR cihazı ile her bir gen için elde edilen veriler SPSS (V.11.5) programına aktarılarak istatistiksel analiz yapılmıştır ve GrafikPad Prism (V.8) ile grafikler hazırlanmıştır. Sonuçlar GAPDH housekeeping genine göre normalize edilmiştir.

Western blot sonucu elde edilen protein bantlarının yoğunluğu ImageJ programında bulunan 'Jel Analizi' fonksiyonu kullanılarak kantite edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak housekeeping gen olan β - tubulin kullanılmıştır. Gen ifadesi ve protein miktarındaki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlılıkları parametrik-olmayan Kruskal-Wallis testi ile GrafikPad Prism (V.8) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Buna göre $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

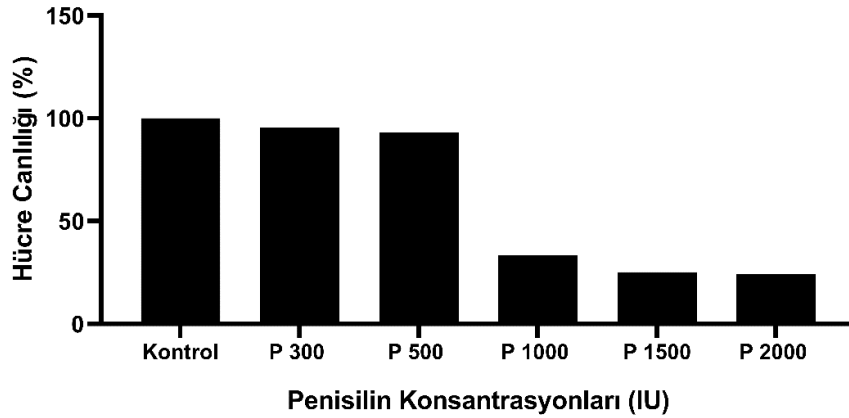
4.1. Curcumin ve Penisilin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda (5 μM 'den 150 μM 'e kadar) curcumin uygulandıktan 72 saat sonra % olarak hücre canlılığı belirlendi. Curcumin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı 5 μM : % 126.5, 10 μM : % 124, 20 μM : % 124.7, 25 μM : % 124.8, 50 μM : % 91.3, 75 μM : % 109.3, 100 μM : % 106.9, 150 μM : % 114.5 saptandı (Şekil 4.1). Curcumin konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı azaldı. Astrosit hücrelerine uygulanacak curcumin konsantrasyonu 5 μM olarak saptandı.



Şekil 4.1. Curcumin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı. $p < 0.05$.

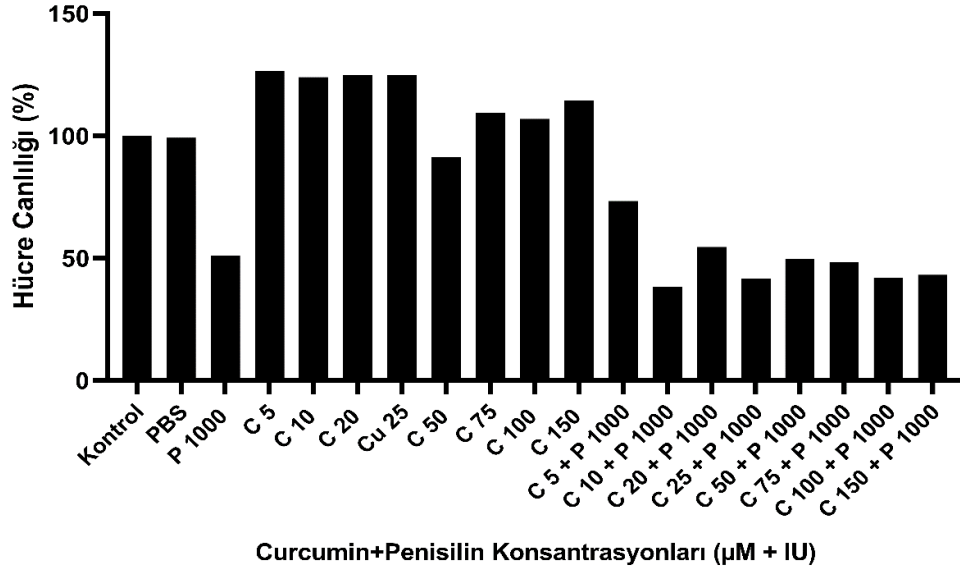
Astroglial hücre hattında penisilinle deneysel epilepsi mekanizması oluşturmak için gerekli toksik penisilin dozunu belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda penisilin uygulandı. Penisilin konsantrasyonlarına göre toksik doz 300 IU: % 95.4, 500 IU: % 93.2, 1000 IU: % 33.4, 1500 IU: % 25.2, 2000 IU: % 24.2 olarak saptandı (Şekil 4.2). Astrosit hücrelerine toksik etkili olan Penisilin konsantrasyonu 1000 IU olarak belirlendi.



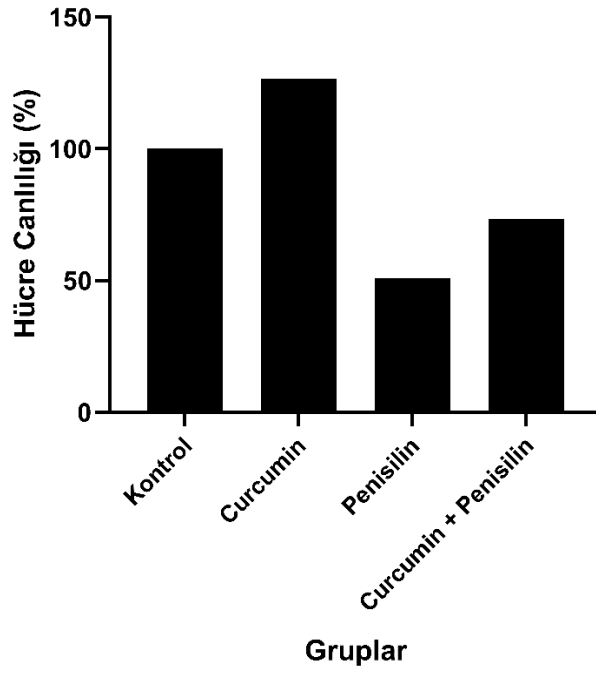
Şekil 4.2. Penisilin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı. $p < 0.05$.

4.2. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

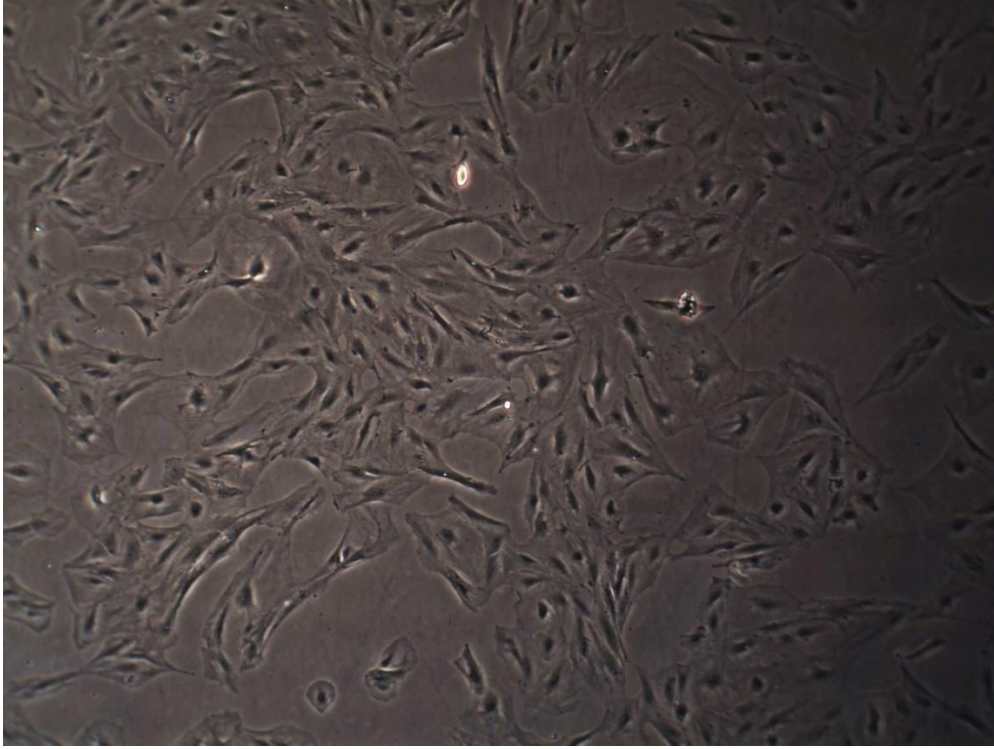
Grupların başlangıçtaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek; 72. saatte hücre canlılığı yeniden değerlendirildi. Hücre canlılığı 72. saatte kontrol grubunda %100.00 iken, curcumin grubunda %126.5, Penisilin grubunda %51, Curcumin + Penisilin grubunda %73.4 bulundu (Şekil 4.4). Penisilin grubunda (Şekil 4.7) hücre canlılığı en düşük olup; kontrol grubuyla (Şekil 4.5) karşılaştırıldığında penisilin grubunda hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$). Hücre canlılığı Curcumin grubunda % 126.5 olup (Şekil 4.6); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Curcumin, Penisilin ve Curcumin + Penisilin (Şekil 4.8) grupları karşılaştırıldığında, Penisilin'in astroglial hücreler üzerindeki dejeneratif etkisinin, koruyucu amaçla curcumin verilmesinin hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 4.3).



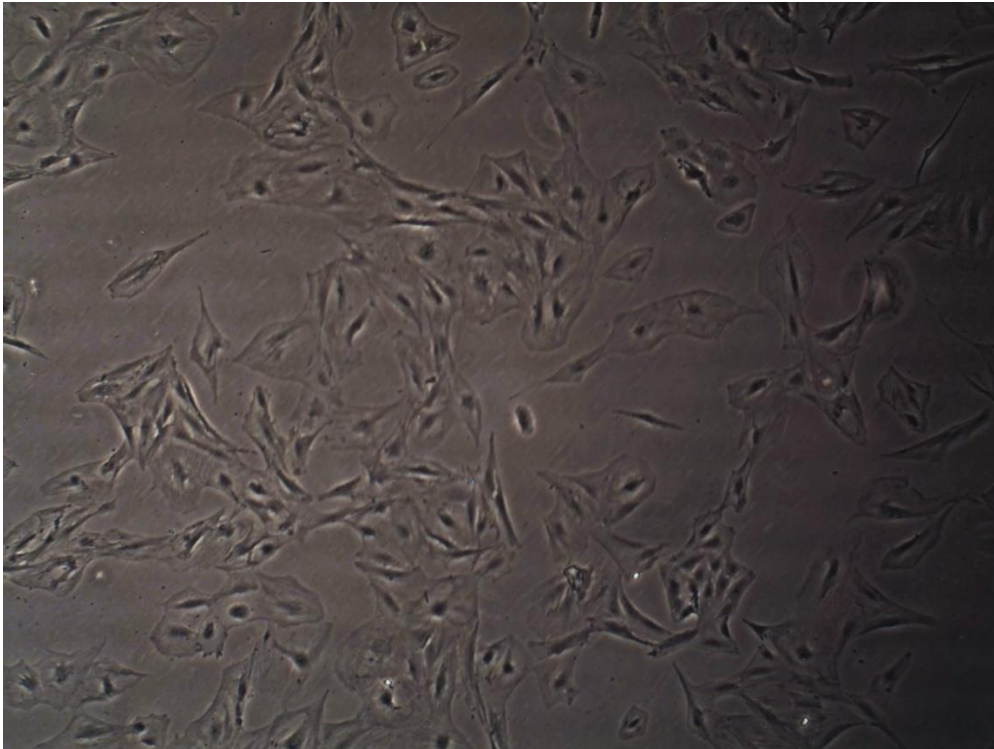
Şekil 4.3. Tüm grupların 72. saatte hücre canlılığı. $p < 0.05$.



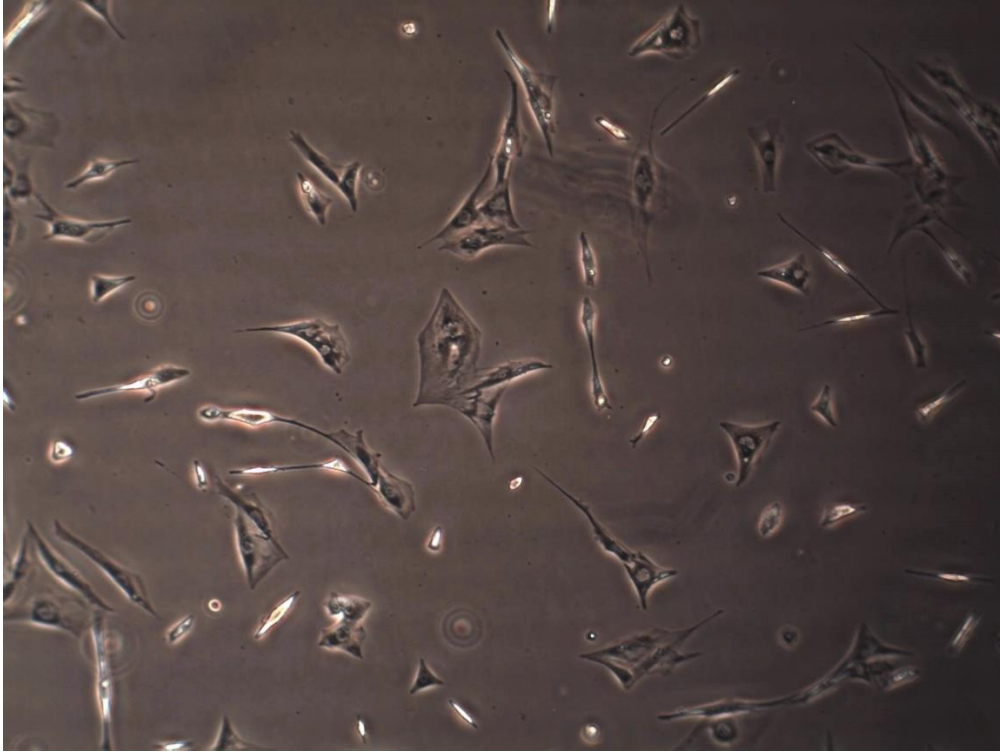
Şekil 4.4 Deneylerde kullanılan grupların 72. saatte hücre canlılığı. $p < 0.05$.



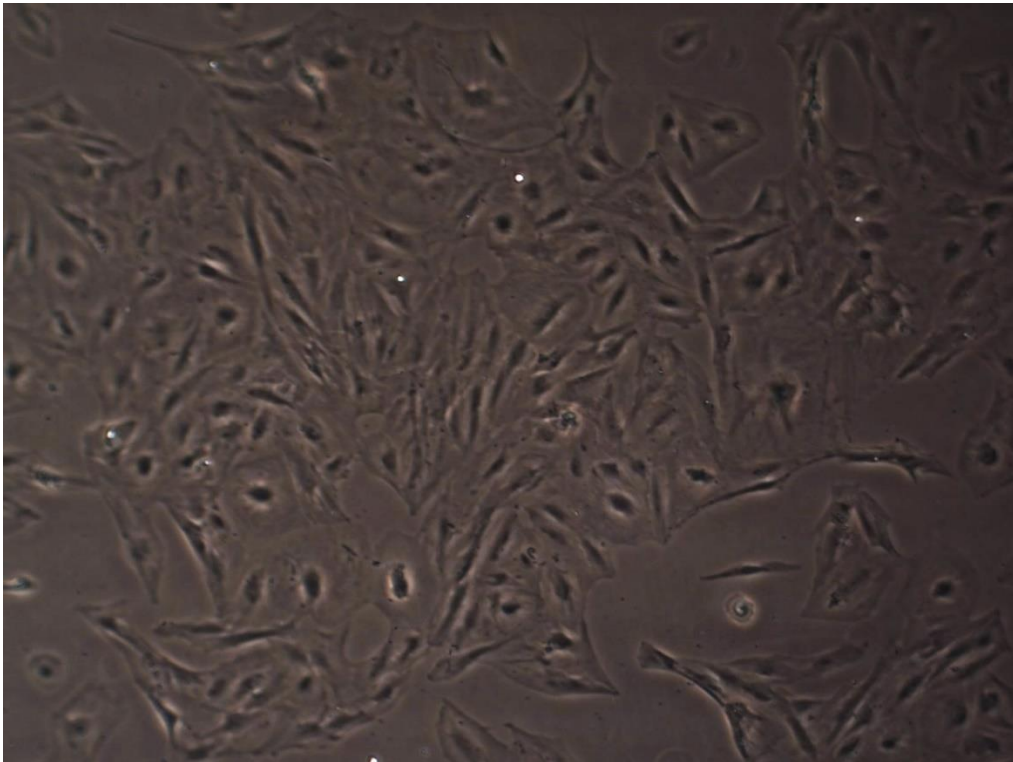
Şekil 4.5. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Kontrol grubu (x40). $p < 0.05$.



Şekil 4.6. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Curcumin grubu (x40). $p < 0.05$.



