

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TOPİRAMAT VE SELENYUMUN PC12 HÜCRELERİNDE
Ca⁺² SİNYALİ, OKSİDATİF STRES VE HÜCRE CANLILIĞI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Seden DEMİRCİ

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

I. DANIŞMAN

Prof. Dr. Süleyman KUTLUHAN

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

2011-İSPARTA

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TOPİRAMAT VE SELENYUMUN PC12 HÜCRELERİNDE Ca⁺²
SİNYALİ, OKSİDATİF STRES VE HÜCRE CANLILIĞI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Seden DEMİRCİ

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

I. DANIŞMAN

Prof. Dr. Süleyman KUTLUHAN

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 1950-TU-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

2011-İSPARTA

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Süleyman KUTLUHAN başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ, Doç. Dr. H. Rifat KOYUNCUOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ'ye;

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na ve Arş. Gör. A.Cihangir UĞUZ'a;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma;

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim aileme;

İhtisas dönemimde ve tez aşamasındaki çalışmalarım boyunca desteği, fedakârlığı, sevgisi ile bana hep ümit veren eşim Dr. Kadir DEMİRCİ'ye,

Tez çalışmamın zorlu dönemlerinde mutluluk kaynağım olan biricik kızım Bengisu'ya,

Teşekkür ederim...

Dr. Seden DEMİRCİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Epilepsi.....	3
2.1.1. Epilepsi Patofizyolojisi	3
2.2. Topiramate (TPM)	5
2.2.1. Farmakodinamik Özellikleri	5
2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	7
2.2.3. Etkinlik ve Tolerabilite	8
2.3. Selenyum (Se)	8
2.3.1. Selenyum ve Epilepsi	10
2.4. Oksidatif Stres	12
2.4.1. Serbest Radikaller	12
2.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	15
2.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	15
2.4.1.3. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	16
2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri	17
2.4.2.1. Proteinlere Etkileri	17
2.4.2.2. Nükleik asitler ve DNA'ya Etkileri	17
2.4.2.3. Membran Lipitlerine Etkileri	17
2.4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	18
2.4.3.1. Süperoksit Dismutaz	19
2.4.3.2. Glutatyon Peroksidaz	20
2.4.3.3. Glutatyon.....	21
2.5. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali.....	22

2.6. Oksidatif Stres, Kalsiyum Sinyali ve Epilepsi	25
2.7. PC12 Hücreleri.....	27
2.8. Hücre Canlılığının MTT Analiziyle Saptanması	29
3. MATERYAL METOD	30
3.1. Materyaller	30
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	30
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Metot	32
3.2.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Tedavi.....	32
3.2.1.1. PC12 Hücre Kültürü.....	32
3.2.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü	33
3.2.2.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri.....	33
3.2.3. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi	34
3.2.4. Lipid Peroksidasyon Analizi	35
3.2.5. MTT Analizi	35
3.3. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. PC12 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu Düzeyleri	37
4.2. PC12 Hücrelerinde GSH ve GSH-Px Düzeyleri.....	38
4.3. H ₂ O ₂ 'nin Hücre Canlılığı Üzerine Toksik Dozunun Tayini	40
4.4. Se'nin Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik ve Toksik Dozunun Tayini	40
4.5. Topiramatin Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik ve Toksik Dozunun Tayini .	41
4.6. PC12 hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu [Ca ⁺²] _i Salınımı Düzeyleri	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
ÖZET.....	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

[Ca⁺²]_i	: Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
ADP	: Adenozin difosfat
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metilisoksozol-4-propionik asit
AP-1	: Aktivatör protein-1
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
Cu⁺	: Bakır iyonu
DAG	: Diaçilgliserol
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EEG	: Elektroensefalografi
Fe⁺²	: Demir iyonu
GABA	: γ -aminobütirik asit
GSH R	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
IP₃	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
K⁺	: Potasyum iyonu
MDA	: Malondialdehit
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
Na⁺	: Sodyum iyonu
NAD⁺	: Okside nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-kappaB	: Nükleer faktör-kappa B
NGF	: Nöronal büyüme faktörü
NMDA	: N-metil-D-aspartat
O₂	: Moleküler oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali

OH[·]	: Hidroksil radikali
PC12	: Rat feokromasitoma hücre dizisi
PDK	: Paroksismal depolarizasyon kayması
PIP₂	: Fosfoinositoldifosfat
ROOH	: Hidroperoksit
Se	: Selenyum
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBARS	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TPM	: Topiramet
VBKK	: Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Topiramatin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2. Topiramatin moleküler görünümü.....	5
Şekil 3. Selenyumun metabolizması.....	9
Şekil 4. Selenyum ve epilepsi arasındaki ilişki.....	12
Şekil 5. Serbest radikaller ve enzimatik detoksifikasyonu.....	22
Şekil 6. Nöronal Ca^{+2} homeostazı.....	25
Şekil 7. SOD mutasyonu sonucu epileptik nöbet oluşumu.....	26
Şekil 8. PC12 hücrelerinin faz kontrast mikroskopik görünümü.....	28
Şekil 9. PC12 hücrelerine nöronal büyüme faktörü ilave edilmesiyle oluşan faz kontrast mikroskopik görünüm.....	28

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. PC12 hücre gruplarında lipid peroksidasyon düzeyleri.....	38
Grafik 2. PC12 hücre gruplarında GSH düzeyleri	39
Grafik 3. PC12 hücre gruplarında GSH-Px düzeyleri.....	39
Grafik 4. PC12 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.	40
Grafik 5. PC12 hücrelerinde Se'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.....	41
Grafik 6. PC12 hücrelerinde TPM'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.	42
Grafik 7. PC12 hücre gruplarında oksidatif stresin (H ₂ O ₂) neden olduğu sitozole Ca ⁺² salınımı üzerindeki etkileri.	43
Grafik 8. Kontrol grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	43
Grafik 9. TPM grubunda hücre sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği.....	44
Grafik 10. H ₂ O ₂ grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	44
Grafik 11. Se grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği.....	45
Grafik 12. Se+TPM grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	45
Grafik 13. TPM+H ₂ O ₂ grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	46
Grafik 14. Se+H ₂ O ₂ grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	46
Grafik 15. Se+TPM+H ₂ O ₂ grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği..	47
Grafik 16. PC12 hücre gruplarının sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	34
Tablo 2. Topiramát ve selenyumun lipid peroksidasyonu, indirgenmiş glutatyon ve glutatyon peroksidaz düzeyleri üzerindeki etkileri	37

1. GİRİŞ

Epilepside altta yatan patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir (1). Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin epilepsi patofizyolojisinde rolü olduğunu göstermektedir (2- 4).

Topiramate (TPM), doğal monosakkarid D-fruktozun sülfamat içeren bir türevidir ve yapısal olarak diğer antiepileptiklerden farklıdır (5- 7). Yeni kuşak bir antiepileptik olan TPM, voltaj-duyarlı sodyum ve kalsiyum kanallarını inhibe ederek, glutamatın kainat ve α -amino-3-hidroksi-5-metilisoksozol-4-propionik asit (AMPA) reseptörlerini bloke ederek, γ -aminobütirik asit (GABA) tip A reseptörünün düzenlediği klor akışını arttırarak etkisini gösterir (8). TPM'nin, antiepileptik özelliği yanında nöroprotektif özelliğinin de olduğu gösterilmiştir (9).

Selenyum (Se), insan biyolojisi için temel öneme sahip bir esansiyel eser mineraldir (10). Antioksidan olarak görev alır ve vücudu oksidatif strese karşı korur (11). Antioksidan özelliğini, yapısına girdiği glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi ile hidrojen peroksitin (H_2O_2) parçalanması veya lipid hidroperoksitlerin temizlenmesi ile gerçekleştirmektedir (12,13). Se, sinir sistemi fonksiyonlarının devamında önemli rol oynar (14). Yapılan çalışmalarda, Se'nin epilepsi patojenezinde önemli rolü olabileceği düşünülmektedir (14,15).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur, bu duruma oksidatif stres denir (3,16). Santral sinir sistemi, vücuttaki diğer organlara nazaran oksidatif hasara daha duyarlıdır (3).

Kalsiyum iyonu (Ca^{+2}), normal nöronal fonksiyonlar için önemli rol oynar (17). Alzheimer, Parkinson ve Huntington Hastalığı ile epilepside, Ca^{+2} homeostazisindeki bozukluğa bağlı kalsiyum artışı sonucu nöronal kayıp tespit edilmiştir (18). Serbest radikallerin aşırı üretilmesi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olmak üzere birçok kanalı uyarak sitozole kalsiyum akışına neden olur. Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması ile serbest radikal üretimi daha da artar. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir (19).

Rat feokromasitoma hücreleri olan PC12 hücreleri, nöronun tipik özelliklerini gösterir. Bu yüzden nöronların hücresel biyolojisi ile ilgili çalışmalar için iyi tanımlanmış bir modeldir (20- 22).

Bu çalışmada:

1- Epilepsi fizyopatolojisinde öne sürülen oksidatif stres göz önüne alınarak; PC12 hücrelerine H_2O_2 vererek oksidatif stres oluşturmak hedeflendi.

2- Yeni bir antiepileptik olan TPM'nin nöroprotektif etkinliğini hangi mekanizma üzerinden gösterdiğini bulabilmek amacıyla; oksidatif stres göstergeleri olan glutatyon (GSH), GSH-Px, lipid peroksidasyonu, sitozole kalsiyum akışı üzerine etkileri ile hücre canlılığı üzerine etkilerini ölçmek planlandı.

3- Epilepsi tedavisinde antioksidanların etkili olduğu ileri sürülmüştür (23). Antioksidan bir element olan Se'nin tek başına veya TPM ile birlikte kullanımının hücre GSH, GSH-Px, lipid peroksidasyonu, sitozole kalsiyum akışı üzerine etkileri ile hücre canlılığı üzerine etkilerini ölçmek planlandı.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Epilepsi

Epileptik nöbet, kortikal nöronların kendini sınırlayıcı, anormal, hipersenkron elektriksel deşarjlarına bağılı olarak ortaya çıkan beyinin geçici fizyolojik disfonksiyonudur (24). Epilepsi, provakatif bir faktörün eşlik etmediğı iki ya da daha fazla sayıda tekrarlayan nöbetlerle karakterizedir (25). Epilepsi, dünyada yaklaşık 50 milyon kişiyi etkileyen ciddi bir nörolojik hastalıktır (26).

2.1.1. Epilepsi Patofizyolojisi

Epilepsi, anormal nöronal membranlar varlığı ya da eksitatör ve inhibitör etkilerin dengesizliği nedeniyle oluşur (27,28). Altta yatan patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir (29). Epileptogenez terimi, normal nöronal bağlantıların aşırı uyarılabilir hale gelerek tekrarlayan spontan nöbetler oluşturmasını ifade eder (28).

Epileptogenez oluşumuyla ilgili moleküler mekanizmalar arasında; voltaj bağımlı Na^+ kanallarının aktivasyonu, kortikal yapıların ana inhibitör nörotransmitteri olan GABA sentez veya yıkımındaki değışiklikler, hücresele GABA alımının inhibisyonu, çeşitli uyarıcı aminoasit reseptörlerinin modülasyonu ve adozin metabolizmasındaki düzenleme ile ortaya çıkan değışiklikler yer alır (28,30). Son yıllardaki çalışmalarda, epileptogenezin moleküler mekanizmaları daha çok reseptör alt gruplarındaki değışiklikler ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu değışikliklerin başında N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonu ve Ca^{+2} nin hücreye girişı gelmektedir. Ca^{+2} 'nin hücreye girişı, AMPA ve NMDA sinaptik geçişte artışı ve GABAerjik inhibitör sinaptik geçişte akut bir azalmayı tetikleyebilir. Aynı zamanda GABAerjik uyarıcı etkilerdeki net bir artış, ektopik aksiyon potansiyeli veya depolarizasyon potansiyelinde artışlara yol açabilir ve sonunda Na^+ , K^+ , Ca^{+2} kanalları veya iyon değış-tokuş mekanizmaları gibi diğere düzenleyici sistemlerde ikincil değışiklikler gelişebilir (30).