Şekil 4.7. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Penisilin grubu (x40). $p < 0.05$.



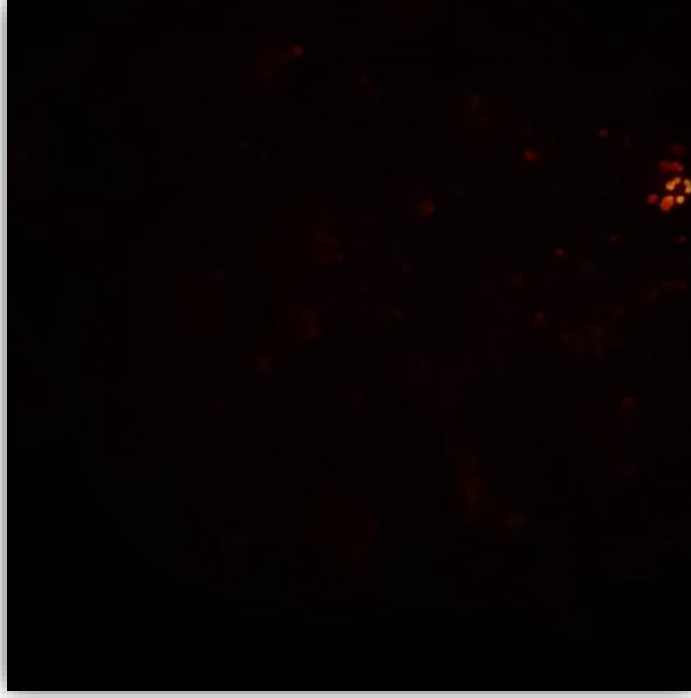
Şekil 4.8. MTT uygulamasında hücre canlılığı. Curcumin + Penisilin grubu (x40). $p < 0.05$.

4.3. Apoptozisin Değerlendirilmesi

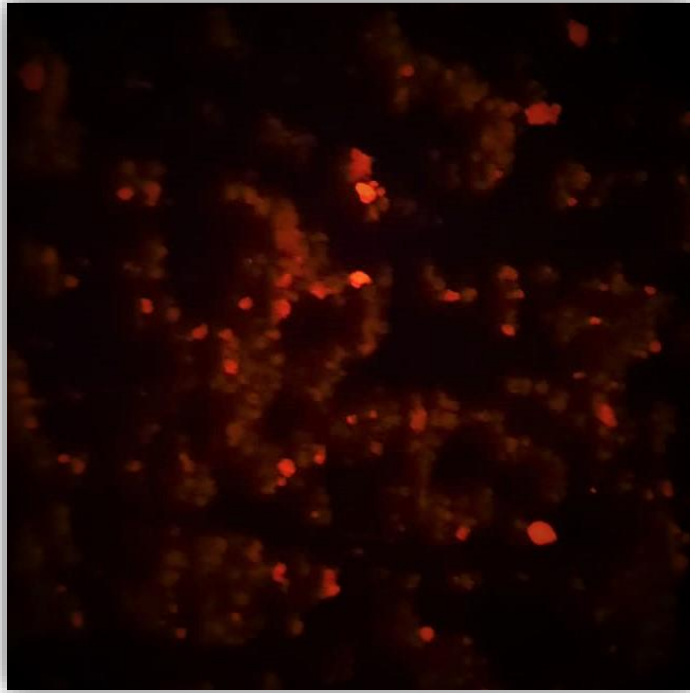
Gruplarda astrosit hücrelerinde apoptozis 24. saatte değerlendirildi (Şekil 9- 12). Apoptozis kontrol grubunda en düşük, penisilin grubunda en yüksekti. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, curcumin grubundaki apoptozis düşüklüğü, curcumin'in koruyucu etkisini destekledi. Penisilin grubundaki yüksek apoptotik etki penisilin'in öldürücülüğünü kanıtladı. Curcumin+penisilin grubundaki apoptotik etki penisilin grubuyla karşılaştırıldığında penisilin'in apoptotik etkisini curcumin'in yüksek oranda engellediğini gördük. Curcumin+penisilin grubu curcumin grubuyla karşılaştırıldığında curcumin'in koruyucu etkisinin penisilin'in toksik etkisini önemli ölçüde azalttığını gösterildi.



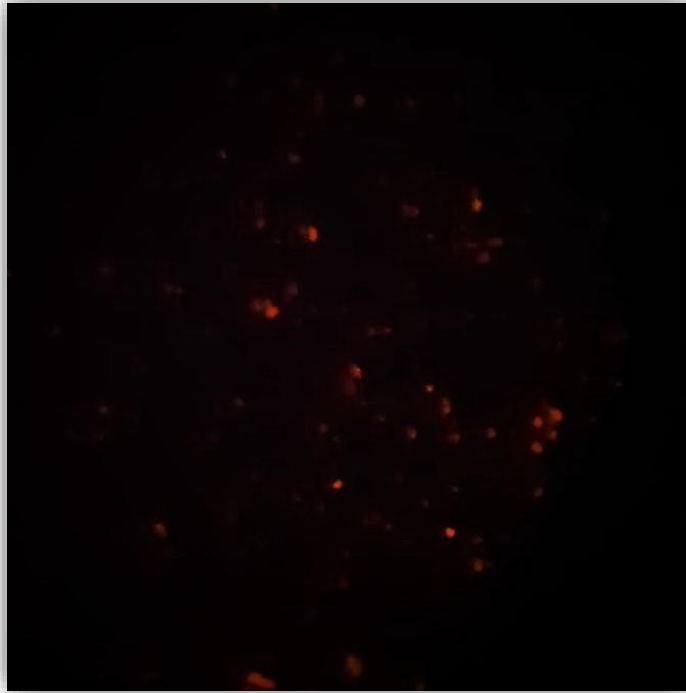
Şekil 4.9. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Kontrol grubu (x40). $p < 0.05$.



Şekil 4.10. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Curcumin grubu (x40). $p < 0.05$.

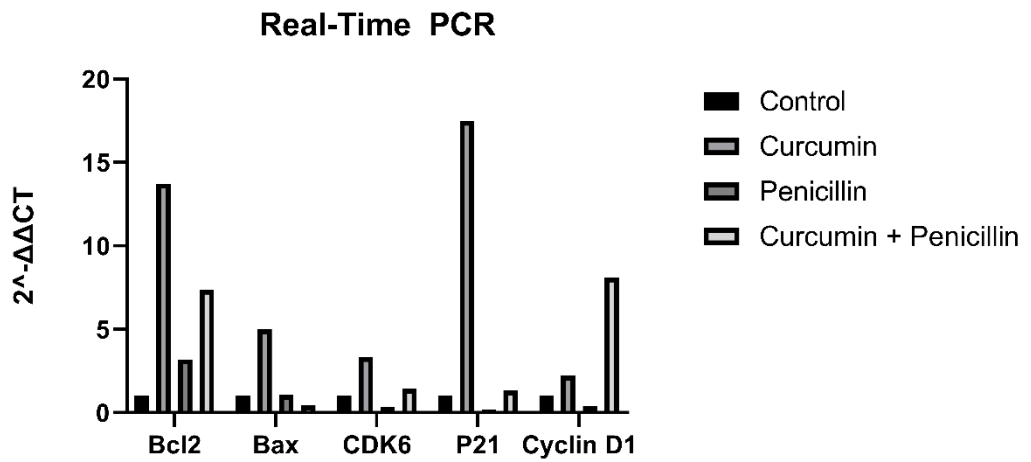


Şekil 4.11. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Penisilin grubu (x40). $p < 0.05$.



Şekil 4.12. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Curcumin + Penisilin grubu (x40). $p < 0.05$.

4.4. RT – PCR Verilerinin Değerlendirilmesi



Şekil. 4.13. RT – PCR deneyi için analizi yapılan genlerin seviyeleri. $p < 0.05$.

Örneklerden elde edilen cDNA'lar ile Bax, Bcl2, CDK6, P21 ve Cyclin D1 seviyeleri, Real-Time PCR cihazı ile "Comparative CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)" analizi yapılarak belirlendi. Real-

Time PCR cihazı ile her bir gen için elde edilen veriler SPSS (V.11.5) programına aktarılarak istatistiksel analiz yapıldı ve GrafikPad Prism (V.8) ile grafikler hazırlandı. Sonuçlar GAPDH'e göre normalize edildi.

Kontrol olarak hiçbir uygulama yapılmayan hücre hatları kullanıldı. Buna göre Hücrelere curcumin tek başına verildiğinde Bcl2 seviyesi en yüksek bulunmuştur. Bcl2 seviyesi Kontrol grubunda en düşük olarak belirlenmiştir. Penisilin verildiğinde, hücrelerdeki Bcl2 seviyesi curcumin verilen gruba göre düşük kalsa da kontrol grubuna göre yükselmiştir. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta Bcl2, curcumin verilen gruba göre daha düşük kalmaktadır fakat bu seviye penisilin verilen gruba göre daha fazla ifade edilmiştir (Şekil 4.13).

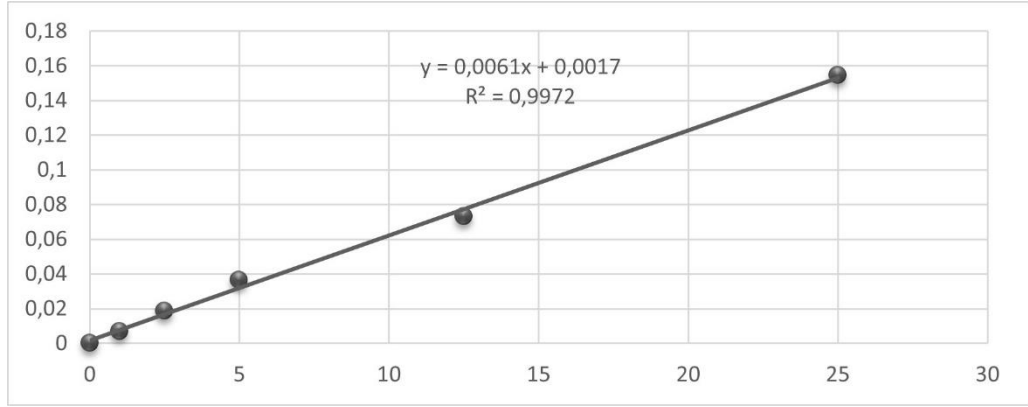
Bax seviyesi kontrol grubuna göre Curcumin grubunda oldukça yüksek seviyelerde ölçülmüştür. Penisilin grubundaki değerler kontrol grubundaki değerlere yakın gözlenmiştir. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta Bax seviyesi penisilin grubuna göre azalmıştır (Şekil 4.13).

Primer astrosit hücre hatlarına yapılan uygulamalarda CDK6 seviyesi en yüksek hücrelere curcumin uygulanan grupta ölçülmüştür. Kontrol grubunda CDK6 seviyesi yaklaşık %800 oranında azalmıştır. Penisilin hücrelerde en düşük seviyede CDK6 ifadesini sağlamıştır. Curcumin ve penisilin birlikte kullanıldığında ise CDK6 seviyesi kontrol grubuna göre daha fazla bir ifade sergilemiştir (Şekil 4.13).

Çalışmada P21 seviyesi en düşük penisilin verilen grupta belirlenmiştir. Curcumin uygulanan grupta en yüksek seviyede olan P21, curcumin+penisilin gruplarında kontrol grubuna göre artmıştır. P21'den farklı olarak Cyclin D1 seviyesi en yüksek curcumin+penisilin grubunda bulunmuştur. Penisilin verilen grup ise en düşük Cyclin D1 seviyesi gösteren gruptur (Şekil 4.13).

4.5. Protein Miktar Analizi Sonuçları

Bradford Yöntemi ile protein miktar analizi yapılan örneklerin ölçülen absorbans değerlerinin analiz grafiği deney için uygun değerlerde bulundu (Şekil 4.14).

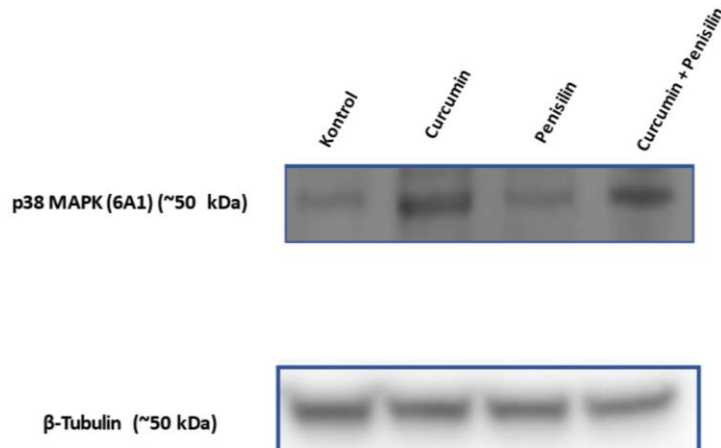


Şekil 4.14. Bradford Deney Sonuçları

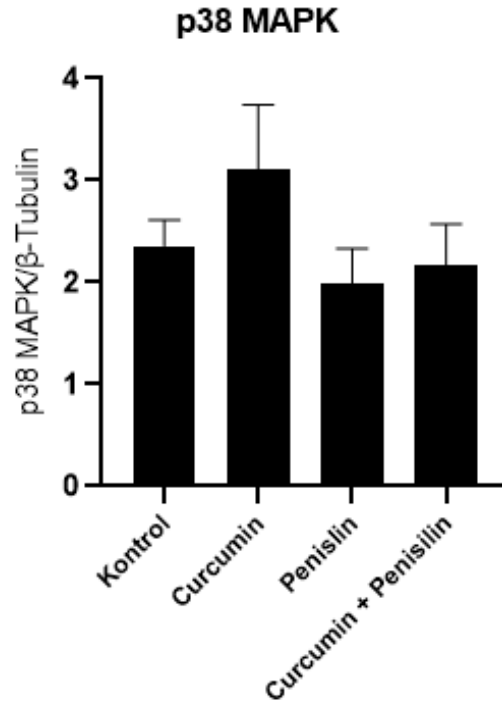
4.5.1. Western Blot Deneyi Sonuçları

Örneklerden elde edilen proteinlerin düzeyleri p38 MAPK, Aktif Caspase 3, Acetyl CoA Carboxylase, Cytochrome C, JNK 1, Phospho AMPK, Phospho p38 ve AMPK alpha 1 ile karşılaştırdı. GrafikPad Prism (V.8) ile grafikler hazırlandı. Sonuçlar β tubulin'e göre normalize edildi.

Kontrol olarak hiçbir uygulama yapılmayan hücre hatları kullanıldı. Hücrelere curcumin tek başına verildiğinde p38 MAPK düzeyi en yüksek olarak belirlenmiştir. Penisilin verildiğinde, hücrelerdeki p38 MAPK düzeyi en düşük olarak belirlenmiştir. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta p38 MAPK düzeyi, penisilin verilen gruba göre daha yüksek, curcumin verilen gruba göre daha düşük ifade edilmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16).

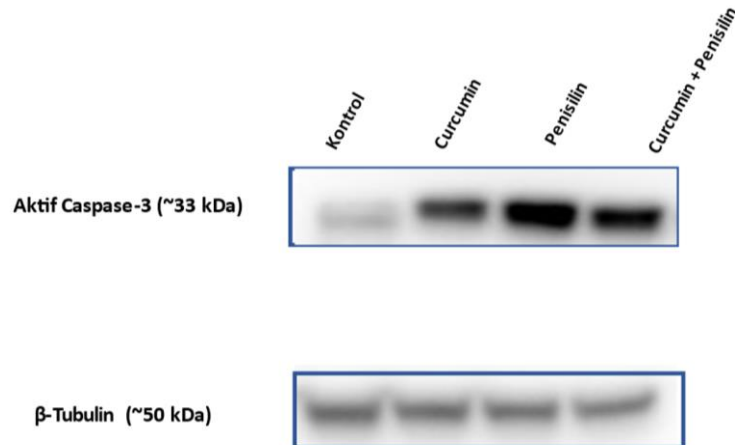


Şekil 4.15. p38 MAPK düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.

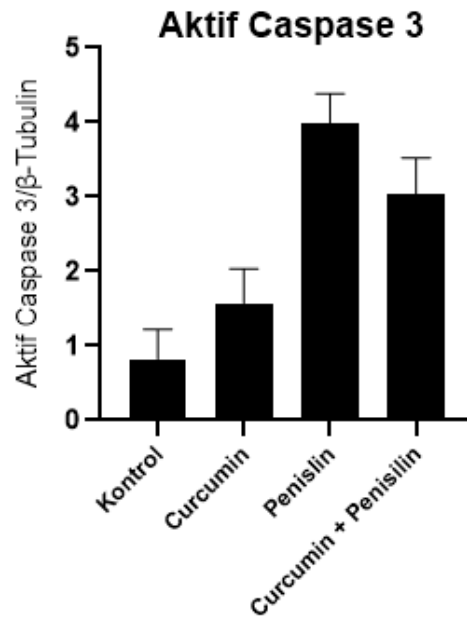


Şekil 4.16. Gruplar üzerinde p38 MAPK düzeyleri. $p < 0.05$.

Primer astrosit hücre hatlarına yapılan uygulamalarda Aktif Caspase-3 düzeyi en düşük kontrol grubunda ölçülmüştür. Hücrelere curcumin uygulandığında Aktif Caspase-3 düzeyi artmıştır. Penisilin hücrelerde en yüksek düzeyde Aktif Caspase-3 ifadesini sağlamıştır. Curcumin ve penisilin birlikte kullanıldığında ise Aktif Caspase-3 düzeyi penisilinden düşük curcumin'den yüksek bulunmuştur (Şekil 4.17, Şekil 4.18).

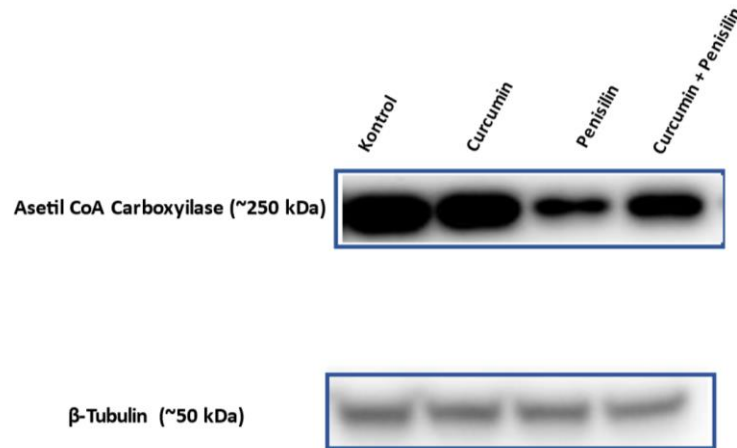


Şekil 4.17. Aktif caspase 3 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.

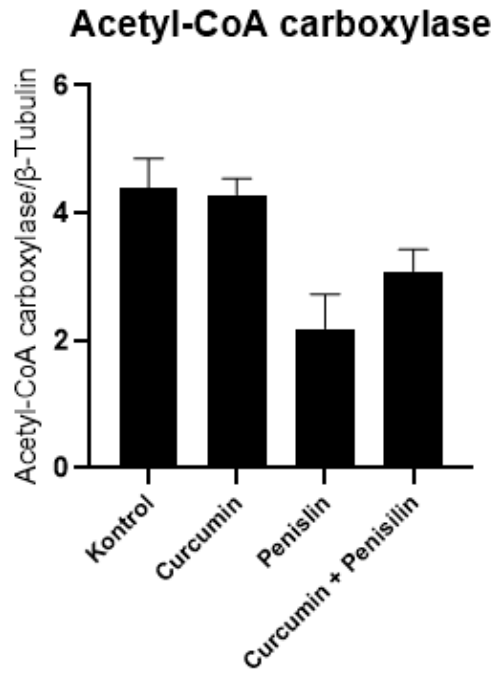


Şekil 4.18. Gruplar üzerinde Aktif caspase 3 düzeyleri. $p < 0.05$.

Asetil CoA Carboxylase düzeyi kontrol grubu ve curcumin grubunda birbirlerine çok yakın ve diğer iki gruba yüksek ölçülmüştür. Penisilin grubundaki değerler en düşük düzey olarak gözlenmiştir. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta Asetil CoA Carboxylase düzeyi kontrol grubu ve curcumin grubuna göre düşük, penisilin grubuna göre ise yüksek bulunmuştur (Şekil 4.19, Şekil 4.20).

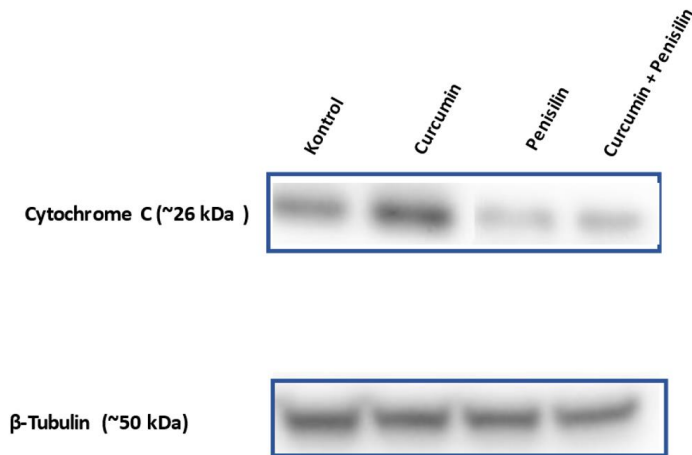


Şekil 4.19. Asetil CoA Carboxylase düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.

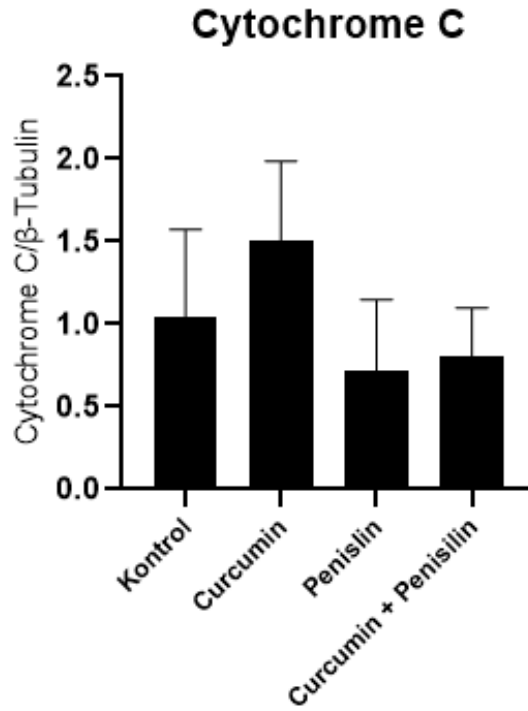


Şekil 4.20. Gruplar üzerinde Asetil CoA Carboxylase düzeyleri. $p < 0.05$.

Cytochrome C düzeyleri Curcumin grubunda en yüksek bulunmuştur. Hücrelere penisilin tek başına verildiğinde Cytochrome C düzeyi en düşük olarak belirlenmiştir. Cytochrome C düzeyi kontrol grubunda, penisilin grubuna göre düşük, curcumin grubuna göre yüksek ölçülmüştür. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta Cytochrome C düzeyi, curcumin verilen gruba göre daha az ifade edilmiştir fakat bu seviye penisilin verilen gruba göre daha yüksek kalmaktadır (Şekil 4.21, Şekil 4.22).

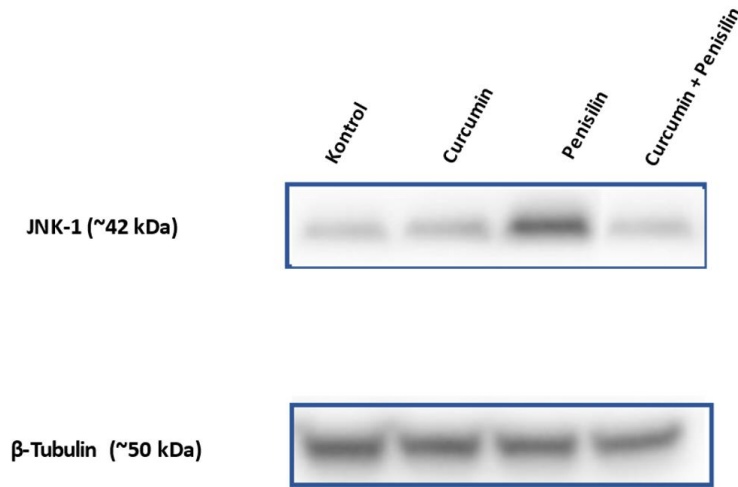


Şekil 4.21. Cytochrome C düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.

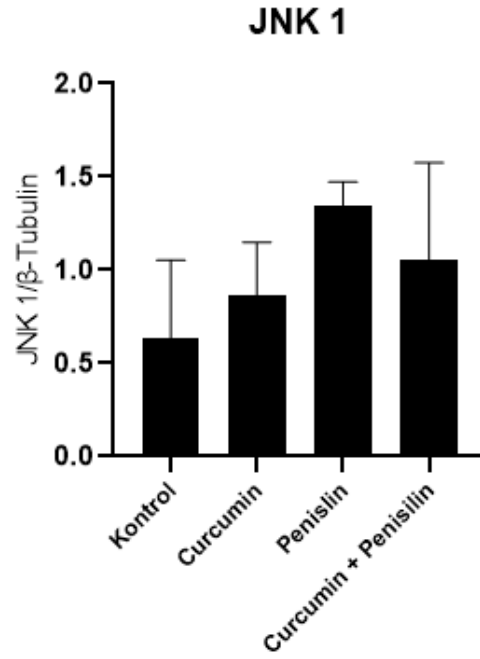


Şekil 4.22. Gruplar üzerinde Ctochrome C düzeyleri. $p < 0.05$.

Çalışmada JNK-1 düzeyi en düşük kontrol verilen grupta belirlenmiştir. Penisilin grubunda en yüksek seviyede olan JNK-1, curcumin + penisilin gruplarında artmıştır. JNK-1 düzeyi en yüksek penisilin grubunda bulunmuştur. Curcumin ve penisilin verilen grup ise penisilinden düşük, diğer iki gruptan yüksek düzeyde JNK-1 gösteren gruptur (Şekil 4.23, Şekil 4.24).

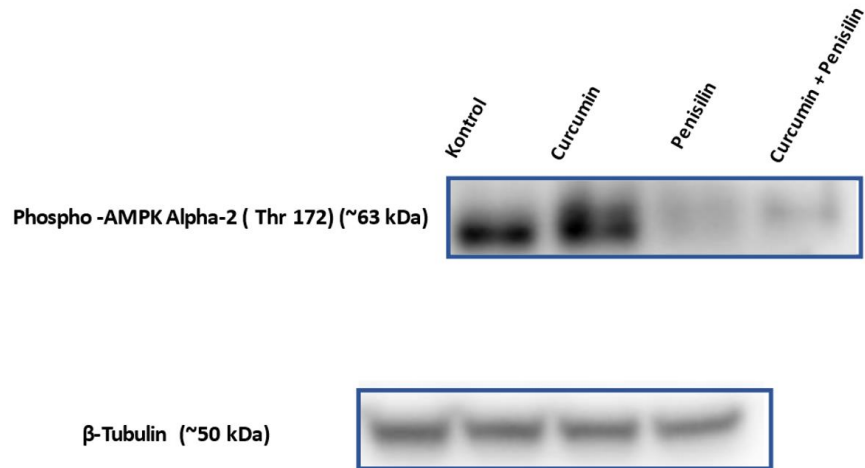


Şekil 4.23. JNK 1 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.

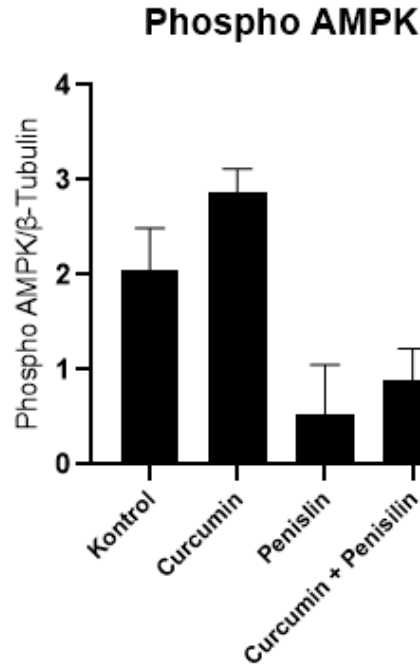


Şekil 4.24. Gruplar üzerinde JNK 1 düzeyleri. $p < 0.05$.

Phospho-AMPK düzeyi curcumin grubunda en yüksek ölçülmüştür. Penisilin grubundaki değerler ise en düşük düzey olarak görülmüştür. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta Phospho-AMPK düzeyi penisilin grubuna göre yüksek, kontrol grubu ve curcumin grubuna göre düşük bulunmuştur (Şekil 4.25, Şekil 4.26).

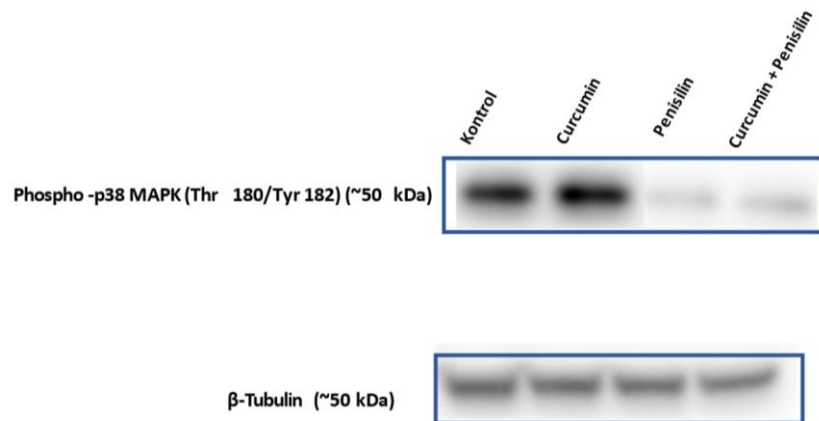


Şekil 4.25. Phospho AMPK düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.

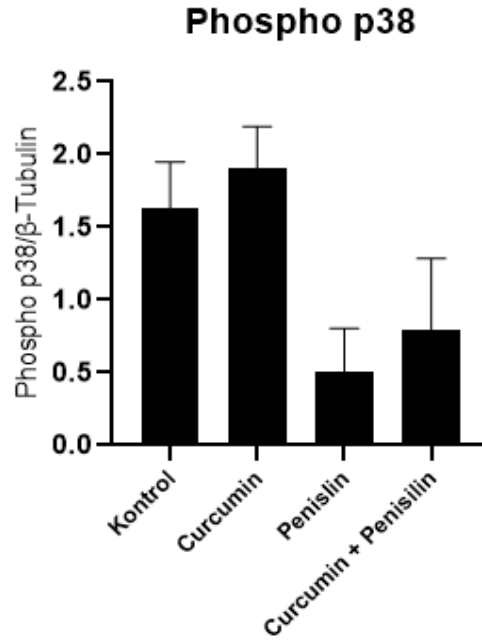


Şekil 4.26. Gruplar üzerinde phospho AMPK düzeyleri. $p < 0.05$.

Phospho-p38 MAPK bulguları, p38 MAPK düzeyi sonuçlarıyla paralel görülmüştür. Curcumin grubunda Phospho-p38 MAPK düzeyi en yüksek olarak belirlenmiştir. Penisilin grubunda ise hücrelerdeki Phospho-p38 MAPK düzeyi en düşük olarak belirlenmiştir. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta Phospho-p38 MAPK düzeyi, penisilin verilen gruba göre oldukça yüksek, curcumin verilen gruba göre daha düşük ifade edilmiştir. Kontrol grubunda Phospho-p38 MAPK düzeyi, curcumin grubundan biraz daha düşük, Curcumin + penisilin ve penisilin gruplarından yüksek ölçülmüştür (Şekil 4.27, Şekil 4.28).

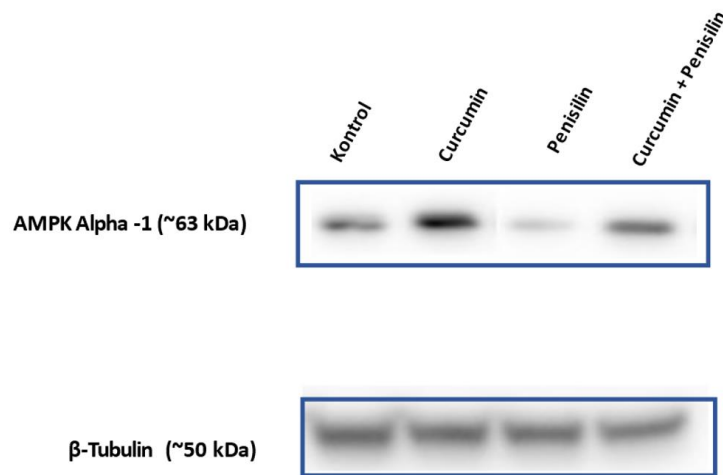


Şekil 4.27. Phospho-p38 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.

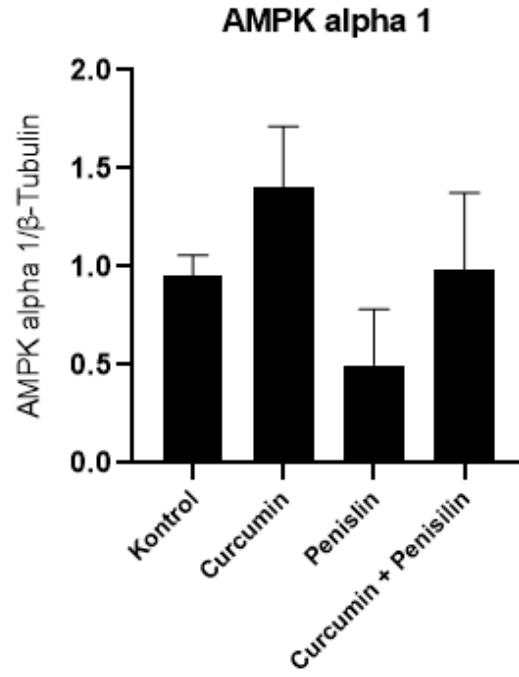


Şekil 4.28. Gruplar üzerinde Phospho-p38 düzeyleri. $p < 0.05$.