Nöbet odağındaki her nöronun stereotipik ve senkronize elektriksel yanıtına paroksizmal depolarizasyon kayması (PDK) denir (31). Bu durumda membranı

depolarize eden postsinaptik potansiyelin anormal şekilde uzaması ve büyümesi söz konusudur ve sonuç olarak nöronlar gruplar halinde ateşlenebilir ve etraflarındaki nöronları benzer şekilde ateşleyebilecek bir kapasiteye ulaşırlar (28). PDK'lar bir dizi aksiyon potansiyelini tetikleyen ani, büyük, uzun süreli depolarizasyonlardır. PDK'yı bir ard-hiperpolarizasyon izler. PDK ve ard-hiperpolarizasyon nöronun intrinsek membran özellikleri (voltaj bağımlı Na^+ , K^+ , ve Ca^{+2} kanalları) ve eksitator ve inhibitör nöronlar tarafından şekillenir (31). Normal şartlar altında, piramidal nöronların alt kümesi olan korteksin V. tabakası ve hipokampusun CA3 bölgesi kısa depolarizasyona ani patlama yanıtı oluşturabilir (32).

Epilepsi oluşum mekanizmalarına yaklaşım idiyopatik ve semptomatik/kriptojenik epilepsiler için farklıdır. İdiyopatik epilepsilerde daha çok serebral maturasyonun erken evrelerinde oluşan genetik bir defekt sorumlu tutulurken semptomatik epilepsiler için saptanan ya da saptanmayan yapısal bir lezyonun varlığı kabul edilir. Bu lezyonlar;

- Dendritik dallanmanın oluşumunu bozarak dikensi çıkıntıları ortadan kaldırırlar ve eksitator sinapsları akson tepeciğine yaklaştırabilirler.
- İyon kanallarında yeni bir organizasyona neden olabilirler.
- Sinaptik terminalleri tahrip ederek geriye kalan aksonların yeniden filizlenmesine ve nöronal senkronizasyonuna yol açarak tekrarlayıcı kollateral eksitasyonlara yol açabilirler.
- Senkronizasyonun güçlenmesine neden olabilirler (33).

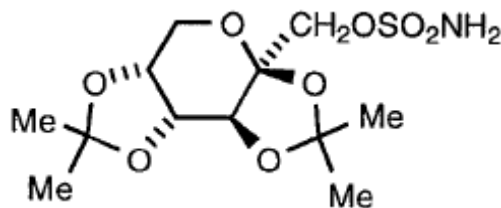
Afferent girdilerde yapısal veya fonksiyonel değişimler spesifik transmitterlerin kullanımını değiştirir. Reseptörlerin tekrar yapılanmasına neden olurlar. Moleküler düzeyde proteinlerin konfigürasyonundaki değişimler presinaptik ve postsinaptik kalsiyum iyon dengesini değiştirerek sinaptik bağlantıları etkiler. Sonuçta iyonik mikroçevrede değişen su ve pH dengesi nöronal enerji metabolizmasını değiştirir. Eşlik eden glial doku değişimleri sonucunda transmitterlerin deaktivasyonu bozulur ve nöronal ateşleme paternleri farklılaşır (33).

2.2. Topiramate (TPM)

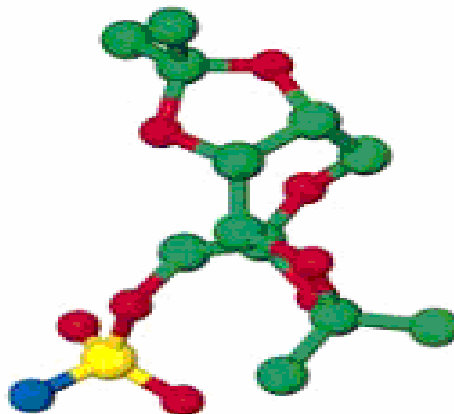
Yeni antiepileptik ilaçlardan olan TPM, 1979 yılında sentezlenmiş ve 1995 yılında ilk kez İngiltere’de kullanıma sunulmuştur (34). Epilepsi dışında, bipolar bozukluk, şizoafektif bozukluk, bulimia nervosa gibi bazı psikiyatrik hastalıklarda, migren ve küme baş ağrısı profilaksisinde, nöropatik ağrı ve esansiyel tremorda da etkinliği gösterilmiştir (5,35,36).

2.2.1. Farmakodinamik Özellikleri

Topiramate [2,3:4,5-bis-0-(1-metiletiliden)-β-D-fruktopiranoz sülfamat] doğal monosakkarid D-fruktozun sülfamat içeren bir türevidir ve yapısal olarak diğer antiepileptiklerden farklıdır. Molekül formülü $C_{12}H_{21}NO_8S$ olan beyaz renkli kristalize bir tozdur, alkali solüsyonlarda daha iyi çözünür (8,9,37). TPM’nin kimyasal yapısı şekil 1’de, moleküler görünümü şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Topiramatin kimyasal yapısı [2,3:4,5-bis-0-(1-metiletiliden)-β-D-fruktopiranoz sülfamat; $C_{12}H_{21}NO_8S$] (37).



Şekil 2. Topiramatin moleküler görünümü (38).

Topiramatin etki mekanizmaları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Voltaj-duyarlı Na⁺ kanallarını bloke ederek epileptiform deşarjları azaltır (39-42). Hipokampal nöronal kültürde oluşturulan nöbet modelinde, spontan epileptiform deşarj süresini ve her deşarjda oluşan aksiyon potansiyellerinin sıklığını azalttığı gösterilmiştir (39).
- GABA_A reseptörünün düzenlediği klor akışını arttırarak, GABA_A reseptörü üzerine düzenleyici etkisi vardır (5,37,39,41,42). GABA aktivitesini doza bağlı olarak arttırır (43). Fare kortikal nöronlarında, GABA ilişkili klor akışını hızlı ve reversibl olarak arttırarak GABAerjik transmisyonu etkili hale getirdiği gösterilmiştir (5). TPM'nin benzodiazepinlere benzer şekilde GABA_A kanalı üzerine etkisi olmasına rağmen, etkilerinin bir benzodiazepin antagonisti olan flumazenil tarafından inhibe edilmemesi, ilginç olarak TPM'nin GABA reseptör kompleksinde, benzodiazepin bağlanma yerinden farklı bir yere etki ettiğini göstermektedir (8).
- Eksitator nörotransmitter olan glutamatın kainat ve AMPA reseptörlerini seçici olarak antagonize eder. Ancak NMDA reseptörleri üzerinde anlamlı etkisi yoktur (41,42,44).
- Nöronal uyarılabilirliğin kontrolünde rol oynadığı bilinen L tipi kalsiyum kanalları üzerinde düzenleyici etkisi vardır (5,8,45). L tipi yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanallarında negatif modülasyon sağlar ve kalsiyum akışını azaltır. Ayrıca yakın zamanda yapılmış çalışmalarda, TPM'nin CA1 hipokampal nöronlarda R tipi kalsiyum kanallarının aktivasyonunu inhibe ederek iktal benzeri aktiviteyi azalttığı da gösterilmiştir (8).
- Karbonik anhidraz izoenzimlerini özellikle tip II ve tip IV' ü zayıf olarak inhibe eder (5,39,41,42). Ancak bu etkinin antiepileptik aktiviteyle ilişkili olduğu düşünülmemektedir (42,43). Karbonik anhidraz enzimi vücutta birçok yerde bulunan ve başlıca asit-baz tampon sisteminde görevli karbondioksit ile suyun birleşmesini katalize eden enzimdir. TPM, karbonik anhidraz enzim inhibisyonu sonucu bikarbonat seviyesini azaltabilir ve metabolik asidoza neden olabilir (5,8).
- Potasyum kanallarını aktive ederek nöronların uyarılabilirliğini azaltır (41,46-49)

2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

Topiramatin biyoyararlanımı % 81'dir (41). Yiyeceklerle alınması emilimini kısmen geciktirir; ancak klinik önemi yoktur. Maksimum plazma konsantrasyonuna yaklaşık 2 ile 4 saatte ulaşmaktadır (50). Emilimi dozla doğru orantılıdır. Plazma proteinlerine zayıf olarak (% 13-17 oranında) bağlanır bu nedenle diğer ilaçlarla etkileşme olasılığının az olduğu bildirilmektedir (41,51). TPM büyük oranda metabolize edilmez ve %70-80'i böbrekler yolu ile atılır. Hepatik metabolizması sınırlıdır (41). Hepatik enzimlerden sadece CYP2C19'u inhibe ettiği gösterilmiştir (52). Aktif metaboliti yoktur. Böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması önerilmektedir. Karaciğer yetmezliğinin ise TPM farmakokinetiği üzerinde çok az etkisi olduğu düşünülmektedir (43). Ortalama plazma eliminasyon yarılanma ömrü 19-25 saattir (41). Normal böbrek fonksiyonlarına sahip hastalarda yaklaşık 4 günde kararlı duruma erişilir (51). Irk ve cinsiyetin kararlı durum farmakokinetiği üzerine anlamlı etkisi yoktur. Yaşa bağlı farmakokinetik etkileşim gözlenmemiştir (43).

Erişkinlerde başlangıç dozu ilk hafta 25-50 mg/gündür. Yan etkilerin tolere edilebilmesi açısından tedaviye düşük dozla başlanması önerilmektedir. Sonraki her 1-2 haftada, 25-50 mg arttırılmalıdır. Erişkinlerde monoterapi için önerilen başlangıç hedef doz, günde 2'ye bölünmüş olarak 100 mg/gündür. Kombinasyon tedavisinde erişkinler için idame dozu 200-400 mg/gündür. Tedaviyi sonlandırırken de haftalık 50-100 mg azaltılması önerilmektedir (8,53-55).

Enzim indüksiyonu yapan fenitoin ve karbamazepin gibi antiepileptiklerle birlikte kullanıldığında TPM'nin plazma konsantrasyonu azalır. Lamotrijin, valproik asit, fenobarbital ve pirimidon gibi diğer antiepileptik ilaçlar ile birlikte kullanıldığında doz ayarlamasına gerek olmadığı saptanmıştır (41). TPM, antiepileptiklerin dışında digoksin ve oral kontraseptifler ile birlikte kullanıldığında, plazma konsantrasyonlarını azaltabilir (53).

Topiramatin plasentayı aştığı ve ayrıca anne sütüne geçtiği gösterilmiştir. Teratojenisite derecelendirmesinde C kategorisinde yer almaktadır (50).

2.2.3. Etkinlik ve Tolerabilite

Farklı etki özelliklerine sahip olduğundan, TPM'nin geniş bir etki spektrumu vardır (56). Erişkin ve çocuk hastalarda primer jeneralize tonik klonik nöbetlerde, sekonder jeneralize olan ya da olmayan parsiyel nöbetlerde, dirençli parsiyel nöbetlerde ve Lennox-Gastaut sendromu ile ilişkili düşme ataklarında ve tüm nöbet tiplerinde etkili olduğu bulunmuştur (57-62).