AMPK Alpha-1 düzeyi en yüksek curcumin grubunda ölçülmüştür. En düşük düzey Penisilin grubunda görülmüştür. Curcumin ve penisilin birlikte verildiği grupta AMPK Alpha-1 düzeyi penisilin grubuna göre oldukça yüksek, kontrol grubuna çok yakın olmakla birlikte biraz daha yüksek ve penisilin grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur. Curcumin + penisilin birlikte verildiği grupta Phospho-AMPK düzeyi sonuçlarından farklı olarak AMPK Alpha-1 düzeyi, kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen diğer veriler benzerdir (Şekil 4.29, Şekil 4.30).



Şekil 4.29. AMPK Alpha-1 düzeyi ile protein bantlarının yoğunluğunu gösteren jel görüntüsü.



Şekil 4.30. Gruplar üzerinde AMPK Alpha-1 düzeyleri. $p < 0.05$.

5. TARTIŞMA

Bozulmuş astrosit fonksiyonu ve enerji homeostazının epilepsi patogenezinde anahtar rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Xu, Sun et al. 2019). Organik epilepsinin yaygın nedenleri sklerotik ve sklerotik olmayan olarak ikiye ayrılır. Sklerotik hipokampusta eksprese edilen farklı genlerin moleküler düzeyde astrositlerle ilgili çeşitli sinyal yolları üzerindeki etkileri tanımlanmıştır (Lee, Mane et al. 2007). Aslında astrositler, sklerotik dokuda glutamat salınımını başlatır. Glutamat çevredeki nöronları uyarır ve nöbet aktivitesi oluşur.

Hipokampal atrofi, nöronal hücre kaybı ve astrosit hücre proliferasyonu ilk olarak 1880'de sklerotik hipokampusta gösterilmiştir (Tiffany-Castiglioni E 1986). Yale Üniversitesi'nde 151 hastayı kapsayan bir cerrahi seride, orta temporal lob epilepsili (MTLE) hastaların %60'ında skleroz gözlenmiştir. Ancak kitlesel temporal lob epilepsisi (MaTLE) %28 ve paradoksal temporal lob epilepsisi (PTLE) %12 sklerotik olmayan olgulardır. Burada hipokampal atrofisinin nöbetin şiddeti ve süresi ile korelasyon göstermediği görülmüştür (Bezzi, Carmignoto et al. 1998, Tian, Azmi et al. 2005, Lee, Mane et al. 2007).

Özetle astrositler şu şekilde nöbetlere neden olurlar; Astrosit zarında Na⁺ kanalları artar, mRNA iyonotropik glutamat reseptörü-1 (GluR1) glutamata karşı daha duyarlı hale gelir. Glutamat sentetaz aşağı regüle edilir. Nükleer faktör kappa B (NFkB) inflamatuvar reaksiyonda yer aldığı için artar. Sonuç olarak, astrositlerden sklerotik hipokampusta hücre dışı boşluğa kalsiyum bağımlı glutamat salınımı gerçekleşir. Bu nöbeti tetikler.

Çocuklarda yüksek ateş sonucu görülen epileptiform nöbetler, menenjit ve herpes simpleks gibi virüsler de aynı mekanizma ile nöbetlere neden olmuş olabilir. Astrositlerin epileptik nöbetlerde bu şekilde ortaya çıkması, antiepileptik ajan olarak aktif rol oynayabileceğini düşündürür (Ounsted, Glaser et al. 1985, Uesugi, Shimizu et al. 2000, Medzhitov 2001, Bsibsi, Ravid et al. 2002, Carpentier, Begolka et al. 2005).

Ayrıca rezeke edilen sklerotik alandan 2 yıl sonra nöbet remisyonlarının oluştuğu görülmüştür (Lee, Mane et al. 2007). Buradan gideceğimiz sonuç; Sklerotik bölgedeki

hipokampal nöbetlerde, astrositler hipereksitabiliteye katkıda bulunur. Astrositlerin devamsız nöbetlerdeki rolü yakın zamana kadar hala tartışılmaktadır.

Bizim çalışmamızda da primer astrosit hücre hattını seçmemizin sebebi, epilepsi patogeneğinde astrositlerin rolünün yeni çalışmalarda öne çıkmasıdır. Böylece hücre bazında epilepsiyle ilgili moleküler mekanizmanın ortaya konması ve curcumin'in anti-epileptik olarak etkilerinin incelenmesi amaç edinilmiştir.

Tamamı astroglia olarak da bilinen astrositler, beyin ve omurilikteki karakteristik yıldız şeklindeki glial hücrelerdir ve nöron hücrelerinin yaklaşık %30'unu oluştururlar. Kan-beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerinin biyokimyasal olarak desteklenmesi, sinir dokusuna besin sağlanması, hücre dışı iyon dengesinin korunması, travmatik yaralanmalar sonrası beyin ve omuriliğin onarım ve skarlaşma süreci gibi birçok işlevi yerine getirirler. Ayrıca astrositler, başta glutamat, ATP ve gama aminobütirik asit (GABA) olmak üzere çeşitli nörotransmitterler için plazma membran taşıyıcılarını (farklı doku ve organlarda bulunan ve çeşitli hayati işlevleri yerine getiren taşıma proteinleri) ifade ederler. Son zamanlarda astrositlerin veziküler Ca^{+2} bağımlı bir şekilde glutamat veya ATP salgıladıkları gösterilmiştir (Santello and Volterra 2009, Agulhon, Fiacco et al. 2010, Rafalski and Brunet 2011).

Astrositlerin en önemli işlevlerinden biri astrosit-nöron laktat mekiği yardımıyla nöronlara enerji iletmektir. Astrositler, uyarıya yanıt olarak uzun mesafeler boyunca hücreler arası Ca^{+2} dalgaları yayarlar ve nöronlara benzer şekilde, Ca^{+2} bağımlı bir şekilde donörleri (gliotransmitterler olarak adlandırılır) serbest bırakırlar. Veriler, astrositlerin Ca^{+2} bağımlı glutamat salınımı ile nöronlara da sinyal verdiğini göstermektedir (Kimelberg, Jalonen et al. 1993). Kalsiyum yükselmeleri astrositlerde bilinen birincil aktivasyon eksenidir ve bazı astrositik glutamat salınımı türleri için gerekli ve yeterlidir (Twyman, Green et al. 1992, Bennett, Contreras et al. 2003, Akdogan, Adiguzel et al. 2008).

Son araştırmalar, kan beyin bariyerinin korunmasında en önemli unsurların; astrosit hücrelerinin, serebral endotel hücrelerinin sıkı bağlantılara ve bazal laminaya sahip olduğunu göstermiştir (Parpura and Haydon 2000, Newman 2001). Astrositler, iltihaplanma ve yaralanmaya tepki olarak reaktif hale gelir. Bu astrositler, skar oluşturan astrositler ve hipertrofik astrositler olarak iki ana kategoriye ayrılabilir (Khakh, Beaumont et al. 2017). Birçok çalışma reaktif astrositlerin potasyum iyonu alımı, iyon tamponlama, Ca^{+2} sinyali ve uyarıcı nörotransmitter alımı gibi homeostatik fonksiyonları değiştirdiğini vurgulamaktadır (Rossi and Volterra 2009). Nöronlar aktif olduklarında potasyum salgılayarak yerel hücre dışı konsantrasyonu artırırlar. Astrositler potasyuma yüksek oranda geçirgen olduklarından, hücre dışı boşluktaki fazla birikimi hızla temizlerler. Bu

fonksiyona müdahale edilirse hücre dışı potasyum konsantrasyonu artacak ve nöronal depolarizasyona yol açacaktır.

Hücre dışı potasyumun anormal birikiminin epileptik nöronal aktiviteye neden olduğu iyi bilinmektedir (Kimelberg, Jalonen et al. 1993). Astrosit fonksiyonlarının düzenlenmesi Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, iskemik inme ve epilepsi gibi çeşitli beyin patolojilerini etkiler (Siracusa, Fusco et al. 2019).

Yaygın olarak kullanılan bir antibiyotik olan penisilin de nöron hücresinde dejeneratif etki yaratan kimyasal bir ajandır. Bu etkilerden biri, penisilin kimyasal bir konvülzan olmasıdır (Biziere and Chambon 1987, Fisher 1989). Bu, GABAerjik etkiyi azaltarak (Arzimanoglou, Hirsch et al. 2002), uyarıcı glutamaterjik sinir iletimini artırarak (Babb, Brown et al. 1984) veya iyon kanallarında Ca^{+2} ve Na^{+} iletimini aktive ederek nöronal dejenerasyona ve nöron kaybına neden olarak sağlanır (Dam 1982, Heath and Shaw 2002). Glutamat eksitotoksitesinin nöronal stres ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Tomiyama, Kimura et al. 2001, Nakamura, Negishi et al. 2005). Astrosit hücre ölümünde GABAerjik etki önemlidir (Arzimanoglou, Hirsch et al. 2002). Artmış uyarıcı glutamaterjik nörotransmisyon ve iyon kanallarında aktive Ca^{+2} ve Na^{+} transmisyonu da astrosit hücre ölümünün mekanizması olabilir (Dam 1982, Bagirici, Gokce et al. 1999, Arzimanoglou, Hirsch et al. 2002, Heath and Shaw 2002, Nakamura, Negishi et al. 2005).

Bizim çalışmamızda da penisilin ile astrositlerin destrüksiyonu planlanmıştır. Penisilin astrositlerde glutamat eksitotoksitesi ile astrosit hücresel stresine sebep olup, astrosit ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca artmış glutamat ve azalmış GABAerjik etki sonucunda iyon kanallarında Ca^{+2} ve Na^{+} iletimini aktive ederek astrosit ölümüne sebep olacağı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, glutamat ve GABA aracılı sinaptik mekanizmalardaki eksiklikler, glutamat/GABA oranını bozmaktadır. Özellikle, glutamat seviyesi, hasara bağlı depolarizasyon yoluyla glutamat salınımı, xc (-) yoluyla abartılı glutamat salınımı ve EAAT'ler yoluyla azaltılmış glutamat alımı veya azalma dahil olmak üzere çeşitli etiyolojilerin neden olduğu GABA ile karşılaştırıldığında nispeten yüksektir. GABA salınımı ve ardından glutamat salınımında artış, glutamat ve GABA arasındaki dengesizlik, birkaç nöron ölümü mekanizmasından biri olan eksitotoksiteyi tetikleyebilir.

Yukarıdaki mekanizma birçok nörodejeneratif hastalıkta olduğu gibi epilepside de ortak mekanizmadır. Birçok çalışmada antioksidanların dejeneratif hastalıklarda ve epilepside koruyucu olduğu ortaya konulmuştur. Curcumin'in de dejeneratif hastalıklarda koruyucu etkisi çalışılmıştır. Fakat astrositler üzerindeki canlılığı etkileme konusunda ve benzer mekanizmalar ile oluşturulan hücresel epilepsi modelinde antiepileptik etkisi ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Curcumin güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar moleküldür (Ak and Gülçin 2008)((Barclay, Vinqvist et al. 2000, Menon and Sudheer 2007, Desai and Patravale 2018). Curcumin'in yapısındaki fenolik ve metoksi gruplar serbest radikallerle tepkimeye girerek fenoksil radikali oluşturmaktadırlar. Curcumin'in antioksidan etkisi, birincil metaboliti tetrahidrocurcuminin, antioksidan β diketo etki ile 2 karbonil arasındaki aktif metilen karbonundaki C-C bağına yıkması ile ortaya çıkar. Curcumin'in diğer hasar veren hidroksil radikalleri ya da peroksinitrit üzerindeki etkisi tam olarak açıklanamamıştır. Kronik inflamasyon ve sitokinler, Nitrik Oksit (NO) sentezini uyararak DNA hasarına ve kansere yol açan peroksinitrit ve nitrit oluşumuna yol açmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada curcumin'in, NO sentezini baskıladığı gösterilmiştir. Curcumin'in hücrel oksidatif stres'i baskılamasının ana mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da, glutatyon redüktaz ya da bazı antioksidatif enzimler aracılığıyla yüksek glukoz değerlerinde oksijen radikallerini etkisiz hale getirdiği belirtilmektedir (Brouet and Ohshima 1995, Zhang, Altorki et al. 1999, Hong, Bose et al. 2004).

Kronik ve akut enflamasyonda TNF- α ve IL-1 önemli rol oynamaktadır. İn vitro olarak 5 μ M konsantrasyonda curcumin uygulanmasının, insan monositik makrofaj hücrelerinde lipopolisakkarit-indüklü TNF- α ve IL-1 üretimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Aynı konsantrasyonda LPS-indüklü NF- κ B aktivasyonunu da inhibe ettiği ve L929 fibroblast litik testinde TNF'nin biyolojik aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Organization 1999). Bizim çalışmamızda kullandığımız curcumin konsantrasyonu da sitotoksikite testi ile 5 μ M olarak belirlenmiştir.

Curcumin'in, pentilentetrazol-indüklü oksidatif hasar ve bilişsel bozukluklardaki etkisinin incelendiği çalışmanın sonuçlarına göre curcumin ön tedavisi nöbetleri iyileştirmiş, pentilentetrazol-indüklü oksidatif stresi ve bilişsel bozuklukları düzeltmiştir (Gupta, Kumar et al. 2003).

Epilepsi ve nöbet bozukluklarının iki temel patofizyolojik özelliği, nöroinflamasyon ve oksidatif strestir. (Huang, Chi et al. 2017, Wyatt, Witt et al. 2017). Uzun süreli nöbetler, mikrogliya ve astrositleri aktive edebilir (Vezzani, French et al. 2011). Nitekim bu proinflamatuvar sitokinler ve diğer nöroinflamatuvar belirteçler hem deneysel epilepsi modellerinde hem de insan klinik vakalarında görülebilmektedir (Koh 2018). Nöroinflamasyon, bazı fokal başlangıçlı ilaca dirençli epilepsilerde görülen bir faktördür (Terrone, Salamone et al. 2017). Önceki çalışmalar, antiinflamatuvar moleküllerin epilepsi tedavisinde yararlı olduğunu desteklemektedir (Dhir, Naidu et al. 2007, Akula, Dhir et al. 2008).

Siklooksijenaz (COX) inhibitörleri, özellikle öncelikli veya seçici COX-2 inhibitörleri gibi antiinflamatuvar moleküller, epilepsi hayvan modellerinde kontrol grubuna göre nöbet başlangıcını arttırmıştır (Dhir, Naidu et al. 2006). Curcumin; COX-2,

lipoksijenaz ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS) gibi farklı inflamatuvar belirteçlerin ekspresyonunu inhibe edebildiği için epilepsi ve ilgili bozukluklarda faydalı olabilir (Menon and Sudheer 2007).

Literatürde curcumin'in güçlü antioksidan özelliğini epilepsi bozukluklarıyla ilişkili olarak gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Curcumin, *Drosophila melanogaster* (en az 7 gün boyunca 0.2 ve 1.0 mg/g diyet), sineklerinin ömrünün uzamasına kısmen katkıda bulunabilecek bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerini yükseltmiştir (Akinyemi, Oboh et al. 2018). Kronik pentilentetrazol (PTZ) verilen hayvanlarda, hem GFAP (glial fibriler asidik protein, astrositik aktivasyon için bir biyobelirteç) hem de Iba-1 (mikroglial aktivasyon için bir biyobelirteç olan iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü 1) ekspresyonu artmıştır (Kaur, Patro et al. 2015). Ayrıca, beynin hem korteks hem de hipokampus bölgelerinde sitokinlerin (interlökin 1 β , interlökin 6 ve tümör nekroz faktörü alfa gibi) ve kemokinlerin (monosit kemoatraktan protein 1 gibi) ekspresyonunda bir artış görülmüştür (Kaur, Patro et al. 2015). Curcumin, 40 gün boyunca günlük 100 mg/kg dozunda uygulanmış, sitokinlerin ve kemokinlerin seviyelerini düşürmüştür. GFAP-1 ve Iba-1 belirteçlerinde belirgin bir şekilde azalma olması, curcumin'in anti-inflamatuvar etkisini göstermektedir (Kaur, Patro et al. 2015). PTZ kindling epilepsi modelinde, curcumin (50-200 mg/kg po), hem malondialdehit (MDA) hem de glutasyonun yüksek seviyelerini azaltarak antioksidan özellik göstermiştir (Agarwal, Jain et al. 2011). Ezz, Khadrawy ve Noor (2011), pilokarpin uygulanan sıçanlara 21 gün boyunca 80 mg/kg po dozunda curcumin uygulayarak, curcuminin anti-nöbet veya anti-epileptik etkisi için faydalı olan bir antioksidan olduğunu ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir (Ezz, Khadrawy et al. 2011).

Oksidatif stres hücrede mitokondriyal disfonksiyona ve apoptosise yol açarak kanser, mutasyon, kalp ve dolaşım bozuklukları, fertilité sorunları, akciğer fonksiyonlarında bozukluk ve bağışıklık sisteminde olumsuz etkilere yol açmaktadır (Sharma and Singh 2010, Aktas, Kanter et al. 2012). Antioksidanlar serbest radikalleri içeren kimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkan hücre hasarları önlemektedir (Young and Woodside 2001).

Curcumin, oral yolla alındığında bağırsaklarda hidrojenizasyon yolu ile tetrahidrocurcumin'e dönüşerek emilir ve kana dağılır, safra yoluyla atılır (Pan, Huang et al. 1999, Anand, Kunnumakkara et al. 2007). Curcumin, büyümesi inhibe edilmiş hücreleri restore ederek apoptosise'i engeller. Antioksidan özelliğinin fenolik yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir (Sharma 1976). Curcumin antihepatotoksik, antihiperlipidemik, antiinflamatuvar, antitümoral, antimikrobiyal ve antiinfertilité etkilerine sahiptir (Ramsewak, DeWitt et al. 2000, Baum and Ng 2004, Chen, Tang et al. 2006, Pérez-Arriaga, Mendoza-Magana et al. 2006).

Curcumin'in koruyucu etkilerini araştıran çok fazla sayıda çalışma vardır. Karaciğerde karbon tetraklorid (hepatotoksin) (Lee, Kim et al. 2016), kalp ve bbrenkte adriamisin (kemoterapotik) (Venkatesan, Punithavathi et al. 2000), iris dokusunda streptozotosin (antineoplastik) (Patumraj, Wongeakin et al. 2006), akciğerde benzopiren (evresel karsinojen) (Zhu, Cromie et al. 2014) ve kanda nitrojen dioksit'e (toksik bir gaz) (Unnikrishnan and Rao 1995) karşı koruyucu etkilerini gösteren çalışmalar bunlardan birkaçıdır.

Curcumin'in antioksidan ve akut anti-nöbet potansiyeli Du ve ark. tarafından da gösterilmiştir (Du, Eid et al. 1995). Sıçanlara, pilokarpin nöbetlerine karşı 100 ve 300 mg/kg dozlarında curcumin uygulanarak antikonvülsan etkisi belirtilmiştir. Bu modelde curcuminin antikonvülsan potansiyelinin, özellikle NOS enzimi üzerindeki etkisini modüle edebilen antioksidan özelliğinden kaynaklandığı vurgulanmıştır (Peng, Tang et al. 2012). Pilokarpin uygulanan sıçanlarda, MDA, NOS ve laktat dehidrojenaz düzeylerinde bir artış, glutatyon ve süperoksit dismutaz düzeylerinde azalma belirlenmiştir. Curcumin uygulaması, bu sıçanlarda MDA seviyeleri hariç, değişen tüm oksidatif stres parametrelerini tersine çevirmiştir (Peng, Tang et al. 2012).

Benzer şekilde, curcumin (50-200 mg.kg-1.ml-1), doğum sonrası 20 günlük sıçanlarda lityum-pilokarpin hayvan modelinde nroprotektiftir (Ahmad 2013). Pilokarpin bir kolinerjik agonisttir. Curcumin'in lityum-pilokarpin kaynaklı status epileptikus'ta nöbet önleyici etkisi tam olarak anlaşılamamıştır; bununla birlikte, curcuminin antioksidan özelliği bu tür etkilerden sorumlu olabilir. Curcumin'in, düşük glutatyon seviyelerindeki azalmayı hafifletmesi (Ahmad 2013), güçlü antioksidan potansiyelini göstermektedir.

Curcumin, anti-inflamatuar ve antidiyabetik dahil olmak üzere canlılar için faydalı olan çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir (Tian, Wang et al. 2008). alışmalar, curcumin'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve çeşitli tümörlerde apopitozu indüklediğini bulmuştur. Ayrıca, curcumin'in otofajiye bağlı hücre ölümünü arttırdığı ve lizozomal membran geçirgenliği ilaçlı otofaji veya lncRNA'yı aşağı yönde regüle ederek hücre apopitozunu indüklediği bildirilmiştir (Seo, Woo et al. 2018).

BCL2 geni tarafından insanlarda kodlanan Bcl2 (B hücreli lenfoma 2), ya inhibe ederek (anti-apoptotik) ya da indükleyerek hücre ölümünü (apopitoz) düzenleyen bir gendir (Tsujiimoto, Finger et al. 1984). Bcl2 genindeki hasar, melanom, meme, prostat, kronik lenfositik lösemi ve akciğer kanseri dahil olmak üzere bir dizi kanserin nedeni ve olası bir şizofreni ve otoimmünite nedeni olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda kanser tedavilerine direnç nedenidir (García-Aranda, Pérez-Ruiz et al. 2018).

Çalışmamızda curcumin verilen grupta Bcl2 seviyesi oldukça yüksek çıkmıştır. Hem apopitopik hem de anti-apopitopik olarak davranan bu genin curcumin varlığında aktive olduğu görülmüştür. Aynı zamanda penisilin verilen grupta da kontrol grubuna

göre artan Bcl2 seviyesi, hem curcumin hem penisilin verilen grupta penisilin verilen gruba göre yükselmiştir.

Chiu, Tsung-Lang, ve Chin-Cheng Su 2009'da yaptıkları çalışmada curcumin uygulandığı meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-231) Bcl2 seviyesini arttırarak proliferasyonu engellemiştir (Chiu and Su 2009). Bu sonuçlar çalışmamızı desteklemektedir. Qian-Mei Zhou, ve arkadaşları 2017 tarafından yapılan çalışmada da Mitomisin-C ile uygulanan curcumin MCF-7 hücrelerinde Bcl2 seviyesini azaltmıştır (Zhou, Sun et al. 2017). Bu çalışmadaki sonuçların aksine azalan Bcl2 seviyesi kanser hücrelerindeki durumu ile açıklanabilir. Bu çalışmada farklı dozlarda curcumin kullanılmıştır. Buna göre farklı konsantrasyonlarda curcumin'in Bcl2 seviyesini arttırma ya da azaltma özelliği gösterdiği açıktır. Başka bir çalışmada, curcumin, insan larinks kanseri hücrelerinin Bcl-2 ve PI3K protein ekspresyonunu ve fosfo (p)-Akt protein ekspresyonunu azaltmıştır. (Mou, Zhou et al. 2017).

Bcl-2 benzeri protein 4 olarak da bilinen apoptoz düzenleyici BAX, insanlarda BAX geni tarafından kodlanan bir proteindir. BAX, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. BCL2 ailesi üyeleri, hetero- veya homodimerler oluşturur ve çok çeşitli hücrel aktivitelere yer alan anti- veya pro-apoptotik düzenleyiciler olarak işlev görür. Bu protein, BCL2 ile bir heterodimer oluşturur ve apoptotik bir aktivatör olarak işlev görür. Bu proteinin, mitokondriyal voltaja bağlı anyon kanalı (VDAC) ile etkileşime girdiği ve açılmasını arttırdığı rapor edilmiştir, bu da membran potansiyelinde kayba ve sitokrom c'nin salınmasına yol açar. Bu genin ekspresyonu, tümör baskılayıcı P53 tarafından düzenlenir ve P53 aracılı apoptoza dahil olduğu gösterilmiştir. (Fagerberg, Hallström et al. 2014).

Çalışmamızda Bax seviyesi en yüksek curcumin verilen gruplarda çıkmıştır. Wenliang Zha ve arkadaşlarının 2018'de yaptığı çalışmada Bax seviyesi Streptozotosin ile indüklenerek yapılan diyabet modelinde curcumin, çalışmamızın aksine sonuçlar vermiştir. Çalışmada Bax seviyesi curcumin verilen gruplarda yüksek oranda düşmüştür. Curcumin'in, mitokondriye bağlı apoptozun inhibisyonu yoluyla potansiyel olarak koruyucu etki uyguladığını belirtmişlerdir (Zha, Bai et al. 2018). Başka bir çalışmada, bizim çalışmamızı destekler nitelikte curcumin Bax seviyesini yükseltmiştir (Lv, Liu et al. 2014). Çalışmamızda penisilin Bax seviyesini curcumin verilen gruba göre azaltmıştır. Yapılan bir çalışmada penisilin ile indüklenen insan meme kanseri hücrelerinde Bax seviyesi çalışmamızın aksine yüksek bulunmuştur (Fakhrabadi, Rabbani-Chadegani et al. 2020).

Hücre bölünmesi protein kinaz 6 (CDK6) geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Siklinler tarafından, daha spesifik olarak Siklin D proteinleri ve Sikline bağımlı kinaz inhibitör proteinleri tarafından düzenlenir. (Meyerson and Harlow 1994). Bu gen

tarafından kodlanan protein, CDK4'ü içeren sikline bağımlı kinaz (CDK) ailesinin bir üyesidir. CDK ailesi üyeleri, *Saccharomyces cerevisiae cdc28* ve *Schizosaccharomyces pombe cdc2*'nin gen ürünlerine oldukça benzerdir ve R veya kısıtlama noktası olarak adlandırılan düzenleme noktasında hücre döngüsü ilerlemesinin önemli düzenleyicileri oldukları bilinmektedir (Diaz-Moralli, Tarrado-Castellarnau et al. 2013).

Bu kinaz, hücre döngüsünün G1 fazı ilerlemesi ve G1/S geçişi için önemli olan protein kinaz kompleksinin katalitik bir alt birimidir ve kompleks ayrıca bir aktive edici alt birimden oluşur (Lim and Kaldis 2013). Bu kinazın aktivitesi ilk olarak, D-tipi siklinler ve CDK inhibitörlerinin INK4 ailesinin üyeleri dahil olmak üzere düzenleyici alt birimler tarafından kontrol edilen orta G1 fazında ortaya çıkar. Bu kinazın yanı sıra CDK4'ün fosforile olduğu ve böylece tümör baskılayıcı Retinoblastoma proteininin aktivitesini düzenlediği ve CDK6'yı kanser gelişiminde önemli bir protein haline getirdiği gösterilmiştir (Lim and Kaldis 2013).

Çalışmamızda curcumin primer astrosit hücrelerinde CDK6 seviyesini yükseltmiştir. Penisilin verilen hücrelerde ise CDK6 seviyesi oldukça düşmüştür. Hua-qiang ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada curcumin'in MCF-7 hücrelerinde CDK6 seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir (Li, Jin et al. 2012). Çalışmamızdan farklı olan bu sonuçlar kanser hücrelerinin durumu ile açıklanabilir.

Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1 veya CDK ile etkileşime giren protein 1 olarak da bilinen p21, tüm siklin/CDK komplekslerini inhibe edebilen bir sikline bağımlı kinaz inhibitörüdür (CKI), ancak öncelikle CDK2'nin inhibisyonu ile ilişkilidir (Abbas and Dutta 2009). p21, p53 aktivitesinin ana hedefini temsil eder ve bu nedenle DNA hasarının hücre döngüsü durmasına bağlanmasıyla ilişkilidir (El-Deiry, Tokino et al. 1993). Bu protein insanlarda kromozom 6 (6p21.2) üzerinde bulunan CDKN1A geni tarafından kodlanır (Fagerberg, Hallström et al. 2014).

P21 seviyesi çalışmamızda curcumin verilen grupta kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca penisilin verilen gruptaki P21 seviyesi yok denecek kadar düşük çıkmıştır. P21 seviyesi, penisilin curcumin ile verildiği primer astrosit hücrelerinde, kontrol grubu ve penisilin grubuna göre yüksek fakat curcumin verilen gruba göre düşük çıkmıştır. Bu durum P21'in curcumin tarafından penisilin apoptotik etkisinin azaltıldığını ortaya çıkartmıştır. Çalışmamızın aksine bir çalışmada, prostat kanser hücrelerinde curcumin'in P21 seviyesini düşürdüğü ve böylece apoptozu engellediğini göstermiştir (Srivastava, Chen et al. 2007). Başka bir çalışmada curcumin'in P21'i indükleyerek beyin tümörü hücrelerinin apoptoza uğramasını sağladığı bulunmuştur (Khaw, Hande et al. 2013). Çalışmamızı destekleyen, curcumin'in kanser hücrelerinde P21 seviyesini arttırması hücreler arasındaki farklılaşmadan dolayı farklı etki gösterdiğini işaret etmektedir. Ayrıca çalışmamızda penisilin curcumin ile

kullanıldığında P21 seviyesini arttırıcı etkiye sahip olduğu da sonuçlarımız arasında yer almaktadır. Bu sonucun aksine bir çalışma Achmad ve arkadaşları (2018) tarafından yapılmıştır (Achmad, Khairunnisa et al. 2018). Çalışmada penisilinin P21 genini upregule ettiği belirlenmiştir.

Cyclin D1, hücre döngüsü ilerlemesini düzenlemede yer alan siklin protein ailesinin bir üyesidir. Cyclin D1 sentezi G1 sırasında başlatılır ve G1/S faz geçişini yürütür. Hücreler kritik bir hücre boyutuna ulaştığında ve büyüme faktörleri ve mitojenler (çok hücreli organizma için) veya besinler (tek hücreli organizma için) mevcutsa, hücreler hücre döngüsüne girerler. Genel olarak, hücre döngüsünün tüm aşamaları insanlarda kronolojik olarak ayrılır ve periyodik olarak eksprese edilen ve kısmen işlev olarak fazla olan Cyclin-Cdk kompleksleri tarafından tetiklenir (Obaya and Sedivy 2002).

Çalışmamızda curcumin'in Cyclin D1 seviyesini arttırdığı belirlenmiştir. Bunun aksine penisilin ise Cyclin D1 seviyesini oldukça düşürmüştür. Bu sonuçların aksi bir çalışma Choudhuri ve arkadaşları (2005) tarafından yapılmıştır (Choudhuri, Pal et al. 2005). Çalışmaya göre curcumin meme kanseri hücrelerinde inhibisyona yol açarak apoptoz yolağının çalışmasını sağlamıştır. Böylece tamir mekanizması çalışmadığından kanser hücreleri apoptoza uğramıştır. Penisilin ile indüklenmiş hücre modeli ile ilgili Cyclin D1'e olan etkisini ortaya koyan herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle penisilinin Cyclin D1'e olan etkisini gösteren ilk çalışma olarak çalışmamız kabul edilebilir.

Çoğunlukla voltaj ve ligand kapılı iyon kanallarına odaklanan geleneksel antiepileptik ilaç geliştirme, tıbbi tedaviye dirençli tüm epilepsi hastalarının üçte birinin tedavisinde son yıllarda çok az ilerleme kaydetmiştir. Bu nedenle, epileptik durumun başlamasının ve sürdürülmesinin nedenlerini anlamak ve yeni tedavileri belirlemek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Kronik epilepside siklik nükleotid kapılı (HCN) kanal voltajına bağlı aktivasyonun aşağı regülasyonu da meydana gelir. HCN kanal fonksiyonundaki bu geçit kusuru, p38 MAPK'nın aracılık ettiği bir yukarı akış sinyalleşme kaskadının aktivite kaybındandır. p38 MAPK inhibitörü SB'nin spontan nöbet sıklığını kötüleştirdiği bilinmektedir. Öte yandan, p38 MAPK'nın inhibisyonu nöbetleri aktive edebilir. Bu nedenle, p38 MAPK yolunun in vivo farmakolojik manipülasyonunun kronik epileptik sıçanlarda (pilocarpinli epileptik model) nöbet sıklığını etkileyebileceği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Brennan, Baram et al. 2016).

Gabryel ve Liber'in yaptığı bir çalışmada, Anizomisin (ANI)-p38 MAPK aktivatörü ve c June N terminali (JNK)- ile yapılan deneyde nöbetlerin arttığı görülmüştür. Aynı çalışmada bu artışla birlikte p38 MAPK aktivasyonunun nöbet sıklığında azalmaya neden olması gerektiği de açıklanmıştır. JNK inhibitörü SP'nin uygulanması, doza bağlı olarak nöbetleri önemli ölçüde azaltır. Ancak, JNK aktivitesinin sadece kısmi inhibisyonu

ile bile SP dozuna bağı JNK inhibisyonu davranışsal anormallikler üretmez (Gabryel and Liber 2018). Ayrıca JNK inhibisyonunun nöbet süresini azalttığı önceki çalışmalarda da gözlemlenmiştir. Yine önceki çalışmalarda epileptik hayvanlardan alınan hipokampal dokunun biyokimyasal analizi, JNK aktivitesinde kronik yükselme göstermiştir. Bizim çalışmamızda, p38 MAPK'nın nöronal uyarılabilirliği arttırdığı sonucu ortaya konmuştur. Ancak nöbetlerde asıl hedef JNK'dir. Son olarak, JNK'nin aracılık ettiği Fosforilasyon sinyali, yeni bir antiepileptik hedefi temsil edebilir.

Bizim çalışmamızda penisilin p38 MAPK ve fosfo p38 MAPK'yı beraber oldukça azaltırken, curcumin bu azalmayı durdurmuş ve p38 MAPK ve fosfo p38 MAPK düzeylerini yükseltmiştir. Yine bizim çalışmamızda JNK penisilin ile oldukça çok artarken, curcumin etkisi ile bu artma azalmıştır. Burada literatürden farklı olarak curcumin'in astrosit canlılığını p38 MAPK ve JNK üzerinden yaptığı ortaya konmuştur. Böylece curcumin, JNK aktivasyonunu önleyebilir ve ardından nöbetlerin aktivasyonunu azaltabilir.