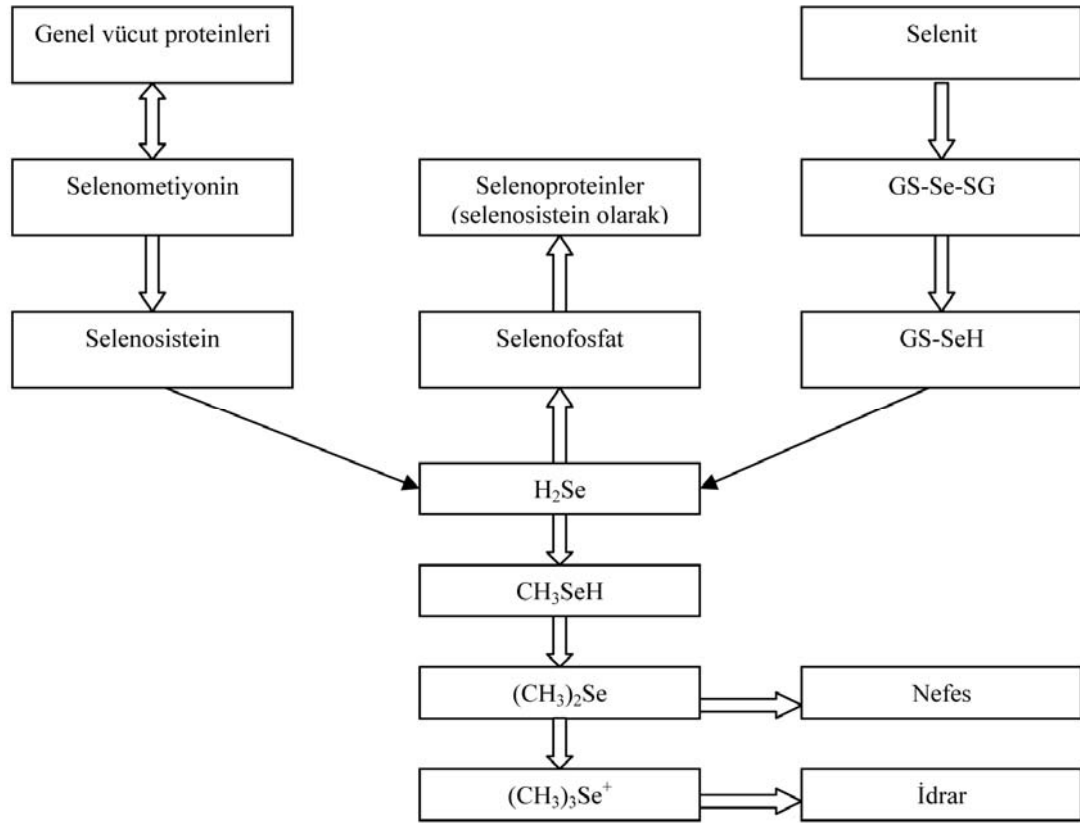
Topiramate genellikle iyi tolere edilen bir ilaçtır. Kardiyovasküler fonksiyonlar, kemik dansitesi, kemik iliği hücreleri ve tiroid fonksiyonları üzerine anlamlı etkisi saptanmamıştır. En sık görülen yan etkileri santral sinir sistemi ile ilgilidir (8). Dozdan bağımsız en sık gözlenen yan etkiler; somnolans, baş dönmesi, ataksi, konuşma problemleri, motor yavaşlama, bellek güçlüğü, parestezi ve görme bozukluklarıdır. Dozla bağlantılı bildirilen en sık yan etkiler ise; yorgunluk, sinirlilik, konsantrasyon güçlüğü, konfüzyon, depresif belirtiler, anoreksi ve kilo kaybıdır (43). Hastaların yaklaşık %1,5'unda böbrek taşı oluşumu saptanmıştır, bu yan etkisi karbonik anhidraz enzim inhibisyonuna bağlıdır, bu nedenle hastaların iyi hidrate edilmesi önerilmektedir (8,25,63). En sık görülen oküler yan etkiler ise; akut glokom, akut miyopi, subkoroidal efüzyon, periorbital ödem ve skleritistir.

2.3. Selenyum (Se)

Selenyum, ilk kez 1817'de kimyacı Berzelius tarafından keşfedilmiştir (10). İnsan biyolojisi için temel öneme sahiptir. Birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir eser elementtir (64). Diyet, Se'nin major kaynağıdır ve alınan miktar, yiyeceklerdeki konsantrasyona ve tüketilen yiyecek miktarına bağlıdır (65, 66). Başlıca karaciğerde, kasta, böbrekte ve plazmada bulunmaktadır (67). Erişkin insan beyninin değişik bölgelerinde farklı Se konsantrasyonu bildirilmiştir (68).

Selenyum, doğal olarak organik (selenometiyonin, selenosistein) ve inorganik (selenit, selenat, selenid) formlarda bulunur (69). Selenit ve selenat in vivo olarak selenosisteine çevrilir (19). Selenometiyonin, barsaktan absorpsiyonunda metiyonin ile yarışır, metiyonin içeren vücut proteinlerine katılır ve depolanır. Transsülfürasyon ile selenosisteine çevrilebilir (67). Tüm bu seleno bileşikleri hidrojen selenide

katabolize edilebilir ve dimetil selenid olarak solunum yoluyla veya trimetilselenonyum iyonu olarak idrarla atılır (19). Se'nin önerilen günlük alınması gereken miktar 55 µg.dır (70). Se metabolizması şekil 3'de gösterilmiştir (71).



Şekil 3. Selenyumun metabolizması (71). H₂Se: hidrojen selenid, CH₃SeH: metil selenid, (CH₃)₂Se: dimetil selenid, (CH₃)₃Se⁺: trimetilselenonyum iyonu, GS-Se-SG: selenodiglutasyon, GS-SeH: glutasyon selenid

Selenyum, insan organizmasında bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır (72). Biyolojik etkilerini, yapısında selenosistein aminoasidi bulunan selenoproteinler yoluyla göstermektedir (12,13,73). Selenosistein biyolojik pH da anyonik halde bulunur ve bu özelliği, elektron alışverişi yoluyla biyolojik redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Selenoproteinlerin enzimatik redoks aktiviteleriyle birlikte yapısal ve transport fonksiyonları da vardır (64).

Selenyum, selenosistein halinde GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunur. GSH-Px, E vitamini ile sinerjik çalışan antioksidan bir enzimdir. İndirgenmiş GSH ile H₂O₂ ve lipit hidroperoksitlerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmada ve önlemede rol oynar.

İnflamatuvar cevabın regülasyonunda da rol alır (13). İyodotironin deiyodinaz, tiroit hormon metabolizmasında tetraiyodin tiroksini, triiyodin tiroksine çevirir (74). Antioksidan sistemin major komponentinden biri olan tiyoredoksin redüktaz; hücre ölümü, DNA hasarı ve doku atrofisine neden olan peroksit ve hidroperoksitlerin azaltılmasından sorumludur (67). Ayrıca lipoik asit ve C vitamininin geri dönüşümünü sağlar, K₃ vitamininin metabolizmasını düzenler ve hücre büyümesinin, tümör supresör protein p53'ün düzenlenmesinde etkilidir (75). Se; selenoproteinler ve selenoprotein bağımlı enzimler yolu ile reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasara karşı koruma sağlar (19).

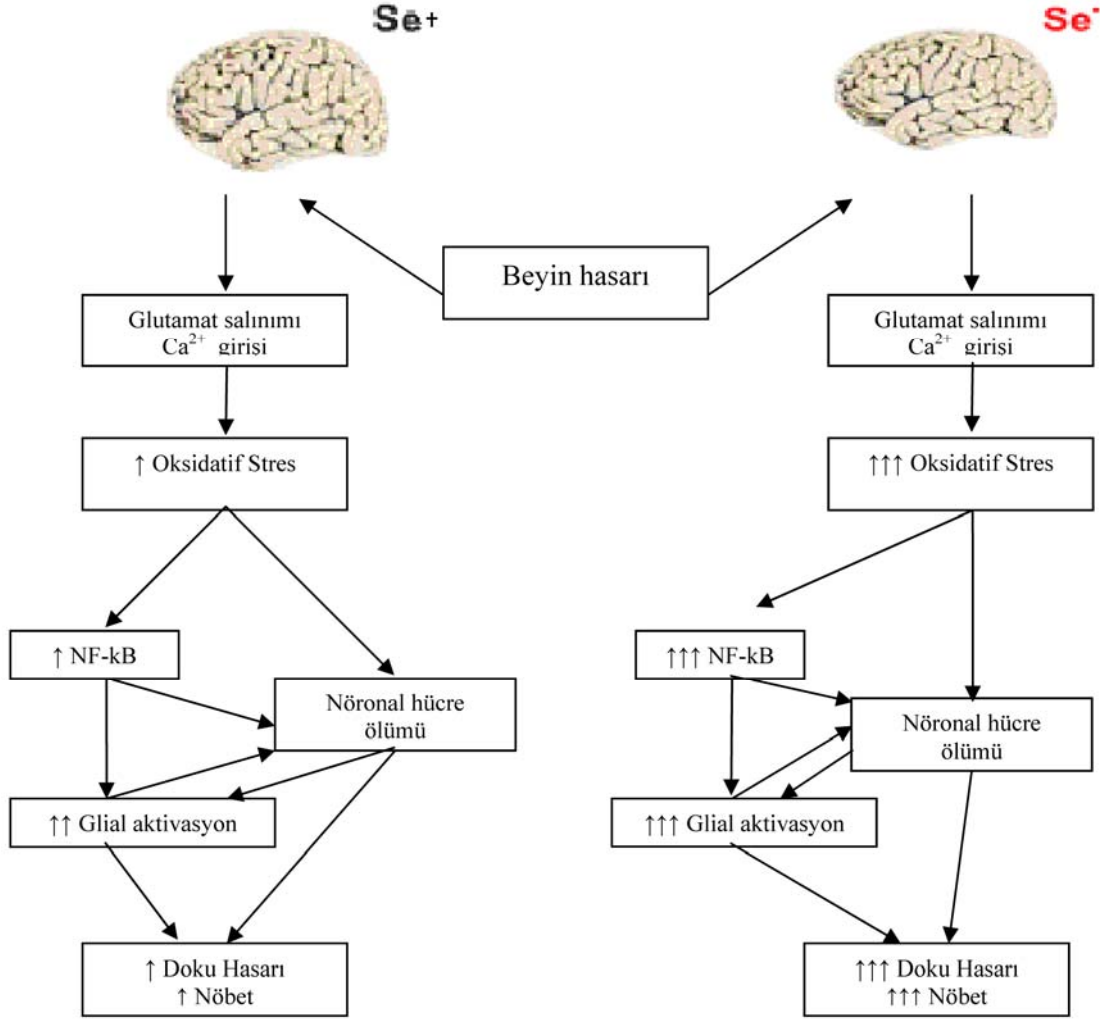
Selenyumun, eser düzeylerde normal büyüme ve gelişme için gerekli olduğu, ılımlı düzeylerde depolanabileceği ve homeostatik fonksiyonların sürdürülmesinde gerekli olduğu, yüksek düzeylerin toksik etkilerle sonuçlanabileceği bildirilmiştir (76). Se yetersizliği, Se içeren enzimlerin suboptimal işlevleri sonucunda azalmış antioksidan savunma, redoks regülasyonu ve enerji üretimi ile ilişkilidir (77). Se eksikliğinin artmış kanserle ve infeksiyon riskiyle, erkek infertilitesiyle, immünite ve tiroid fonksiyonlarında azalmayla ilişkisi gösterilmiştir (11). Hipertansiyon, Diabetes Mellitus, kronik karaciğer hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, epilepsi, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığında düşük serum Se düzeyleri bildirilmiştir. Ayrıca, endemik bir kardiyomiyopati olan Keshan hastalığı ile endemik bir osteoartropati olan Kashin-Beck hastalığı ve ağır büyüme geriliği, mental retardasyon ve hipotiroidizm ile karakterize olan miksödematöz kretenizm gibi nadir hastalıklarda da düşük Se düzeyleri bildirilmiştir (70,78-80).

2.3.1. Selenyum ve Epilepsi

Selenyum, sinir sistemi fonksiyonlarının devamında önemli bir esansiyel elementtir. Nöbet sırasında artmış nörometabolik aktivite, elektrofizyolojik bütünlüğün bozulmasına ve nöronal membranların instabilitesine yol açarak peroksidatif hasar ile birlikte oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına, lipid peroksidasyonuna ve nöronal hasarın artmasına neden olmaktadır. Nöbetlerin kontrolünde, antioksidan savunma sistemi aktivitesindeki azalma veya serbest oksijen radikali oluşumundaki artıştan kaynaklanan membran lipid peroksidasyonunun kritik role sahip olduğu belirlenmiştir. Se, antioksidan savunma

mekanizmasında ve oksidatif regülasyonda önemli rol oynamaktadır. Antioksidan savunma mekanizması, membran bütünlüğünün devamında önemli olup prostasiklin üretiminden korur; lipid, lipoprotein ve deoksiribonükleik asit gibi biyolojik moleküllere olan oksidatif hasarı azaltır (14).