Sonuç olarak curcumin potansiyel olarak p38 MAPK ve JNK'yi inhibe ederek hücre canlılığını arttırmıştır.

Daha önce metformin ile ilgili yapılan bir deneyde, oksijen-glukoz deprivasyonunda (OGD) metforminin AMPK (activated protein kinaz)'yi aktive ettiği belirtilmiştir. Böylece kaspaz 3 bağı inhibe olur. Oksijen glukoz deprivasyonunda (OGD) kaspaz 3 artar, ama metformin AMPK üzerinden kaspaz 3' ü inhibe eder. AMPK, ROS ile aktif olarak (reaktif yıldırım türleri) hücre enerjisini tüketmektedir. Bu yüzden AMPK aktivasyonu, astrosit hücre canlılığını azaltır (Gabryel and Liber 2018).

Bizim çalışmamızda benzer şekilde penisilin ile aktif kaspaz 3 çok fazla artmıştır. Curcumin ile bu yüksek artış azalmıştır. AMPK alfa 1 ve fosfo AMPK alfa 1 benzer şekilde penisilin ile oldukça azalmıştır, bu azalma curcumin ile yukarılara çekilmiştir. Burada curcumin'in, antioksidan etkisiyle AMPK üzerinden kaspaz 3'ü azaltarak hücre canlılığını arttırdığı düşünülebilir.

Asetil-KoA karboksilaz (ACC), iki katalitik aktivitesi, biotin karboksilaz (BC) ve karboksiltransferaz (CT) yoluyla malonil-KoA üretmek için asetil-KoA'nın geri dönüşümsüz karboksilasyonunu katalize eden biyotine bağımlı bir enzimdir. ACC'nin en önemli işlevi, yağ asitlerinin biyosentezi için malonil-CoA substratını sağlamaktır (Tong 2005), böylece yağ asitlerinin metabolizmasını düzenler. Yapılan çalışmalar AMPK aktivasyonunun, ACC fosforilasyonu arttırdığını göstermektedir. Fosforilasyonun ana nedeni, hücrenin enerji durumu düştüğünde AMP seviyelerinin artmasıdır ve bu da AMPK aktivasyonuna yol açar. AMPK, ACC'nin ana kinaz düzenleyicisidir ve ACC'nin üzerinde bir dizi serin kalıntısını fosforile edebilir (Park 2002). Bizim çalışmamızda, ACC

penisilin ile oldukça azalmıştır. Curcumin ile bu azalma %30-40 oranlarında artmıştır. Curcumin, AMPK üzerinden ACC fosforilasyonunu arttırarak hücre canlılığını arttırmıştır.

Mitokondriyal disfonksiyon ve anormal gen ekspresyonu, reaktif temizlemede rol oynayan oksidatif belirteçlerin ve serbest radikallerin artması ve yine beyin mitokondriyal aktivitesinin bozulması epileptogeneze katkıda bulunur (Martinc, Grabnar et al. 2012). Çeşitli klinik çalışmalar epilepside ayrıca biyolojik enzimatik bir bozulma olduğunu göstermiştir. Antioksidan maddeler umut verici bir antiepileptik potansiyel göstermiştir; nöbet oluşumunu hafifleterek, epilepsi başlangıcını geciktirerek, hastalık ilerlemesini durdurarak, hipokampal nöronal hasarı azaltarak ve bilişsel bozuklukları önleyerek yaptıkları etkiler farklı hayvan modellerinde gösterilmiştir (Geronzi, Lotti et al. 2018).

Curcumin'in iyi bir antioksidan olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda da sitokrom c, penisilin ile oldukça çok artarken, curcumin ile azalmıştır. Curcumin'in bu antioksidan etkisi astrosit viabilitesini arttırmıştır.

6. SONUÇ

Epilepsi dünyada 50 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Hastalığın mekanizması yeni çalışmalarla daha anlaşılır hale gelmektedir. Son çalışmalarda, epilepside daha çok astrositlerin rol aldığı ortaya konulmuştur. Biz çalışmamızda primer astrosit hücre kültüründe astrosit canlılığını azaltarak epilepsiye benzer bir mekanizma ile hücrel epilepsi modeli oluşturduk. Curcumin ile bu hücre canlılığının istatistik olarak anlamlı derecede arttığını ilk defa olarak gösterdik. Gördük ki curcumin potansiyel olarak p38 MAPK ve JNK'yi inhibe ederek hücre canlılığını artırır. Genel olarak, bu çalışma, curcumin'in, hastalığın başlaması ve ilerlemesi sırasında gözlenen oksidatif stres, nöroinflamasyon, apoptoz ve nöronal kayıp gibi moleküler ve hücrel değişiklikleri değiştirmedeki potansiyel rollerine ek olarak epileptik nöbet semptomlarını hafifletebileceğini ortaya koymuştur.

Curcumin'in epileptik nöbeti önleyen çoklu mekanizmalarıyla birleştirilmiş güvenlik profili, epilepsi tedavisinde bu maddenin umut verici bir yönüdür. Ancak, şu ana kadar mevcut kanıtlar başlangıç niteliğindedir. Curcumin'in epilepsi tedavisinde uzun vadeli etkinliğini ve güvenliğini belirlemek için daha ileri klinik öncesi ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuçta; curcumin'in penisilinle indüklenen primer astroglial hücre hattında azalan hücre canlılığına karşı hücrel epilepsi mekanizması ve anti nöbet üzerine olan etkilerinden dolayı antiepileptik ajan olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

- Abad, R. S.-C., F. X. S. Vilaplana and J. M. S. Fernandez (2007). "Genetic causes of epilepsy." *The neurologist* **13**(6): S47-S51.
- Abbas, T. and A. Dutta (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." *Nature Reviews Cancer* **9**(6): 400-414.
- Achmad, H., P. Khairunnisa and A. A. Mardiana (2018). "Potentially of extracted Papua's Anthill (*Myrmecodia Pendans*) as antitumor to emphasis the expression of vascular endothelial growth factor cell Burkitt's lymphoma cancer." *Asian J Microbiol Biotech Env Sci* **20**(1): 108-112.
- Agarwal, N. B., S. Jain, N. K. Agarwal, P. K. Mediratta and K. K. Sharma (2011). "Modulation of pentylenetetrazole-induced kindling and oxidative stress by curcumin in mice." *Phytomedicine* **18**(8-9): 756-759.
- Aggarwal, B. B., A. Kumar and A. C. Bharti (2003). "Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies." *Anticancer Res* **23**(1A): 363-398.
- Aggarwal, B. B., S. Shishodia, Y. Takada, S. Banerjee, R. A. Newman, C. E. Bueso-Ramos and J. E. Price (2005). "Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice." *Clin Cancer Res* **11**(20): 7490-7498.
- Aggarwal, B. B., C. Sundaram, N. Malani and H. Ichikawa (2007). "Curcumin: the Indian solid gold." *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*: 1-75.
- Aggarwal, B. B., W. Yuan, S. Li and S. C. Gupta (2013). "Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric." *Mol Nutr Food Res* **57**(9): 1529-1542.
- Aggarwal, S., H. Ichikawa, Y. Takada, S. K. Sandur, S. Shishodia and B. B. Aggarwal (2006). "Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I kappa B alpha kinase and Akt activation." *Mol Pharmacol* **69**(1): 195-206.
- Agulhon, C., T. A. Fiacco and K. D. McCarthy (2010). "Hippocampal short-and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling." *Science* **327**(5970): 1250-1254.
- Ahmad, M. (2013). "Protective effects of curcumin against lithium-pilocarpine induced status epilepticus, cognitive dysfunction and oxidative stress in young rats." *Saudi Journal of Biological Sciences* **20**(2): 155-162.
- Ak, T. and İ. Gülçin (2008). "Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin." *Chemico-biological interactions* **174**(1): 27-37.
- Akbay, G. D. and A. G. Pekcan (2016). "Zerdeçal: Beslenme ve Sağlık Yönünden Değerlendirilmesi." *Beslenme ve Diyet Dergisi* **44**(1): 68-72.
- Akdogan, I., E. Adiguzel, I. Yilmaz, M. B. Ozdemir, M. Sahiner and A. C. Tufan (2008). "Penicillin-induced epilepsy model in rats: dose-dependant effect on hippocampal volume and neuron number." *Brain research bulletin* **77**(4): 172-177.
- Akinyemi, A. J., G. Oboh, O. Ogunsuyi, A. O. Abolaji and A. Udofia (2018). "Curcumin-supplemented diets improve antioxidant enzymes and alter acetylcholinesterase genes

- expression level in *Drosophila melanogaster* model." *Metabolic brain disease* **33**(2): 369-375.
- Aktas, C., M. Kanter, M. Erboğa and S. Öztürk (2012). "Anti-apoptotic effects of curcumin on cadmium-induced apoptosis in rat testes." *Toxicology and industrial health* **28**(2): 122-130.
- Akula, K. K., A. Dhir and S. Kulkarni (2008). "Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylenetetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism." *Epilepsy research* **78**(1): 60-70.
- Alexander, G. M. and D. W. Godwin (2006). "Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy." *Epilepsy research* **71**(1): 1-22.
- Alonso-deFlorida, F. and J. M. Delgado (1958). "Lasting behavioral and EEG changes in cats induced by prolonged stimulation of amygdala." *American Journal of Physiology-Legacy Content* **193**(1): 223-229.
- Ambegaokar, S. S., L. Wu, K. Alamshahi, J. Lau, L. Jazayeri, S. Chan, P. Khanna, E. Hsieh and P. S. Timiras (2003). "Curcumin inhibits dose-dependently and time-dependently neuroglial cell proliferation and growth." *Neuro Endocrinol Lett* **24**(6): 469-473.
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman and B. B. Aggarwal (2007). "Bioavailability of curcumin: problems and promises." *Mol Pharm* **4**(6): 807-818.
- Andreoli TE, B. J., Carpenter CCJ, Plum F. (2000). *Cecil essentials of medicine* (4th ed). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
- Anto, R. J., A. Mukhopadhyay, K. Denning and B. B. Aggarwal (2002). "Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl." *Carcinogenesis* **23**(1): 143-150.
- Aoki, H., Y. Takada, S. Kondo, R. Sawaya, B. B. Aggarwal and Y. Kondo (2007). "Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways." *Molecular pharmacology* **72**(1): 29-39.
- Aroniadou-Anderjaska, V., B. Fritsch, F. Qashu and M. F. Braga (2008). "Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy." *Epilepsy research* **78**(2-3): 102-116.
- Aronica, E., E. A. Van Vliet, O. A. Mayboroda, D. Troost, F. H. L. Da Silva and J. A. Gorter (2000). "Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy." *European Journal of Neuroscience* **12**(7): 2333-2344.
- Arzimanoglou, A., E. Hirsch, A. Nehlig, P. Castelnaud, P. Gressens and A. P. de Vasconcelos (2002). "Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review." *Epileptic disorders* **4**: 173-182.
- Babb, T. L., W. J. Brown, J. Pretorius, C. Davenport, J. P. Lieb and P. H. Crandall (1984). "Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy." *Epilepsia* **25**(6): 729-740.
- Babb, T. L., J. P. Lieb, W. J. Brown, J. Pretorius and P. H. Crandall (1984). "Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation." *Epilepsia* **25**(6): 721-728.
- Bagirici, F., F. M. Gokce and C. Marangoz (1999). "Depressive effect of nicardipine on penicillin-induced epileptiform activity in rats." *Neuroscience Research Communications* **24**(3): 149-154.
- Baltacı, S. B., R. Mogulkoc and A. K. Baltacı (2019). "Molecular Mechanisms of Early and Late LTP." *Neurochem Res* **44**(2): 281-296.
- Barclay, L. R. C., M. R. Vinqvist, K. Mukai, H. Goto, Y. Hashimoto, A. Tokunaga and H. Uno (2000). "On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity." *Organic letters* **2**(18): 2841-2843.

- Baum, L. and A. Ng (2004). "Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models." *Journal of Alzheimer's disease* **6**(4): 367-377.
- Baykan, B., C. Gürses and A. Gökyiğit (2004). "Epilepsi." Öge A. E (edt). *Nöroloji Ders Kitabı*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi: 279-230.
- Becit, M., S. Aydın and N. Başaran (2017). "Kurkuminin terapötik ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi." *Türkiye Klinikleri. J Pharm Sci M* **6**: 126-142.
- Bennett, M. V., J. E. Contreras, F. F. Bukauskas and J. C. Sáez (2003). "New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate." *Trends in neurosciences* **26**(11): 610-617.
- Berger, H. (1929). "Über das Elektrenkephalogramm des Menschen (1st report)." *Psychiatr Nervenkr* **87**: 527-570.
- Bezzi, P., G. Carmignoto, L. Pasti, S. Vesce, D. Rossi, B. L. Rizzini, T. Pozzan and A. Volterra (1998). "Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes." *Nature* **391**(6664): 281-285.
- Bharal, N., K. Sahaya, S. Jain, P. K. Mediratta and K. K. Sharma (2008). "Curcumin has anticonvulsant activity on increasing current electroshock seizures in mice." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **22**(12): 1660-1664.
- Biziere, K. and J. Chambon (1987). "Animal models of epilepsy and experimental seizures." *Revue neurologique* **143**(5): 329-340.
- Brennan, G. P., T. Z. Baram and N. P. Poolos (2016). "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in epilepsy." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **6**(3): a022384.
- Brodie, M. J. and J. A. French (2000). "Management of epilepsy in adolescents and adults." *Lancet* **356**(9226): 323-329.
- Brouet, I. and H. Ohshima (1995). "Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages." *Biochemical and biophysical research communications* **206**(2): 533-540.
- Bsibsi, M., R. Ravid, D. Gveric and J. M. van Noort (2002). "Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **61**(11): 1013-1021.
- Cajal, S. R. o. y. (1894). "The croonian lecture.—la fine structure des centres nerveux," London, Proceedings of the Royal Society of London. **55**: 444-468.
- Carpentier, P. A., W. S. Begolka, J. K. Olson, A. Elhofy, W. J. Karpus and S. D. Miller (2005). "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli." *Glia* **49**(3): 360-374.
- Chen, J., X. Tang, J. Zhi, Y. Cui, H. Yu, E. Tang, S. Sun, J. Feng and P. Chen (2006). "Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway." *Apoptosis* **11**(6): 943-953.
- Cheng, A. L., C. H. Hsu, J. K. Lin, M. M. Hsu, Y. F. Ho, T. S. Shen, J. Y. Ko, J. T. Lin, B. R. Lin, W. Ming-Shiang, H. S. Yu, S. H. Jee, G. S. Chen, T. M. Chen, C. A. Chen, M. K. Lai, Y. S. Pu, M. H. Pan, Y. J. Wang, C. C. Tsai and C. Y. Hsieh (2001). "Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions." *Anticancer Res* **21**(4B): 2895-2900.
- Chiu, S. S., E. Lui, M. Majeed, J. K. Vishwanatha, A. P. Ranjan, A. Maitra, D. Pramanik, J. A. Smith and L. Helson (2011). "Differential distribution of intravenous curcumin formulations in the rat brain." *Anticancer research* **31**(3): 907-911.
- Chiu, T.-L. and C.-C. Su (2009). "Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF-κBp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells." *International journal of molecular medicine* **23**(4): 469-475.
- Choudhary, K. M., A. Mishra, V. V. Poroikov and R. K. Goel (2013). "Ameliorative effect of Curcumin on seizure severity, depression like behavior, learning and memory deficit in post-pentylenetetrazole-kindled mice." *European journal of pharmacology* **704**(1-3): 33-40.