Epilepside altta yatan nedenler halen araştırılmaktadır (70). Ashrafi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, dirençli nöbetleri olan çocuk hastalarda ortalama serum Se seviyesi ve GSH-Px aktivitesi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (14). Shams ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada epileptik hastalarda serum Se seviyesini ve GSH-Px aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulmuşlar, Se ve GSH-Px'in epilepsi patojenezinde önemli rolü olabileceği sonucuna varmışlardır (15). Ramaekers ve arkadaşları, dirençli nöbetleri olan ve Se eksikliği saptanan 2 çocuk hastada, Se ilavesi ile nöbetlerde azalma ve elektroensefalografi (EEG) kaydında düzelme olduğunu, Se'nin geri çekilmesi ile nöbetlerin tekrarladığını ve sadece Se ilavesiyle nöbetlerin kontrol altına alınabildiğini bildirmişlerdir (81). Willmore ve Rubin'in Se'nin beyin fonksiyonları üzerine yaptıkları çalışmada, Fe^{+2} 'nin indüklediği epileptik deşarj modelinde, Se uygulaması ile EEG anormalliklerinin düzeldiği gözlenmiştir (82). Öztaş ve arkadaşları, pentilentetrazol ile indüklenen nöbette, bozulmuş kan beyin bariyerinin, diyetteki Se desteği ile azaldığını göstermişlerdir (83). Savaksan ve arkadaşları, hipokampal nöronal hücre kültüründe, fizyolojik seviyede selenitin, glutamatın neden olduğu hücre ölümüne karşı koruyucu olduğunu; Se'nin glutamatın indüklediği NF-kappaB ve AP-1 aktivasyonunu inhibe ettiğini ve Se'nin protein sentezi için gerekli olduğunu bulmuşlardır. Eksitotoksik kainat modelinde, Se'den fakir diyetle beslenen ratlarda, Se'den yeterli diyet alan ratlara kıyasla nöbet aktivitesinin ve hücre ölümünün daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (84). Se ve epilepsi arasındaki ilişki şekil 4 de gösterilmiştir (70).



Şekil 4. Selenyum ve epilepsi arasındaki ilişki (70). NF-kB: nükleer faktör-kappa B

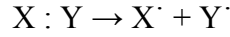
2.4. Oksidatif Stres

2.4.1. Serbest Radikaller

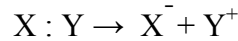
Serbest radikaller; son yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, kimyasal olarak çok aktif, zararlı moleküllerdir (85). Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle hızlı reaksiyona girme ve bu son yörüngelerindeki elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini oldukça artırır (86).

İnsan vücudunda serbest radikaller 3 yolla meydana gelir (16):

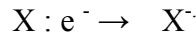
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Fizyolojik şartlarda serbest oksijen radikalleri; hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu, karaciğerde detoksifikasyon işlemi gibi vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynar. Diabetes mellitus, kanser gelişimi, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın etyolojisinde ve ilerlemesinde serbest oksijen radikallerinin rol oynadığı gösterilmiştir (87,88)

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Endojen etmenler organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar. Oksijen, nitrik oksid, aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı, araşidonik asit metabolizması başlıca endojen kaynaklardır. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında; diyet faktörleri, stres, çevresel faktörler (hava kirliliği), ilaçlar, ksenobiyotikler, zararlı ışınlar (x-ray, U.V. vs.) yer alır (85,89-91).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (92). Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahiptir. Bu yüzden bazen oksijen biradikal olarak değerlendirilir. (93). Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle

singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Organizmada geçiş metalleri (Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla, moleküler oksijene tek elektronların transferi ile oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal oluşunun bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri normal oksijen metabolizması sırasında oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir (OH^{\cdot}) (94). Reaktif oksijen türleri özellikle santral sinir sistemi için toksik oluşumlardır, yani radikaller bir tür nörotoksindir (95). Reaktif oksijen türlerinin oluşum basamaklarında öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen, $O_2^{\cdot-}$ ye dönüşür. $O_2^{\cdot-}$ ye iki elektron eklenmesi ile H_2O_2 oluşur. H_2O_2 , univalan redüksiyonu ile diğer bir protonun eklenmesi sonucu suya ve OH^{\cdot} ne dönüşür. OH^{\cdot} i de univalan redüksiyon ile suya dönüşür (96).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (16).

Santral sinir sistemi, vücuttaki diğer organlara nazaran oksidatif hasara daha duyarlıdır. Bunun olası nedenleri şu şekilde özetlenebilir:

Beyin vücut ağırlığının sadece küçük bir bölümünü oluşturmasına rağmen inhale edilen oksijeni büyük miktarda kullanmaktadır. Bu da nöron hücrelerinin diğer organlara göre neden daha çabuk tahrip olduğunu göstermektedir.

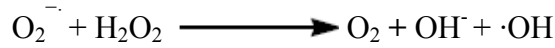
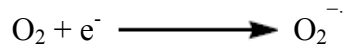
Beyin çok yüksek konsantrasyonda demir ve askorbik asit içermektedir. Bağlanmamış demir tek başına ve askorbik asitle kombine halde aktif olarak oksidanları meydana getirir.

Beyin oksidatif olayları kolayca başlatan ve çoğaltan, idame ettiren çoklu doymamış yağ asitlerini yüksek konsantrasyonda bulundurmaktadır.

Beyin, kan beyin bariyeri sayesinde çeşitli toksinlerin santral sinir sistemine girişine engel olduğu gibi aynı zamanda çeşitli antioksidanların da girişini sınırlar. Beyinde antioksidan enzim aktivitesi düşüktür (97,98).

2.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

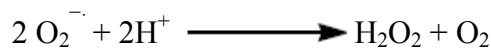
Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda süperoksit radikali oluşur (99).



Süperoksit radikali, mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) okside nikotinamid adenin dinükleotide (NAD^+) okside olması ile üretilir. Ayrıca pek çok oksidaz tarafından da üretilir. Genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde, ortamın pH sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali ismini alır. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır . Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyal enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır (93).

2.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

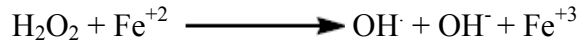
Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik / nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur (100).



Hidrojen peroksit aslında radikal değildir. Ancak üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Haber-Weiss reaksiyonu). H_2O_2 başka bir şekilde de serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (Fenton reaksiyonu). Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler (93,100).

2.4.1.3. Hidroksil Radikali (OH[·])

Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur.



Hidroksil radikali, bilinen en reaktif radikaldir. Aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğuyla reaksiyona girebilir (93). DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından, proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hücre zarı su içermediğinden, hidroksil radikalının başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp yine hücre ölümüne neden olabilir (100).

2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri

2.4.2.1. Proteinlere Etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin özellikle duyarlı amino asitler ile doğrudan etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aminoasitler, oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir (89). Serbest radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran taşıyıcı proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozarlar (101).

2.4.2.2. Nükleik asitler ve DNA'ya Etkileri

Serbest radikallerin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (100,102,103). DNA'nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (89).

2.4.2.3. Membran Lipitlerine Etkileri

Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum, vs.) membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif strese duyarlıdır (85). Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (104). Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranının akışkanlığında azalma, membran geçirgenliğinde değişme, membran potansiyelinde azalma, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir. Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteoliz

hızlanır ve doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir (89,105). Lipit peroksidasyonu sinir hücrelerinin lipit zengin membranlarından dolayı birçok nörolojik hastalıkta önemlidir. Lipid peroksidasyonunun ilk aşamasında yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren H atomu çıkarılması ile lipid radikali oluşur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini oluşturur. Lipid peroksit radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksitler ortamdaki H atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksitleri oluştururlar. Lipid peroksitler daha sonra malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler (93). MDA'nın asıl kaynağı ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda ve eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksitlerdir. MDA, protein amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olur. Membranlardan kolaylıkla difüze olarak, DNA yapısında yer alan nitrojen bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Lipid peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edildiğinden; peroksidasyon sırasında oluşan konjüge dienlerin ölçümü, in vivo lipit peroksit düzeyini yansıtabilecek önemli bir yöntemdir. MDA miktarının tiyobarbitürik asit testi ile ölçümü bu amaçla kullanılmaktadır (85).

2.4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Temizleme etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.

2. Baskılama etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.

3. Onarma etkisi: Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (93,106)

Antioksidanlar, endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir:

A) Endojen antioksidanlar

1. Enzimler: Süperoksit dismutaz, katalaz, GSH-Px, Glutasyon redüktaz (GSH R), Glutasyon-S-transferaz

2. Enzim olmayanlar: Melatonin, seruloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutasyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin (107,108).

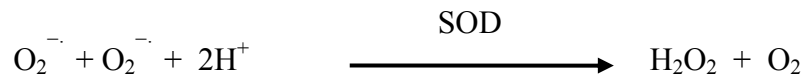
B) Ekzojen antioksidanlar:

1. Vitamin ekzojen antioksidanlar: α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat).

2. İlaç olarak kullanılan ekzojen antioksidanlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar, demir redoks döngüsü inhibitörleri, demir şelatörleri, sitokinler, barbitüratlar, nötrofil adezyon inhibitörleri (107,108)

2.4.3.1. Süperoksit Dismutaz

SOD, süperoksit radikalinin H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.

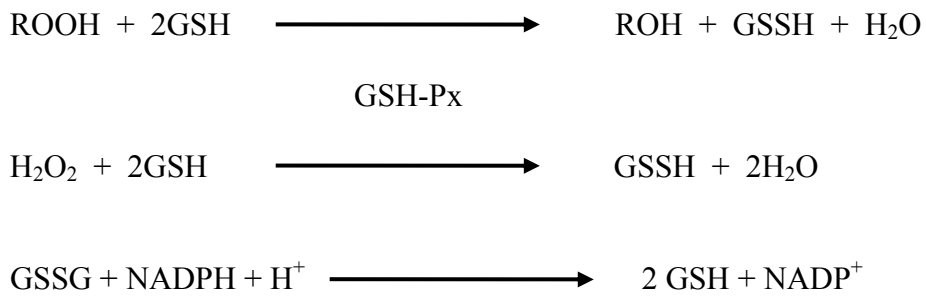


İnsan hücrelerinde özellikle sitozolde bulunan bakır ve çinko iyonu içeren SOD ile manganez iyonu içeren mitokondrial SOD olmak üzere SOD'un iki izoenzimi bulunur (109).

Süperoksit radikallerinin dismutasyonu sonucu ile ya da direk olarak oluşan hidrojen peroksit ise GSH-Px ve katalaz enzimleri tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir (109).

2.4.3.2. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px, fonksiyonel olarak önemli selenoprotein grubundandır (110). En fazla karaciğer ve eritrositler olmak üzere tüm dokularda aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Hücre içinde ise sitozol ve mitokondride en yoğun olarak bulunmaktadır (106). GSH-Px, hidroperoksitlerin (ROOH) ve H_2O_2 'nin indirgenmesi reaksiyonunda görev alan bir enzimdir (111). Se-bağımlı ve Se-bağımsız iki farklı tipi vardır. Se-bağımlı tipi H_2O_2 ve ROOH'leri, Se-bağımsız tipi sadece ROOH'leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından H_2O_2 ve ROOH indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon ise glutasyon redüktaz (GSH R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir. Bu reaksiyon pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'a bağımlıdır (106,108,112).



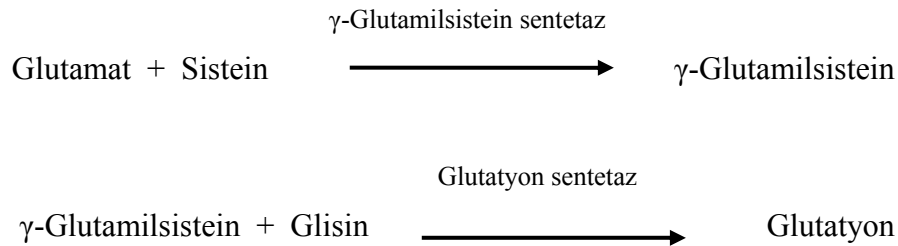
GSH-Px'in 5 izoenzimi tanımlanmıştır. GSH-Px1; özellikle eritrositler, böbrek ve karaciğer olmak üzere tüm hücrelerden eksprese edilir. Yağ asidi hidroperoksidlerini ve hidrojen peroksitleri metabolize eder. GSH-Px2 lipid peroksidazların toksisitesinden korumada önemli bir rol oynar ve gastrointestinal sistemde bulunur. GSH-Px3, ekstrasellüler yerleşimlidir ve gastrointestinal sistem ve böbrekte bulunur. GSH-Px4 veya fosfolipid hidroperoksid glutasyon peroksidaz hem

sitozol hem de membranda bulunur. Fosfolipid hidroperoksidleri, yağ asidi hidroperoksidleri ve kolesterol hidroperoksidleri direk olarak indirger. Renal epitelyal hücreler ve testiste en fazla bulunur. En son tanımlanmış olan GSH-Px5 ise ağız epididimisinde bulunur ve ilginç olarak Se'den bağımsızdır (110-113)

GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. E vitaminin yetersizliği durumlarında membranları oksidatif strese karşı GSH-Px korumaktadır. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (108). GSH-Px ayrıca prostaglandin biyosentezinde rol alır ve prostasiklin oluşumunda düzenleme yapmaktadır (114). GSH-Px yetersizliği Se eksikliği sonucu olabilir, çünkü Se bu enzimin bir integral parçasıdır (93).

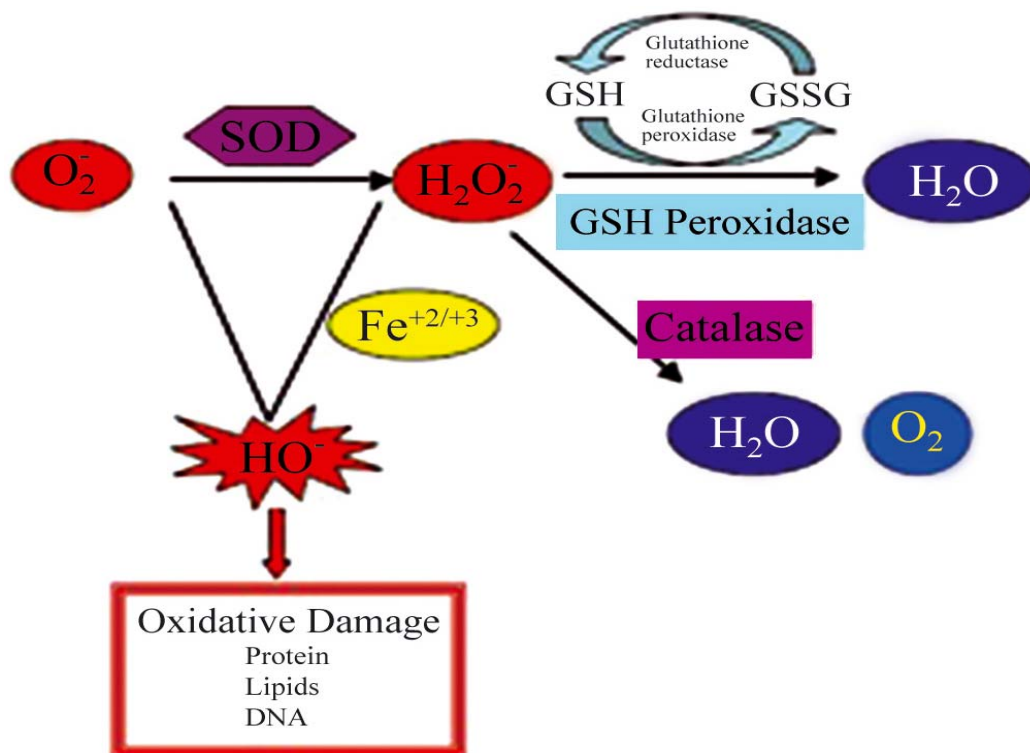
2.4.3.3. Glutasyon

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden sentezlenen düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Sentezde γ -glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz enzimleri katalizördür (112). Karaciğer başta olmak üzere birçok dokuda sentezlenir.



Glutasyon, biyolojik olarak iki önemli yapıyı (tiyol grubu ve γ -glutamin bağı) yapısında bulundurur. Yapısındaki sisteinin tiyol grubundan ve yüksek konsantrasyonundan dolayı hücre içinde önemli bir antioksidan olan GSH'ın %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunur (115). Serbest radikallerin temizlenmesinde GSH-Px enziminin katalizlediği tepkimeyle GSH'ın okside formu olan GSSG oluşur. GSSG hücreler için oldukça toksiktir ve hızlıca GSH R enziminin katalizlediği tepkimeyle tekrar GSH'a indirgenir ve böylece hücrede GSH/GSSG

oranı sabit tutulmaya çalışılır (116). GSH/GSSG oranı, iyi bir oksidatif stres göstergesidir (117,118). Glutasyonun pek çok metabolik görevi vardır. GSH-Px, GSH R ve GSH transferaz gibi enzimlerin kofaktörüdür. Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Vitamin C ve E gibi önemli antioksidanları yeniden oluşturup aktif formlarını destekler. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır (107,119).



Şekil 5. Serbest radikaller ve enzimatik detoksifikasyonu (120).

2.5. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

Kalsiyum iyonu damar düz kasının kasılması / gevşemesi, hücre bölünmesi, hücre motilite, hormon sekresyonu, metabolizma, sinir sisteminin işleyişi, protein döngüsü, gen ekspresyonu, apoptozis gibi birçok fizyolojik olayı kontrol eden bir iyondur (121). Bu özelliği ile birçok fonksiyonu kontrol etmesi hücre içerisindeki kalsiyumun düzenli olarak ayarlanmasına bağlı olmaktadır. Normal nöronal

fonksiyonlar için önemli rol oynar. (17,29). Plastisite ve sinaptik transmisyon gibi önemli nöronal olayları düzenler (18).

Yaşlanma, Alzheimer, Parkinson ve Huntington Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda Ca^{+2} homeostazisindeki bozukluğa bağlı kalsiyum artışı sonucu nöronal kayıp tespit edilmiştir. Bütün bu kronik patolojilerde mitokondrial ve endoplazmik retikulum disfonksiyonu, glutamat eksitotoksitesisi sonucu kalsiyumun nöronlar içerisine girmesiyle nöronal hasar görülmektedir. Epilepsi, şizofreni, amyotrofik lateral skleroz gibi multifaktöriyel hastalık grubunda da benzer durumlar görülür. Yine HIV enfeksiyonu veya travmatik beyin hasarı ve strok gibi ani olaylarda Ca^{+2} disregülasyonu hızlı nöronal ölüme yol açabilir (18).

Intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$), hem hücre dışı ortamda, hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşük seviyededir. Bu nedenle Ca^{+2} hücre içinde sinyal molekülü görevi yapabilir ve bu özelliğinden dolayı hücre için bir ikincil habercidir. Normal nöronal $[Ca^{+2}]_i$ yaklaşık olarak 100 nM iken, bu konsantrasyon serbest ekstrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunun 1/10.000'inden daha azdır. Hem hücre içi ile dışı arasında, hem de endoplazmik retikulum ile sitoplazma arasında, çok yüksek bir Ca^{+2} derişim farkı vardır (29).

Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişini sağlayan kanal tipleri şunlardır:

1-Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları (VBKK): Membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon, kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir (18). Farklı hücre tiplerinde bulunan bu kanalların temel işlevi, hücre yüzeyindeki elektrik sinyalleri, hücre içindeki fizyolojik olaylarla ilişkilendirmektir (122). VBKK' nin birçok moleküler tipi farklı nöronal fonksiyonları başlatır. Yapılan çalışmalar, L-tipi kanalların nöronal eksitabilite ve gen ekspresyonunu düzenlediğini, P/Q ve N-tipi kanalların nörotransmitter salınımını başlattığını, T-tipi kanalların ise nöronal ritmik burst ateşlemelerini desteklediğini göstermiştir (123).

2-Ligand Bağımlı Kalsiyum Kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara NMDA reseptörleri örnek verilebilir (124,125).

3-Depo Boşalması ile Aktive Olan Kalsiyum Kanalları: Hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar (125).

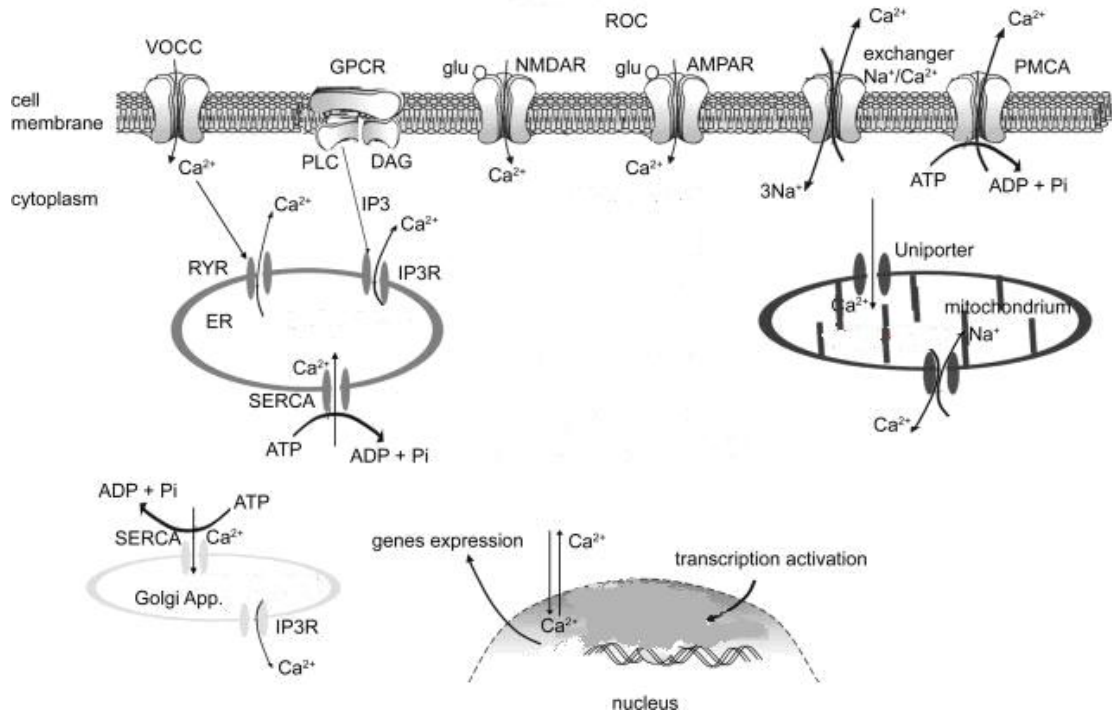
Hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} çıkışını sağlayan yapılar şunlardır:

Ryanodin ve inositol 1,4,5-trifosfat Reseptörleri: Endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımı inositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) reseptörü ve ryanodin reseptörü üzerinden olur (18). Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistlerin bağlanması ile G proteininin uyardığı fosfolipaz C aktive olur. Fosfolipaz C'nin aktive olması, bünyesinde barındırdığı alfa, beta ve gama alt birimlerini aktive eder. Aktive olmuş fosfolipaz C, membran fosfolipidlerinde fosfoinositoldifosfatı (PIP_2) aktive eder. PIP_2 'ın aktive olması diaçilgliserol (DAG) ve IP_3 aktivasyonu ile neticelenir. DAG hücre zarında protein kinaz C formunda kalır, IP_3 de kalsiyum depolarından sitozole kalsiyum akışına neden olmak için sarkoendoplazmik retikuluma gider ve IP_3 reseptörü ile hücre içi kalsiyum salınımı sağlanmış olur (18,29,125). Ryanodin reseptörleri ise doğrudan voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} tarafından aktive edilir (18).

Hücre içi depolara Ca^{+2} un alınması, başka bir deyişle sitozolden Ca^{+2} un uzaklaştırılması üç yolla gerçekleşir: (18,29).

1. Endoplazmik retikulum membranındaki Ca-ATPaz enzimi
2. Hücre membranındaki Ca-ATPaz
3. Na^+ / Ca^{+2} değişimi ile olmaktadır.

Nöronal Ca^{+2} homeostazı şekil 6'da gösterilmektedir.