- Choudhuri, T., S. Pal, T. Das and G. Sa (2005). "Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner." *Journal of Biological Chemistry* **280**(20): 20059-20068.
- Cohen-Gadol, A. A., J. W. Pan, J. H. Kim, D. D. Spencer and H. H. Hetherington (2004). "Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis." *J Neurosurg* **101**(4): 613-620.
- Cole, G. M., B. Teter and S. A. Frautschy (2007). "Neuroprotective effects of curcumin." *Adv Exp Med Biol* **595**: 197-212.
- Craig, L. A., N. S. Hong, J. Kopp and R. J. McDonald (2008). "Reduced cholinergic status in hippocampus produces spatial memory deficits when combined with kainic acid induced seizures." *Hippocampus* **18**(11): 1112-1121.
- Dam, A. M. (1982). "Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures." *Acta Neurologica Scandinavica* **66**(6): 601-642.
- de Lanerolle, N. C., J. H. Kim, A. Williamson, S. S. Spencer, H. P. Zaveri, T. Eid and D. D. Spencer (2003). "A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories." *Epilepsia* **44**(5): 677-687.
- de Lanerolle, N. C. and T. S. Lee (2005). "New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Behav* **7**(2): 190-203.
- de Lanerolle, N. C., T. S. Lee and D. D. Spencer (2010). "Astrocytes and epilepsy." *Neurotherapeutics* **7**(4): 424-438.
- Desai, P. P. and V. B. Patravale (2018). "Curcumin cocrystal micelles—Multifunctional nanocomposites for management of neurodegenerative ailments." *Journal of pharmaceutical sciences* **107**(4): 1143-1156.
- Dhandapani, K. M., V. B. Mahesh and D. W. Brann (2007). "Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors." *J Neurochem* **102**(2): 522-538.
- Dhillon, N., B. B. Aggarwal, R. A. Newman, R. A. Wolff, A. B. Kunnumakkara, J. L. Abbruzzese, C. S. Ng, V. Badmaev and R. Kurzrock (2008). "Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer." *Clin Cancer Res* **14**(14): 4491-4499.
- Dhir, A., P. S. Naidu and S. K. Kulkarni (2006). "Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **30**(8): 1478-1485.
- Dhir, A., P. S. Naidu and S. K. Kulkarni (2007). "Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylenetetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice." *Seizure* **16**(8): 691-697.
- Diaz-Moralli, S., M. Tarrado-Castellarnau, A. Miranda and M. Cascante (2013). "Targeting cell cycle regulation in cancer therapy." *Pharmacology & therapeutics* **138**(2): 255-271.
- Drion, C. M., L. E. Borm, L. Kooijman, E. Aronica, W. J. Wadman, A. F. Hartog, E. A. van Vliet and J. A. Gorter (2016). "Effects of rapamycin and curcumin treatment on the development of epilepsy after electrically induced status epilepticus in rats." *Epilepsia* **57**(5): 688-697.
- Du, F., T. Eid, E. W. Lothman, C. Kohler and R. Schwarcz (1995). "Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy." *J Neurosci* **15**(10): 6301-6313.
- EE Altay, E. B., C İrkeç (1999). "Demans ve Epilepsi." *Türk Psikiyatri Dizini* **1**(4): 116-128.
- Eid, T., A. Williamson, T. S. W. Lee, O. A. Petroff and N. C. De Lanerolle (2008). "Glutamate and astrocytes—key players in human mesial temporal lobe epilepsy?" *Epilepsia* **49**: 42-52.
- El-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-825.

- Engel, J., Schwartzkroin, PA. (2006). *What Should Be Modeled?* San Diego Elsevier Academic Press.
- Epilepsies, P. f. R. C. o. and E. Syndromes (1989). "Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy." *Epilepsia* **30**(4): 389-399.
- Epilepsy, C. o. C. a. T. o. t. I. L. A. (1981). "Proposal for the revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures." *Epilepsia* **22**: 489-501.
- Eşkazan, E. (2004). "Türklerde Epilepsinin ve Epileptolojinin Kısa Tarihi." *epilepsi* **10**: 15-57.
- Ezz, H. S. A., Y. A. Khadrawy and N. A. Noor (2011). "The neuroprotective effect of curcumin and *Nigella sativa* oil against oxidative stress in the pilocarpine model of epilepsy: a comparison with valproate." *Neurochemical research* **36**(11): 2195-2204.
- Fagerberg, L., B. M. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpoor, A. Danielsson and K. Edlund (2014). "Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics." *Molecular & Cellular Proteomics* **13**(2): 397-406.
- Fakhrabadi, H. G., A. Rabbani-Chadegani, P. Ghadam and S. Amiri (2020). "Protective effect of bleomycin on 5-azacitidine induced cytotoxicity and apoptosis in mice hematopoietic stem cells via Bcl-2/Bax and HMGB1 signaling pathway." *Toxicology and applied pharmacology* **396**: 114996.
- Ferencz, I., M. Kokaia, M. Keep, E. Elmer, M. Metsis, Z. Kokaia and O. Lindvall (1997). "Effects of cholinergic denervation on seizure development and neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling." *Neuroscience* **80**(2): 389-399.
- Ferencz, I., G. Leanza, A. Nanobashvili, Z. Kokaia, M. Kokaia and O. Lindvall (2001). "Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: comparison with noradrenergic neurons." *Neuroscience* **102**(4): 819-832.
- Fisher, P. D., E. F. Sperber and S. L. Moshe (1998). "Hippocampal sclerosis revisited." *Brain Dev* **20**(8): 563-573.
- Fisher, R. S. (1989). "Animal models of the epilepsies." *Brain Research Reviews* **14**(3): 245-278.
- Fisher, R. S., W. V. E. Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee and J. Engel Jr (2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." *Epilepsia* **46**(4): 470-472.
- Gabryel, B. and S. Liber (2018). "Metformin limits apoptosis in primary rat cortical astrocytes subjected to oxygen and glucose deprivation." *Folia Neuropathol* **56**: 328-336.
- García-Aranda, M., E. Pérez-Ruiz and M. Redondo (2018). "Bcl-2 inhibition to overcome resistance to chemo-and immunotherapy." *International journal of molecular sciences* **19**(12): 3950.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. A. Ben-Sasson (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *Journal of cell Biology* **119**(3): 493-501.
- Geronzi, U., F. Lotti and S. Grosso (2018). "Oxidative stress in epilepsy." *Expert review of neurotherapeutics* **18**(5): 427-434.
- Goel, A., A. B. Kunnumakkara and B. B. Aggarwal (2008). "Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic." *Biochem Pharmacol* **75**(4): 787-809.
- Gupta, Y., M. V. Kumar and A. Srivastava (2003). "Effect of *Centella asiatica* on pentylene-tetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **74**(3): 579-585.
- Gupta, Y. K., S. Briyal and M. Sharma (2009). "Protective effect of curcumin against kainic acid induced seizures and oxidative stress in rats." *Indian J Physiol Pharmacol* **53**(1): 39-46.
- Harris, A. B. (1975). "Cortical neuroglia in experimental epilepsy." *Exp Neurol* **49**(3): 691-715.
- Hatcher, H., R. Planalp, J. Cho, F. M. Torti and S. V. Torti (2008). "Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials." *Cell Mol Life Sci* **65**(11): 1631-1652.

- Heath, P. R. and P. J. Shaw (2002). "Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis." *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* **26**(4): 438-458.
- Hebb, D. O. (1949). "The organization of behavior: A neurophysiological approach,".
- Hertz, L., R. Dringen, A. Schousboe and S. R. Robinson (1999). "Astrocytes: glutamate producers for neurons." *Journal of neuroscience research* **57**(4): 417-428.
- Hong, J., M. Bose, J. Ju, J.-H. Ryu, X. Chen, S. Sang, M.-J. Lee and C. S. Yang (2004). "Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related β -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A 2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase." *Carcinogenesis* **25**(9): 1671-1679.
- Huang, C., X.-s. Chi, R. Li, X. Hu, H.-x. Xu, J.-m. Li and D. Zhou (2017). "Inhibition of P2X7 receptor ameliorates nuclear factor-kappa B mediated neuroinflammation induced by status epilepticus in rat hippocampus." *Journal of Molecular Neuroscience* **63**(2): 173-184.
- Ichiki, K., N. Mitani, Y. Doki, H. Hara, T. Misaki and I. Saiki (2000). "Regulation of activator protein-1 activity in the mediastinal lymph node metastasis of lung cancer." *Clin Exp Metastasis* **18**(7): 539-545.
- Jackson, J. (1958). *On a particular variety of epilepsy (Intellectual aura): One case with symptoms of organic brain disease.* London Hodder and stoughton.
- Jyoti, A., P. Sethi and D. Sharma (2009). "Curcumin protects against electrobehavioral progression of seizures in the iron-induced experimental model of epileptogenesis." *Epilepsy & Behavior* **14**(2): 300-308.
- Kang, J.-Q. and R. L. Macdonald (2009). "Making sense of nonsense GABAA receptor mutations associated with genetic epilepsies." *Trends in molecular medicine* **15**(9): 430-438.
- Kang, N., J. Xu, Q. Xu, M. Nedergaard and J. Kang (2005). "Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal neurons." *Journal of neurophysiology* **94**(6): 4121-4130.
- Kaur, H., A. Bal and R. Sandhir (2014). "Curcumin supplementation improves mitochondrial and behavioral deficits in experimental model of chronic epilepsy." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **125**: 55-64.
- Kaur, H., I. Patro, K. Tikoo and R. Sandhir (2015). "Curcumin attenuates inflammatory response and cognitive deficits in experimental model of chronic epilepsy." *Neurochemistry international* **89**: 40-50.
- Khakh, B. S., V. Beaumont, R. Cachope, I. Munoz-Sanjuan, S. A. Goldman and R. Grantyn (2017). "Unravelling and exploiting astrocyte dysfunction in Huntington's disease." *Trends in neurosciences* **40**(7): 422-437.
- Khaw, A. K., M. P. Hande, G. Kalthur and M. P. Hande (2013). "Curcumin inhibits telomerase and induces telomere shortening and apoptosis in brain tumour cells." *Journal of cellular biochemistry* **114**(6): 1257-1270.
- Kim, J. H., P. O. Guimaraes, M. Y. Shen, L. M. Masukawa and D. D. Spencer (1990). "Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas." *Acta Neuropathol* **80**(1): 41-45.
- Kimelberg, H., T. Jalonen and W. Walz (1993). *Astrocytes: Pharmacology and Function*, Academic Press Inc., chapter Regulation of the Brain Microenvironment
- Kobow, K., A. El-Osta and I. Blümcke (2013). "The methylation hypothesis of pharmacoresistance in epilepsy." *Epilepsia* **54**: 41-47.
- Koh, S. (2018). "Role of neuroinflammation in evolution of childhood epilepsy." *Journal of child neurology* **33**(1): 64-72.
- Kokaia, M., I. Ferencz, G. Leanza, E. Elmer, M. Metsis, Z. Kokaia, R. Wiley and O. Lindvall (1996). "Immunolesioning of basal forebrain cholinergic neurons facilitates hippocampal kindling and perturbs neurotrophin messenger RNA regulation." *Neuroscience* **70**(2): 313-327.

- Kressel, M. and P. Groscurth (1994). "Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA." *Cell and tissue research* **278**(3): 549-556.
- Lee, H.-Y., S.-W. Kim, G.-H. Lee, M.-K. Choi, H.-W. Jung, Y.-J. Kim, H.-J. Kwon and H.-J. Chae (2016). "Turmeric extract and its active compound, curcumin, protect against chronic CCl₄-induced liver damage by enhancing antioxidation." *BMC complementary and alternative medicine* **16**(1): 1-9.
- Lee, T.-S., S. Mane, T. Eid, H. Zhao, A. Lin, Z. Guan, J. H. Kim, J. Schweitzer, D. King-Stevens and P. Weber (2007). "Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes." *Molecular medicine* **13**(1): 1-13.
- Lee, T.-S., S. Mane, T. Eid, H. Zhao, A. Lin, Z. Guan, J. H. Kim, J. Schweitzer, D. King-Stevens and P. Weber (2007). "Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes." *Molecular Medicine* **13**(1-2): 1-13.
- Li, H.-q., L.-j. Jin, F.-f. Wu, X.-y. Li, J.-s. You, Z.-h. Cao, D. Li and Y.-p. Xu (2012). "Effect of curcumin on proliferation, cell cycle, and caspases and MCF-7 cells." *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **6**(12): 864-870.
- Lim, S. and P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." *Development* **140**(15): 3079-3093.
- Limtrakul, P., S. Lipigorngoson, O. Namwong, A. Apisariyakul and F. W. Dunn (1997). "Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice." *Cancer Lett* **116**(2): 197-203.
- Liu, D. and Z. Chen (2013). "The effect of curcumin on breast cancer cells." *Journal of breast cancer* **16**(2): 133.
- Löshner, W., Schmidt, D. (1994). "Strategies in antiepileptic drug development: Is rational drug design superior to random screening and structural variation?" *Epilepsy Res* **17**: 95-134.
- Lv, Z.-D., X.-P. Liu, W.-J. Zhao, Q. Dong, F.-N. Li, H.-B. Wang and B. Kong (2014). "Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo." *International journal of clinical and experimental pathology* **7**(6): 2818.
- Marangoz, C. (1997). "Deneyisel epilepsi modelleri." *O.M.Ü. Tıp Dergisi* **14**: 147-186.
- Marieb, E. N. (1936/2017). *Anatomy & physiology*. Ankara, Nobel Akademik Yayıncılık.
- Martinc, B., I. Grabnar and T. Vovk (2012). "The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress." *Current Neuropharmacology* **10**(4): 328-343.
- McCandless, D., FineSmith RB. (1992). *Chemically induced models of seizures*. New Jersey II. Human Press.
- McCARTHY, K. D. and J. De Vellis (1980). "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue." *Journal of Cell Biology* **85**(3): 890-902.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Nature Reviews Immunology* **1**(2): 135-145.
- Mehla, J., K. Reeta, P. Gupta and Y. K. Gupta (2010). "Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model." *Life sciences* **87**(19-22): 596-603.
- Menon, V. P. and A. R. Sudheer (2007). "Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin." *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*: 105-125.
- Meyerson, M. and E. Harlow (1994). "Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner." *Molecular and cellular biology* **14**(3): 2077-2086.
- Miller, M., S. Chen, J. Woodliff and S. Kansra (2008). "Curcumin (diferuloylmethane) inhibits cell proliferation, induces apoptosis, and decreases hormone levels and secretion in pituitary tumor cells." *Endocrinology* **149**(8): 4158-4167.
- Mishra, S. and K. Palanivelu (2008). "The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview." *Annals of Indian Academy of Neurology* **11**(1): 13.
- Mohandas, K. M. and D. C. Desai (1999). "Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel." *Indian J Gastroenterol* **18**(3): 118-121.

- Moldrich, R. X., A. G. Chapman, G. De Sarro and B. S. Meldrum (2003). "Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy." *European journal of pharmacology* **476**(1-2): 3-16.
- Morales, I., C. Cerda-Troncoso, V. Andrade and R. B. Maccioni (2017). "The natural product curcumin as a potential adjuvant in Alzheimer's treatment." *Journal of Alzheimer's Disease* **60**(2): 451-460.
- Mou, S., Z. Zhou, Y. He, F. Liu and L. Gong (2017). "Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of laryngeal cancer cells through Bcl-2 and PI3K/Akt, and by upregulating miR-15a." *Oncology Letters* **14**(4): 4937-4942.
- Naderi, S., F. Acar, T. Mertol and M. N. Arda (2003). "Functional anatomy of the spine by Avicenna in his eleventh century treatise *Al-Qanun fi al-Tibb* (The Canons of Medicine)." *Neurosurgery* **52**(6): 1449-1453; discussion 1453-1444.
- Nagai, S., M. Kurimoto, K. Washiyama, Y. Hirashima, T. Kumanishi and S. Endo (2005). "Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis by curcumin in human malignant astrocytoma cell lines." *J Neurooncol* **74**(2): 105-111.
- Nakamura, N., K. Negishi, A. Hirano and M. Sugawara (2005). "Real-time monitoring of L-glutamate release from mouse brain slices under ischemia with a glass capillary-based enzyme electrode." *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**(4): 660-667.
- Netter, F. H. (2013). *The Netter Collection OF MEDICAL ILLUSTRATIONS Nervous System Part I—Brain*. Philadelphia, PA 19103-2899, Elsevier.
- Newman, E. A. (2001). "Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells." *Journal of Neuroscience* **21**(7): 2215-2223.
- Noorafshan, A. and S. Ashkani-Esfahani (2013). "A review of therapeutic effects of curcumin." *Curr Pharm Des* **19**(11): 2032-2046.
- Obaya, A. and J. M. Sedivy (2002). "Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **59**(1): 126-142.
- Organization, W. H. (1999). *WHO monographs on selected medicinal plants*, World Health Organization.
- Ounsted, C., G. H. Glaser, J. Lindsay and P. Richards (1985). "Focal epilepsy with mesial temporal sclerosis after acute meningitis." *Archives of neurology* **42**(11): 1058-1060.
- Pan, M. H., T. M. Huang and J. K. Lin (1999). "Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice." *Drug Metab Dispos* **27**(4): 486-494.
- Park, S. (2002). "Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS, and Winder WW." Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol* **92**: 2475-2482.
- Parpura, V. and P. G. Haydon (2000). "Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(15): 8629-8634.
- Patel, S. S., A. Acharya, R. Ray, R. Agrawal, R. Raghuvanshi and P. Jain (2020). "Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease." *Critical reviews in food science and nutrition* **60**(6): 887-939.
- Patumraj, S., N. Wongeakin, P. Sridulyakul, A. Jariyapongskul, N. Futrakul and S. Bunnag (2006). "Combined effects of curcumin and vitamin C to protect endothelial dysfunction in the iris tissue of STZ-induced diabetic rats." *Clinical hemorheology and microcirculation* **35**(4): 481-489.
- Penfield, W. (1930). "The Radical Treatment of Traumatic Epilepsy and Its Rationale." *Can Med Assoc J* **23**(2): 189-197.
- Peng, D., H.-y. Tang, L. Xin, H.-J. Lin, W.-f. Peng, M. Yu, F. Wei and W. Xin (2012). "Anticonvulsive and antioxidant effects of curcumin on pilocarpine-induced seizures in rats." *Chinese medical journal* **125**(11): 1975-1979.
- Perea, G. and A. Araque (2007). "Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses." *Science* **317**(5841): 1083-1086.
- Perea, G. and A. Araque (2007). "Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses." *Science* **317**(5841): 1083-1086.