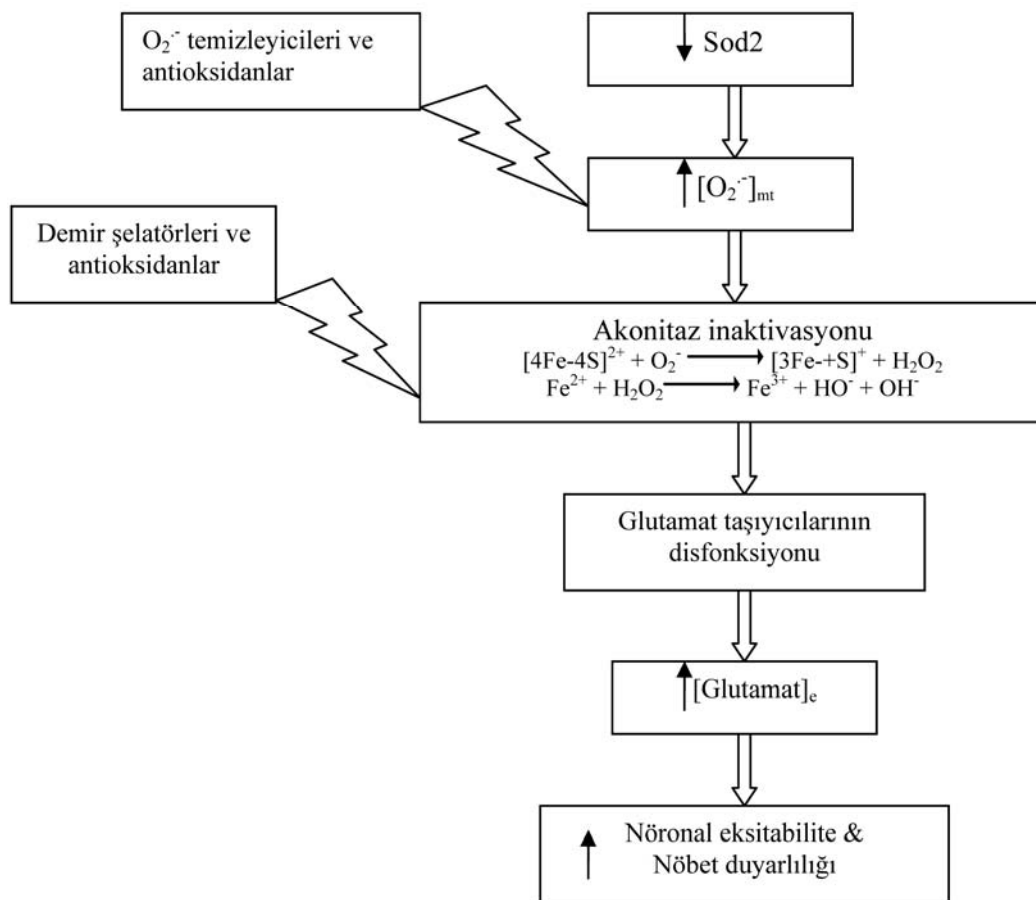
Şekil 6. Nöronal Ca⁺² homeostazı (18).

VOCC: Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları, ROC: Reseptör bağımlı kanallar, NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü, AMPAR: α-amino-3-hidroksi-5-metilisoksozol-4-propionik asit reseptörü, GPCR: G proteini kenetli reseptör, PLC: Fosfolipaz C, DAG: Diaçilgliserol, RYR: Ryanodin reseptörü, IP3R: İnositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü, ER: Endoplazmik retikulum, SERCA: Sarko-endoplazmik retikulum Ca⁺² ATPaz, PMCA: Plazma membran Ca⁺² ATPaz.

2.6. Oksidatif Stres, Kalsiyum Sinyali ve Epilepsi

Oksidatif stres ve mitokondrial disfonksiyon, epilepsi dahil olmak üzere bir çok nörolojik hastalığın patofizyolojinde yer almaktadır (2-4,126,127). Beyin, oksidatif metabolik aktivite hızının yüksek, antioksidan savunma kapasitesinin düşük ve poliansatüre yağ asit miktarının fazla olmasından dolayı oksidatif hasara karşı çok duyarlıdır (128). Beyinin oksidatif hasara karşı artmış duyarlılığı, nöbet patofizyolojisinde oksidatif stresin rolünün anlaşılmasında aydınlatıcıdır (4). Nöbetin tetiklediği nöronal ölümün etyolojisi birçok faktörü içermektedir. Bunlar arasında genetik faktörler, intrasellüler elektrolit metabolizma bozukluğuna yol açan artmış glutamaterjik hücre toksisitesi, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, büyüme faktörü azalması ve artmış sitokin konsantrasyonu yer alır (19).

Penisilin, kainat, pilokarpin ve pentilentetrazol ile epileptik nöbet oluşturularak yapılmış birçok çalışma, oksidatif stresin epilepsi patofizyolojisine dahil edilebileceğini göstermiştir (19). Tekrarlayan nöbetler sonucu hücrel makromoleküllerde artmış oksidasyonun görülmesi ve SOD mimetikler, C vitamini, melatonin gibi antioksidan içerikli bileşiklerin nöbetin tetiklediği patolojiyi engellemesi, nöronal ölümün etyolojisinde serbest radikallerin genel rolünü desteklemektedir (129). SOD mutant fareleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, SOD eksikliğine bağlı olarak mitokondrial O_2^- artmış ve buna bağlı olarak mitokondriyal akonitaz enzim aktivitesi çok düşük bulunmuştur. Akonitaz enzim inaktivasyonu H_2O_2 ve OH^- oluşumuna neden olur. Kronik serbest radikal üretimi redoksa duyarlı glutamat taşıyıcılarının disfonksiyonuna yol açıp, ekstrasellüler glutamatın artışı ile sonuçlanır. Artmış ekstrasellüler glutamat, nöronal eksitabiliteye ve epileptik nöbet oluşumuna yol açar. Antioksidan tedavi O_2^- , H_2O_2 ve OH^- ni azaltarak epileptik nöbet oluşumunu önleyebilir (2). Bu durum şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. SOD mutasyonu sonucu epileptik nöbet oluşumu (2). $[O_2^-]_{mt}$: süperoksit radikali mutasyonu, $[Glutamat]_e$: ekstrasellüler glutamat.

Ca^{+2} homeostazisindeki değişikliklerin epileptik aktivite oluşumunda ve devamında önemli rolü olduğu yönünde birçok yayın bulunmaktadır (18,29). Hipokampal nöronal kültürde oluşturulan kazanılmış epilepsi modelinde kalsiyum kalmodülin protein kinaz 2 aktivitesinin azalmasıyla Ca^{+2} homeostazisindeki değişiklere bağlı spontan tekrarlayan epileptiform değarjlar oluştuğu görülmüştür (130). İdiyopatik jeneralize epilepsilerde de VBKK'nın subunitlerinde defektlerin (özellikle P/Q tip ve T tip) nöbet genetiğine katkıda bulunduğu ve ağ bağlantı aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (18). Yapılan çalışmalarda, epileptik nöronlarda IP_3 reseptörü ile ilişkili Ca^{+2} salınımının artmış olduğu, ryanodin reseptörü ile ilişkili Ca^{+2} salınımında ise değişiklik olmadığı bulunmuştur (131).

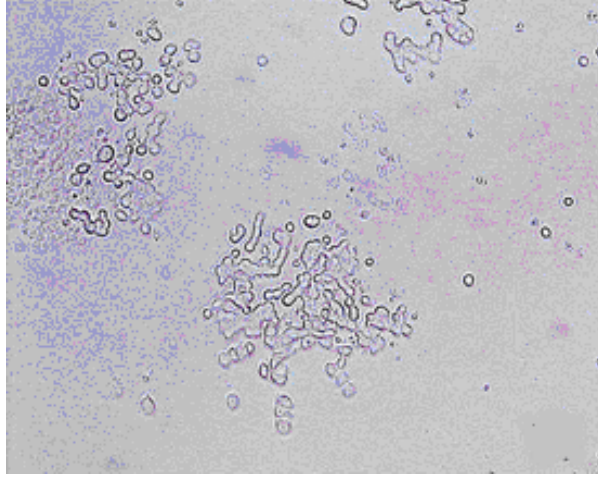
Serbest radikal üretimi glutamin sentetaz enzimini direk olarak uyarabilir, sonuçta eksitatör nörotransmitter olan glutamatın anormal artışı sonucu epileptik aktiviteye neden olabilir. Epileptik hayvanlarda oksijenin indüklediği nöbetler, reaktif oksijen türlerinin glutamat dekarboksilaz enzimini inhibe etmesi sonucu beyin GABA konsantrasyonunun azalması ile ilişkilidir. Nöbet sırasında NMDA ve VBKK'nın aktivasyonu sonucu ekstrasellüler Ca^{+2} azalır, intrasellüler Ca^{+2} artar. Sitoldeki bu kalsiyum iyon artışı, mitokondride porların açılması ve depolarizasyon yolları ile serbest radikallerin üretimini daha da arttırmaktadır. Aşırı serbest radikal üretimi başta VBKK olmak üzere birçok kanalı uyararak sitozole kalsiyum akışını daha da uyarmaktadır. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir. Mitokondrial membranların devamlı depolarizasyonu ve artmış reaktif oksijen türleri ATP ve NADH üretimini bozabilir. NADPH artışı tek nöbet benzeri olaylarla ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, yapılan *in vivo* alışmalarda uzamış status epileptikus sonrasında ATP üretiminde yetersizlik saptanmıştır (19).

2.7. PC12 Hücreleri

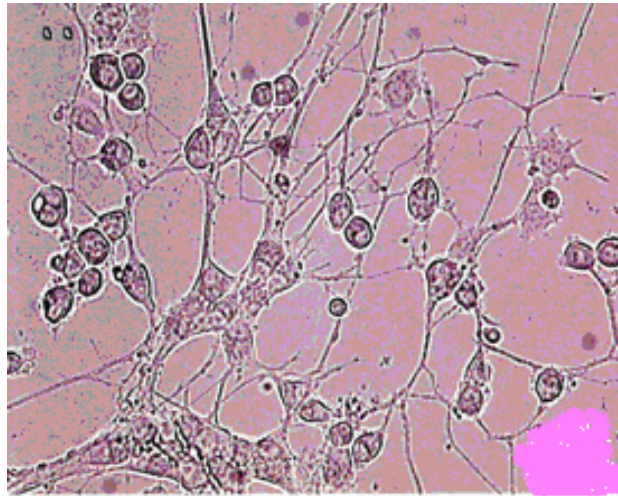
Rat feokromasitoma hücreleri olan PC12 hücreleri ilk kez 1976'da Grene ve Tischler tarafından elde edilmiştir. Adrenal bezden köken alan hücre klonudur. Hücre morfolojisi poligonal görünümüdür. PC12 hücreleri adheran özellikte, kültür kabının yüzeyine yapışarak yaşayan ve küçük kümeler halinde çoğalan hücrelerdir

(132). Şekil 8’de PC12 hücrelerinin ve şekil 9’da PC12 hücrelerine NGF ilave edilmesiyle oluşan faz kontrast mikroskopik görünümü gösterilmektedir (133).

PC12 hücrelerine kültür ortamında nöronal büyüme faktörü (NGF) ilave edilmesiyle nöronal filizlenme, elektriksel eksitabilite ve sinaptik veziküller oluşur (134). NGF’ye yanıt olarak katekolamin (dopamin, noradrenalin) sentezler ve çok hızlı nöroblast/nöron fenotipine dönüşür. Nöronun tipik özelliklerini gösterir (20,21). Bu yüzden nöronların hücre biyolojisi ile ilgili çalışmalar için iyi tanımlanmış bir modeldir. Proliferasyon, diferansiyasyon, hücre canlılığı ve apoptozis gibi farklı hücre olayları, nöronal tamir, nöroprotektivite ve nörotoksisiteyi içeren mekanizmaları araştırmada sıkça kullanılır (20,22,134).



Şekil 8. PC12 hücrelerinin faz kontrast mikroskopik görünümü (133).



Şekil 9. PC12 hücrelerine nöronal büyüme faktörü ilave edilmesiyle oluşan faz kontrast mikroskopik görünüm (133).

2.8. Hücre Canlılığının MTT Analiziyle Saptanması

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] analizi ilk olarak Mosmann tarafından kullanıma girmiştir (135). MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrojenaz aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (136,137). Reaksiyon ürünü uygun karışımda çözüldükten sonra spektrofotometrik yöntemle ölçülür (138). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır (139). Hücre canlılığı ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması, radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmaması avantaj olarak kabul edilir (140,141).

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ve Biyofizik Anabilim Dalları tarafından Nörolojik Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde (NÖROBAM) gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1950-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Materyaller

PC12 hücreleri DSMZ hücre serileri bankasından (Almanya) alındı. Biyofizik laboratuvarında Poly-D-Lysine kaplanmış hücre kültürü flasklarında, RPMI 1640 besi yeri ortamında üretildiler. Fötal sığır serumu, at serumu, Se ve diğer kimyasallar Sigma firmasından Fagus Firması (İstanbul) aracılığı ile Amerika Birleşik Devletleri ve Almanya'dan satın alındı. TPM tablet formda Janssen Cilag ilaç firmasından temin edildi.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2. Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
9. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
10. Floresan spektrofotometre (Carry Eclipse Marka, Varian Firması, Avustralya)
11. CO₂ inkubator (Shel Lab-Biolab Lab, Fransa)

12. Laminar flow kabini (Bilser BLF2000, İstanbul)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Glisin, Merck (Almanya)
3. Sodium Chloride, Merck (Almanya)
4. Tween 20, Merck (Almanya)
5. Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
6. EDTA, Merck (Almanya)
7. EGTA, Merck (Almanya)
8. Leupeptin, Sigma (Almanya)
9. Triton X-100, Sigma (Almanya)
10. Metanol, Merck (Almanya)
11. Hydrochloric Acid, Merck (Almanya)
12. Histopaque REF-11191 (Amerika Birleşik Devletleri)
13. Bradford Kimyasalı Bio-Rad 500-0006 (Almanya)
14. Collagenase type II- A7906, 1 gram (Almanya)
15. Collegenase-Type4 Worthington 4188/47M9961, 100 mg (Almanya)
16. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj, 35 ml, Sorvall (Ankara)
17. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj için, 2 ml, Sorvall (Ankara)
18. PC12 hücreleri, DSMZ-Germany. Kültür (37 °C) şeklinde
19. Nerve growth factor, Sigma, N0513, 1 mg (Amerika Birleşik Devletleri)
20. Poly-D-Lysine, Sigma (Almanya)
21. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma (Almanya)
22. DMSO (Dimethyl sulfoxide), Sigma (Almanya)

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Tedavi

3.2.1.1. PC12 Hücre Kültürü

PC12 hücreleri rat böbrek üstü bezi hücrelerinden elde edilmektedir. Bu hücrelere, kültür ortamında NGF ilave edilmesiyle, embriyolojik dönemdeki özelliklerinden dolayı sinir hücresi özelliği göstermektedirler. PC12 hücreleri hem nörolojik hem de psikiyatrik hastalıklarla ilgili çalışmalarda sinir hücresi modeli olarak kullanılmaktadırlar (20,22,134). Çalışmamızda kullanılan PC12 hücreleri DSMZ hücre serileri bankasından (Almanya) alındı. Deneylerde bu hücre hattının 2–9 arasındaki pasajları kullanıldı. Deneylerde kullanılan 25 ve 75 cm²'lik kültür flaskları, hücrelerin ekiminden önce tutunmayı arttırmak amacıyla Poly-D-Lysine ile kaplandı. Poly-D-Lysine steril distile su ile çözüldü ve kültür kaplarına 10 µg/ml konsantrasyonda eklenerek yayıldı. Bir saatlik bir inkübasyon süresinin ardından PC12 hücreleri kültür kaplarına 1x10⁵ hücre/cm² yoğunluğunda ekildi. Kültür ortamı olarak % 10 oranında ısıyla inaktive edilmiş at serumu, % 5 oranında ısıyla inaktive edilmiş sığır serumu, 100 IU/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanıldı. Ekim sonrası kültürler % 5 karbondioksitli nemli hava içeren 37 °C sıcaklıkta inkübatöre konuldu.

Hücreler her 2–3 günde bir taze mediumla beslendi. Hücrelerin % 80'i birleşmeye başladığı zaman, steril pipetler aracılığı ile taze medium konularak, flask zemininden hücreler tyripsin-EDTA ile ayrılarak pasajlandı. Pasajlanan PC12 hücreleri, her flaskda hücre dansitesi 2x 10⁴ olacak şekilde Poly-D-Lysine kaplı 25 ve 75 cm²'lik kültür flasklarına aynı dansitede ekildi. 48 saat sonra hücreler gruplara ayrıldı;

1. GRUP (Kontrol grubu): Sadece RPMI 1640' da 24 saat bırakıldı.
2. GRUP (TPM grubu): Bu gruptaki hücreler 10 µM TPM ile 5 saat boyunca inkübe edildi.
3. GRUP (Se grubu): Bu gruptaki hücreler 500 nM sodyum selenit ile 10 saat boyunca inkübe edildi.

4. GRUP (H_2O_2 grubu): Bu gruptaki hücreler $100 \mu M H_2O_2$ ile 10 saat boyunca inkübe edildi.

5. GRUP (TPM + H_2O_2 grubu): Bu gruptaki hücreler ilk önce $10 \mu M$ TPM ile 5 saat boyunca, daha sonra $100 \mu M H_2O_2$ ile 10 saat boyunca inkübe edildi.

6. GRUP (Se + H_2O_2 grubu): Bu gruptaki hücreler ilk önce $500 nM$ sodyum selenit ile 10 saat boyunca, daha sonra $100 \mu M H_2O_2$ ile 10 saat boyunca inkübe edildi.

7. GRUP (Se + TPM grubu): Bu gruptaki hücreler ilk 5 saat $500 nM$ sodyum selenit ile daha sonraki 5 saat ise $10 \mu M$ TPM + $500 nM$ sodyum selenit ile inkübe edildi.

8. GRUP (Se + TPM + H_2O_2 grubu): Bu gruptaki hücreler ilk 5 saat $500 nM$ sodyum selenit ile daha sonraki 5 saat ise $10 \mu M$ TPM + $500 nM$ sodyum selenit ile inkübe edildi. Ardından $100 \mu M H_2O_2$ 'e 10 saat süre ile maruz bırakıldı.

3.2.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü

3.2.2.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (142) bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

1- %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu

2- Tris tamponu ($0,4M$ pH:8,9): $48,46$ gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: $0,1$ ml hücre homojenatı $0,4$ ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. $0,1$ ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine $0,9$ ml distile su, $2,0$ ml Tris tamponu ve $0,1$ ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (143) tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan Solusyonlar:

1- Tris (1) HCl tampon solusyonu (50 mM) pH:7,6

2- GSH solusyonu

3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solusyonu

4- %10 TCA solusyonu

5- Tris (2) tampon 0,4 M pH: 8,9

6- DTNB solusyonu

Tablo 1. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi.		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı.		
Üzerine Tris tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

3.2.3. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için PC12 hücreleri 37 °C de 45 dakika boyunca 4µM Fura-2 AM floresan boyası ile boyandı (144). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na⁺-HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140;

KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometre (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm de floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi (145) ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (146).

3.2.4. Lipid Peroksidasyon Analizi

PC12 hücrelerinde lipid peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (145) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm PC12 hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

3.2.5. MTT Analizi

Her bir eppendorf tüpüne 10⁶ hücre olacak şekilde hücreler konuldu. Her bir eppendorfa 15 mikrolitre MTT kimyasali ilave edildi. MTT kimyasali ilavesinden sonra bütün eppendorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37°C de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün eppendorflar 500 g de 10 dakika boyunca santrifuj edildi. Santrifuj sonrası supernatant atıldı. Her bir eppendorfa 400'er mikrolitre DMSO ilave edildi. Pellet DMSO içerisinde resuspense edildi, sonra her bir küvete 250 mikrolitre bu örnekten konuldu. Spektrofotometrede 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki

dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı. (Abs490 nm –Abs650 nm: x) (145).

3.3. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. PC12 hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 9.05 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

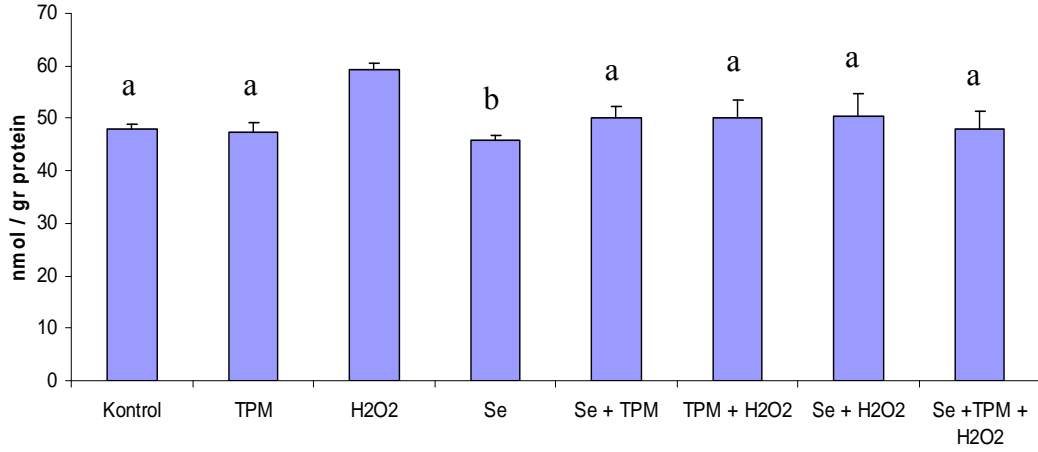
4.1. PC12 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu Düzeyleri

Lipid peroksidasyon sonuçları tablo 2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, lipid peroksidasyon düzeylerinin H₂O₂ grubuna kıyasla, kontrol (p<0.05), TPM (p<0.05) ve Se+TPM (p<0.05) grubunda önemli düzeyde düşük olduğu bulundu. Se grubunda lipid peroksidasyon düzeyi H₂O₂ grubuna göre çok belirgin olarak düşük (p<0.01) saptandı. PC12 hücreleri H₂O₂ ile birlikte TPM ve Se ile inkübe edildiğinde, Se ve TPM’nin lipid peroksidasyonu üzerinde koruyucu etkisi gözlemlendi. Diğer bir ifade ile lipid peroksidasyon düzeyleri, H₂O₂ grubuna kıyasla, Se+H₂O₂ (p<0.05), TPM+H₂O₂ (p<0.05) ve Se+TPM+H₂O₂ (p<0.05) grubunda düşük bulundu. TPM+H₂O₂ ve Se+H₂O₂ grupları ile karşılaştırıldığında; Se+TPM+H₂O₂ grubunda lipid peroksidasyon düzeyinde azalma saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 2. Topiramamat ve selenyumun lipid peroksidasyonu, indirgenmiş glutatyon ve glutatyon peroksidaz düzeyleri üzerindeki etkileri (ortalama±Standart sapma ve n=8).

Gruplar	Lipid peroksidasyonu (nmol/gr protein)	GSH (nmol/gr protein)	GSH-Px (IU/gr protein)
Kontrol	48.07 ± 0.79 ^a	1.29 ± 0.12 ^a	3.30 ± 0.70
TPM	47.30 ± 2.04 ^a	1.25 ± 0.15 ^a	3.35 ± 0.13
H ₂ O ₂	59.20 ± 1.47	0.95 ± 0.15	3.07 ± 0.14
Se	45.80 ± 1.11 ^b	1.24 ± 0.15 ^a	3.60 ± 0.16 ^b
Se+TPM	50.00 ± 2.40 ^a	1.30 ± 0.19 ^a	3.71 ± 0.18 ^b
TPM+H ₂ O ₂	50.10 ± 3.44 ^a	1.25 ± 0.21 ^a	3.39 ± 0.13
Se+H ₂ O ₂	50.50 ± 4.25 ^a	1.26 ± 0.18 ^a	3.38 ± 0.18
Se+TPM+H ₂ O ₂	48.01 ± 3.34 ^a	1.23 ± 0.16 ^a	3.28 ± 0.19

^ap<0.05 ve ^bp<0.01 H₂O₂ grubuna kıyasla.

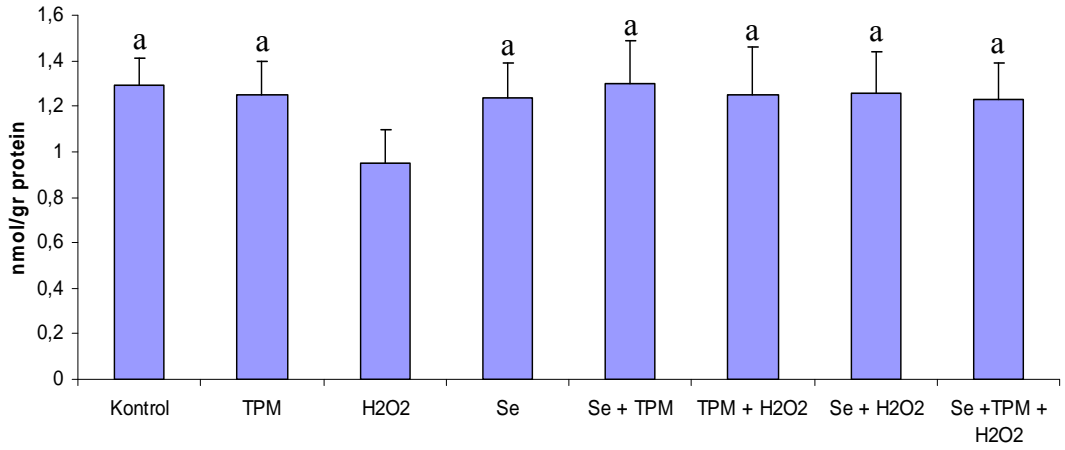


^a $p < 0.05$ ve ^b $p < 0.01$ H₂O₂ grubuna kıyasla.