- Pérez-Arriaga, L., M. Mendoza-Magana, R. Cortés-Zárate, A. Corona-Rivera, L. Bobadilla-Morales, R. Troyo-Sanromán and M. Ramirez-Herrera (2006). "Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites." *Acta tropica* **98**(2): 152-161.
- Petroff, O. A., L. D. Errante, J. H. Kim and D. D. Spencer (2003). "N-acetyl-aspartate, total creatine, and myo-inositol in the epileptogenic human hippocampus." *Neurology* **60**(10): 1646-1651.
- Petroff, O. A., L. D. Errante, D. L. Rothman, J. H. Kim and D. D. Spencer (2002). "Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus." *Epilepsia* **43**(7): 703-710.
- Petroff OAC, S. D. (2004). MRS studies of the role of altered glutamate and GABA neurotransmitter metabolism in the pathophysiology of epilepsy. New York, Wiley.
- Pitkänen, A. and K. Lukasiuk (2009). "Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy." *Epilepsy & behavior* **14**(1): 16-25.
- Rafalski, V. A. and A. Brunet (2011). "Energy metabolism in adult neural stem cell fate." *Progress in neurobiology* **93**(2): 182-203.
- Ramsewak, R., D. DeWitt and M. Nair (2000). "Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I–III from *Curcuma longa*." *Phytomedicine* **7**(4): 303-308.
- Roshan-Milani, S., L. Ferrigan, M. Khoshnood, C. Davies and S. Cobb (2003). "Regulation of epileptiform activity in hippocampus by nicotinic acetylcholine receptor activation." *Epilepsy research* **56**(1): 51-65.
- Rossi, D. and A. Volterra (2009). "Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration." *Brain research bulletin* **80**(4-5): 224-232.
- Santagati, S., M. Garnier, P. Carlo, E. Violani, G. B. Picotti and A. Maggi (1997). "Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods." *Brain Research Protocols* **1**(3): 217-223.
- Santello, M. and A. Volterra (2009). "Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺-dependent glutamate release." *Neuroscience* **158**(1): 253-259.
- Schaaf, C., B. Shan, M. Buchfelder, M. Losa, J. Kreutzer, W. Rachinger, G. K. Stalla, T. Schilling, E. Arzt, M. J. Perone and U. Renner (2009). "Curcumin acts as anti-tumorigenic and hormone-suppressive agent in murine and human pituitary tumour cells in vitro and in vivo." *Endocr Relat Cancer* **16**(4): 1339-1350.
- Seo, S. U., S. M. Woo, H.-S. Lee, S. H. Kim, K.-j. Min and T. K. Kwon (2018). "mTORC1/2 inhibitor and curcumin induce apoptosis through lysosomal membrane permeabilization-mediated autophagy." *Oncogene* **37**(38): 5205-5220.
- Shahar, A. (1989). Dissection and tissue culture manual of the nervous system, Liss.
- Sharma, O. (1976). "Antioxidant activity of curcumin and related compounds." *Biochemical pharmacology* **25**(15): 1811-1812.
- Sharma, P. and R. Singh (2010). "Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **84**(4): 378-384.
- Shen, J.-D., Y. Wei, Y.-J. Li, J.-Y. Qiao and Y.-C. Li (2017). "Curcumin reverses the depressive-like behavior and insulin resistance induced by chronic mild stress." *Metabolic brain disease* **32**(4): 1163-1172.
- Shneker, B. F. and N. B. Fountain (2003). "Epilepsy." *Dis Mon* **49**(7): 426-478.
- Silveira, D. C., G. L. Holmes, S. C. Schachter, C. Geula and D. L. Schomer (2000). "Increased susceptibility to generalized seizures after immunolesions of the basal forebrain cholinergic neurons in rats." *Brain research* **878**(1-2): 223-227.
- Siracusa, R., R. Fusco and S. Cuzzocrea (2019). "Astrocytes: role and functions in brain pathologies." *Frontiers in pharmacology* **10**: 1114.
- Sommer, W. (1880). "Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie." *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* **10**: 631–675.
- Srivastava, R. K., Q. Chen, I. Siddiqui, K. Sarva and S. Shankar (2007). "Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1." *Cell Cycle* **6**(23): 2953-2961.
- Stafstrom, C. E. (2006). "Epilepsy: a

- review of selected clinical syndromes and advances in basic science." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **26**(8): 983-1004.
- Stafstrom, C. E. (2009). "Severe epilepsy syndromes of early childhood: the link between genetics and pathophysiology with a focus on SCN1A mutations." *Journal of child neurology* **24**(8_suppl): 15S-23S.
- Steinhäuser, C. and G. Seifert (2002). "Glial membrane channels and receptors in epilepsy: impact for generation and spread of seizure activity." *European journal of pharmacology* **447**(2-3): 227-237.
- Sumanont, Y., Y. Murakami, M. Tohda, O. Vajragupta, H. Watanabe and K. Matsumoto (2007). "Effects of manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin on kainic acid-induced neurotoxic responses in the rat hippocampus." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **30**(9): 1732-1739.
- Swaiman KS, A. S., Ferriero DM. (2005). *Pediatric Neurology Principles and Practice*. New York, Mosby Press.
- Tang, F.-R. and W.-L. Lee (2001). "Expression of the group II and III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy." *Journal of neurocytology* **30**(2): 137-143.
- Terrone, G., A. Salamone and A. Vezzani (2017). "Inflammation and epilepsy: preclinical findings and potential clinical translation." *Current pharmaceutical design* **23**(37): 5569-5576.
- Tewari, S. and K. Majumdar (2012). "A mathematical model for astrocytes mediated LTP at single hippocampal synapses." *J Comput Neurosci* **33**(2): 341-370.
- Tian, B., Z. Wang, Y. Zhao, D. Wang, Y. Li, L. Ma, X. Li, J. Li, N. Xiao and J. Tian (2008). "Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model." *Cancer letters* **264**(2): 299-308.
- Tian, G.-F., H. Azmi, T. Takano, Q. Xu, W. Peng, J. Lin, N. Oberheim, N. Lou, X. Wang and H. R. Zielke (2005). "An astrocytic basis of epilepsy." *Nature medicine* **11**(9): 973-981.
- Tiffany-Castiglioni E, C. A. (1986). *Astrocytes in epilepsy*. New York Academic Press,.
- Tomiyama, M., T. Kimura, T. Maeda, H. Tanaka, K. Furusawa, K. Kurahashi and M. Matsunaga (2001). "Expression of metabotropic glutamate receptor mRNAs in the human spinal cord: implications for selective vulnerability of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis." *Journal of the neurological sciences* **189**(1-2): 65-69.
- Tong, L. (2005). "Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **62**(16): 1784-1803.
- Toptaş, B. (2016). "Anticarcinogenic effects of curcumin and its analogs." *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* **40**(2): 58-82.
- Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell and C. M. Croce (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation." *Science* **226**(4678): 1097-1099.
- Twyman, R., R. M. Green and R. MacDonald (1992). "Kinetics of open channel block by penicillin of single GABAA receptor channels from mouse spinal cord neurones in culture." *The Journal of physiology* **445**(1): 97-127.
- Uddin, S., A. R. Hussain, P. S. Manogaran, K. Al-Hussein, L. C. Plataniias, M. I. Gutierrez and K. G. Bhatia (2005). "Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma." *Oncogene* **24**(47): 7022-7030.
- Uesugi, H., H. Shimizu, T. Maehara, N. Arai and H. Nakayama (2000). "Presence of human herpesvirus 6 and herpes simplex virus detected by polymerase chain reaction in surgical tissue from temporal lobe epileptic patients." *Psychiatry and clinical neurosciences* **54**(5): 589-593.
- Ullah, F., A. Liang, A. Rangel, E. Gyengesi, G. Niedermayer and G. Munch (2017). "High bioavailability curcumin: an anti-inflammatory and neurosupportive bioactive nutrient for neurodegenerative diseases characterized by chronic neuroinflammation." *Arch Toxicol* **91**(4): 1623-1634.

- Unnikrishnan, M. and M. Rao (1995). "Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin." *Molecular and cellular biochemistry* **146**(1): 35-37.
- Ushida, J., S. Sugie, K. Kawabata, Q. V. Pham, T. Tanaka, K. Fujii, H. Takeuchi, Y. Ito and H. Mori (2000). "Chemopreventive effect of curcumin on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats." *Jpn J Cancer Res* **91**(9): 893-898.
- Venkatesan, N., D. Punithavathi and V. Arumugam (2000). "Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats." *British journal of pharmacology* **129**(2): 231-234.
- Vezzani, A., J. French, T. Bartfai and T. Z. Baram (2011). "The role of inflammation in epilepsy." *Nat Rev Neurol* **7**(1): 31-40.
- Volterra, A. and J. Meldolesi (2005). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." *Nature Reviews Neuroscience* **6**(8): 626-640.
- Walden, J., H. Straub and E. J. Speckmann (1992). "Epileptogenesis: contributions of calcium ions and antiepileptic calcium antagonists." *Acta Neurol Scand Suppl* **140**: 41-46.
- Wang, J., Y. Liu, X.-H. Li, X.-C. Zeng, J. Li, J. Zhou, B. Xiao and K. Hu (2017). "Curcumin protects neuronal cells against status-epilepticus-induced hippocampal damage through induction of autophagy and inhibition of necroptosis." *Canadian journal of physiology and pharmacology* **95**(5): 501-509.
- Witter, M. P., H. J. Groenewegen, F. H. Lopes da Silva and A. H. Lohman (1989). "Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region." *Prog Neurobiol* **33**(3): 161-253.
- Wyatt, S. K., T. Witt, N. M. Barbaro, A. A. Cohen-Gadol and A. L. Brewster (2017). "Enhanced classical complement pathway activation and altered phagocytosis signaling molecules in human epilepsy." *Experimental Neurology* **295**: 184-193.
- Xu, S., Q. Sun, J. Fan, Y. Jiang, W. Yang, Y. Cui, Z. Yu, H. Jiang and B. Li (2019). "Role of astrocytes in post-traumatic epilepsy." *Frontiers in neurology* **10**: 1149.
- Young, I. and J. Woodside (2001). "Antioxidants in health and disease." *Journal of clinical pathology* **54**(3): 176-186.
- Yuan, J., W. Liu, H. Zhu, X. Zhang, Y. Feng, Y. Chen, H. Feng and J. Lin (2017). "Curcumin attenuates blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in mice." *Journal of Surgical Research* **207**: 85-91.
- Zha, W., Y. Bai, L. Xu, Y. Liu, Z. Yang, H. Gao and J. Li (2018). "Curcumin attenuates testicular injury in rats with streptozotocin-induced diabetes." *BioMed research international* **2018**.
- Zhang, F., N. K. Altorki, J. R. Mestre, K. Subbaramaiah and A. J. Dannenberg (1999). "Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid-and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells." *Carcinogenesis* **20**(3): 445-451.
- Zhang, X., Y. Tian, P. Yuan, Y. Li, M. A. Yaseen, J. Grutzendler, A. Moore and C. Ran (2014). "A bifunctional curcumin analogue for two-photon imaging and inhibiting crosslinking of amyloid beta in Alzheimer's disease." *Chemical communications* **50**(78): 11550-11553.
- Zhou, Q.-M., Y. Sun, Y.-Y. Lu, H. Zhang, Q.-L. Chen and S.-B. Su (2017). "Curcumin reduces mitomycin C resistance in breast cancer stem cells by regulating Bcl-2 family-mediated apoptosis." *Cancer Cell International* **17**(1): 1-13.
- Zhu, W., M. M. Cromie, Q. Cai, T. Lv, K. Singh and W. Gao (2014). "Curcumin and vitamin E protect against adverse effects of benzo [a] pyrene in lung epithelial cells." *PloS one* **9**(3): e92992.
- Zimmerman, G., M. Njunting, S. Ivens, E. Tolner, C. J. Behrens, M. Gross, H. Soreq, U. Heinemann and A. Friedman (2008). "Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats." *European Journal of Neuroscience* **27**(4): 965-975.

8. EKLER

EK-1



Original Article

Relationship Between N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide (NT-Pro BNP) Level, Infarct Type and Infarct Volume in Ischemic Cerebrovascular Disease

Journal of Stroke Medicine
1-6
© 2020 Indian Stroke Association
Reprints and permissions:
in.sagepub.com/journals-permissions-india
DOI: 10.1177/2516608520938552
journals.sagepub.com/home/stm

Selma Tekin¹, Çağatay Hilmi Öncel¹, Mehmet Bülent Özdemir², Yalın Tolga Yaylalı³, Işık Tekin³, Özcan Güneş¹, Simin Rota⁴, and Nuriye Kurbetli²

Abstract

Background: N-terminal probrain natriuretic peptide, which is a neurohormone produced mainly by the heart, is increased in acute ischemic cerebrovascular disease. Here we aimed to investigate the relationship of N-terminal probrain natriuretic peptide levels with cerebrovascular disease subtypes, infarct volume, and prognosis in cerebrovascular disease, and to determine if N-terminal probrain natriuretic peptide could be a biomarker for ischemic cerebrovascular disease.

Methods: Consecutive 105 patients with a diagnosis of acute ischemic cerebrovascular disease and 50 healthy controls were examined for serum N-terminal probrain natriuretic peptide concentration, cerebrovascular disease subtypes, infarct volumes, and clinical outcomes with the National Institute of Health Stroke Scale assessment.

Results: Mean N-terminal probrain natriuretic peptide values of cardioembolic group were significantly higher than lacunar infarct group ($P < .005$) and transient ischemic attack group ($P = .005$). There was a relation between worsening in the National Institute of Health Stroke Scale and elevation at N-terminal probrain natriuretic peptide ($P = .001$). However, between N-terminal probrain natriuretic peptide levels and infarct volume, significant correlation was not detected ($P = .44$).

Conclusion: N-terminal probrain natriuretic peptide can be used as a valuable marker to distinguish between cardioembolic infarct and lacunar infarct. In addition, N-terminal probrain natriuretic peptide levels might be used as a biomarker for differential diagnosis of transient ischemic attack group and to provide insight into the prognosis.

Keywords

Cerebrovascular disease, NT-proBNP, infarct type, transient ischemic attack, prognosis

Selma Tekin, Çağatay Hilmi Öncel, Mehmet Bülent Özdemir, Yalın Tolga Yaylalı, Işık Tekin, Özcan Güneş, Simin Rota, **Nuriye Kurbetli**; **Journal of Stroke Medicine 1-6 © 2020 DOI: 10.1177/2516608520938552**; “Relationship Between N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide (NT-Pro BNP) Level, Infarct Type and Infarct Volume in Ischemic Cerebrovascular Disease.”

EK-2



Biotechnic & Histochemistry

 Taylor & Francis
Taylor & Francis GroupISSN: 1052-0295 (Print) 1473-7760 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ibih20>

Protective effects of caffeic acid phenethyl ester and thymoquinone on toluene induced liver toxicity

S. Meydan, M. Esrefoglu, S. Selek, E. Akbas Tosunoglu, O. Ozturk, N. Kurbetli, N. Bayındır, H. Bulut & I. Meral

To cite this article: S. Meydan, M. Esrefoglu, S. Selek, E. Akbas Tosunoglu, O. Ozturk, N. Kurbetli, N. Bayındır, H. Bulut & I. Meral (2019) Protective effects of caffeic acid phenethyl ester and thymoquinone on toluene induced liver toxicity, *Biotechnic & Histochemistry*, 94:4, 277-282, DOI: [10.1080/10520295.2018.1554825](https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1554825)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1554825>

S. Meydan, M. Esrefoglu, S. Selek, E. Akbas Tosunoglu, O. Ozturk, **N. Kurbetli**, N. Bayındır, H. Bulut & I. Meral. “*Protective effects of caffeic acid phenethyl ester and thymoquinone on toluene induced liver toxicity*” **BIOTECHNIC & HISTOCHEMISTRY** 2019, VOL. 94, NO. 4, 277–282 <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1554825>.

EK-3



Dear danış aygün,

We are pleased to inform you that your paper proposal "**Türkiye'deki Anatomi Yayınlarının Bibliyometrik Analizi**" has been accepted for a 15-minutes oral presentation by the organization committee of the **5th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences** after reports from two reviewers. The congress will be online on December 18-19, 2020.

Your presentation abstract will be published in abstract book. Full paper will be published in a full paper book after two referees reports.

Looking forward to meeting you in congress.

Danış AYGÜN **Nuriye KURBETLİ**, Şahika Pınar AKYER. Türkiye'deki Anatomi yayınlarının bibliyometrik analizi, **Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi Temel Tıp Bilimleri Tam Metin Kitabı, 2020.**

EK-4



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu



Sayı :60758568-020/20087
Konu :Başvurumuz hk.

18/03/2019

Sayın Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER

İlgi :28/02/2019 tarihli dilekçeniz.

"Curcumin (zerdeçal)'in primer astroglial hücre hattında penisilin ile indüklenen astrosit stresine-ölümüne (nekrosis) koruyucu etkisi" konulu PAUHADYEK-2019/11 no'lu çalışmanız 07.03.2019 tarih ve 2019/02 sayılı toplantınızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasının Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 6 adet Sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Funda Fatma BÖLÜKBAŞI HATİP
Başkan