Grafik 1. PC12 hücre gruplarında lipid peroksidasyon düzeyleri (Ortalama±Standart sapma ve n=8).

4.2. PC12 Hücrelerinde GSH ve GSH-Px Düzeyleri

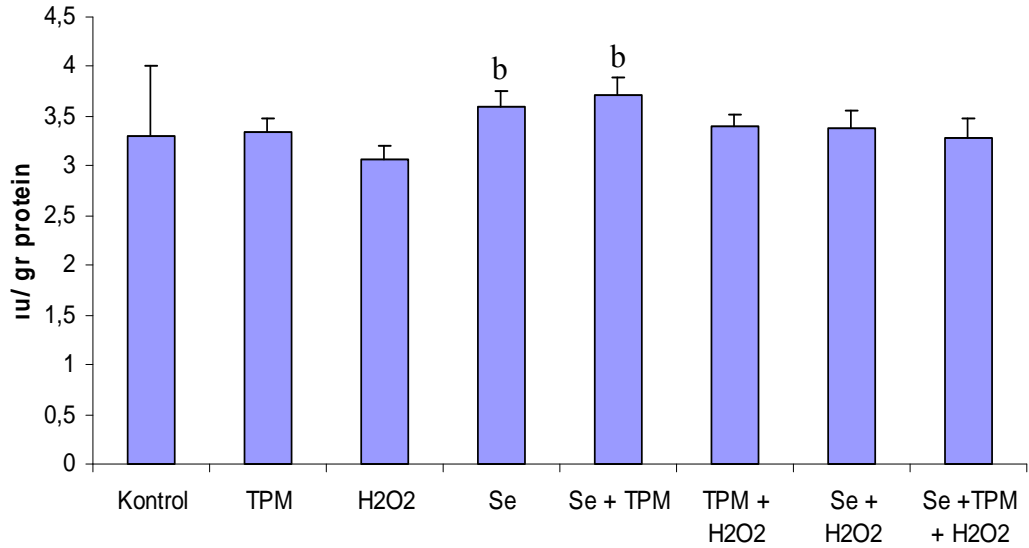
GSH ve GSH-Px sonuçları Tablo 2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, GSH düzeylerinin H₂O₂ grubuna kıyasla, kontrol ($p < 0.05$), TPM ($p < 0.05$), Se ($p < 0.05$) ve Se+TPM ($p < 0.05$) gruplarında önemli düzeyde yüksek olduğu bulundu. PC12 hücreleri H₂O₂ ile birlikte TPM ve Se ile inkübe edildiğinde, Se ve TPM’nin hem birlikte hem de ayrı ayrı verilmelerinde GSH düzeyleri üzerinde koruyucu etkisi gözlemlendi. Başka bir ifade ile H₂O₂ grubuna kıyasla, Se+H₂O₂ ($p < 0.05$), TPM+H₂O₂ ($p < 0.05$) ve Se+TPM+H₂O₂ ($p < 0.05$) gruplarında GSH düzeyleri yüksek bulundu. TPM ve Se grupları ile karşılaştırıldığında; TPM+Se grubunda GSH düzeyinde artış bulundu fakat bu oran istatistiksel olarak anlamlı değildi.



^a p < 0.05 H₂O₂ grubuna kıyasla.

Grafik 2. PC12 hücre gruplarında GSH düzeyleri (Ortalama±Standart sapma ve n=8).

Se (p<0.01) ve Se+TPM (p<0.01) gruplarında GSH-Px aktiviteleri H₂O₂ grubuna kıyasla belirgin düzeyde yüksek saptandı.

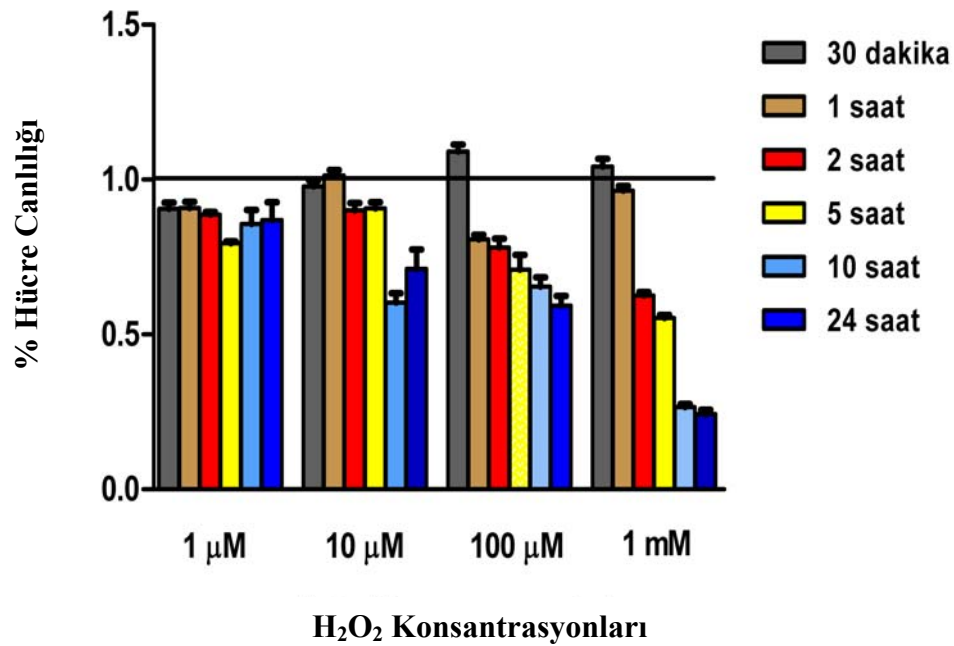


^bp < 0.01 H₂O₂ grubuna kıyasla.

Grafik 3. PC12 hücre gruplarında GSH-Px düzeyleri (Ortalama±Standart sapma ve n=8).

4.3. H₂O₂'nin Hücre Canlılığı Üzerine Toksik Dozunun Tayini

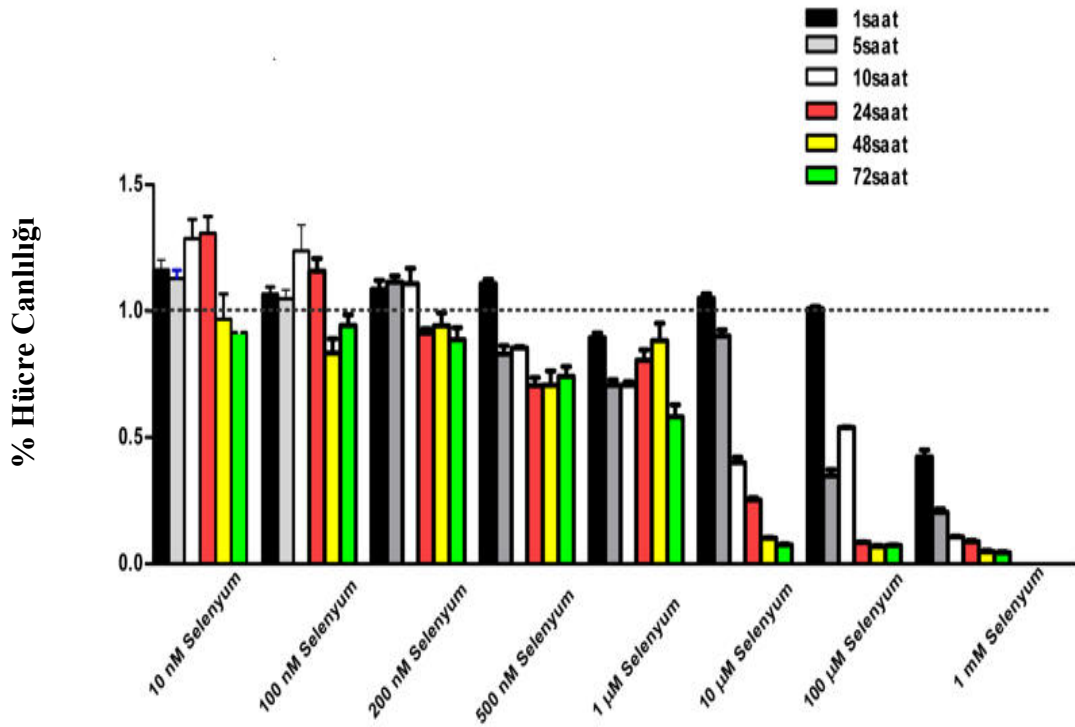
PC12 hücrelerinde H₂O₂'nin hücre canlılığı üzerine etkisi grafik 4'te gösterilmiştir. Hücreler artan konsantrasyonlarda (1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM) H₂O₂ ile 6 farklı zamanda (30 dk, 1, 2, 5, 10, 24 saat) inkübe edildi. H₂O₂'nin toksik etkisi, 100 µM dozda ve inkübasyondan 10 saat sonra başladı. H₂O₂'nin toksik dozu hücre kültür ortamında 100 µM'da 10 saat olarak belirlendi.



Grafik 4. PC12 hücrelerinde H₂O₂'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.4. Se'nin Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik ve Toksik Dozunun Tayini

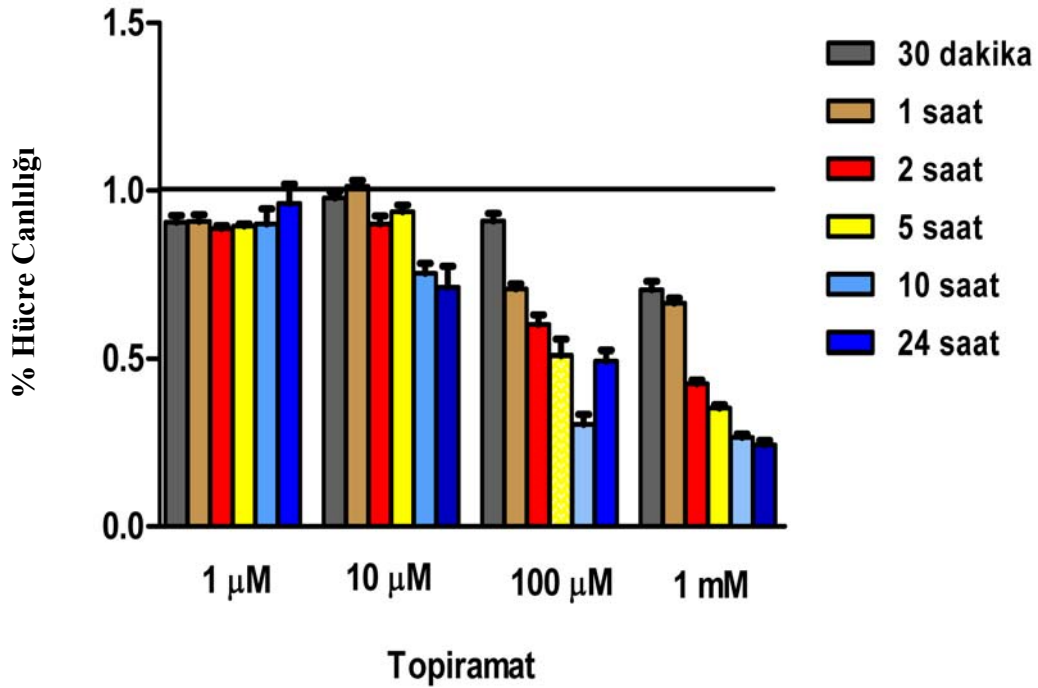
PC12 hücrelerinde Se'nin hücre canlılığı üzerine etkisi grafik 5'te gösterilmiştir. PC12 hücreleri, 8 farklı dozda (10 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM) Se ile 6 farklı zamanda (1, 5, 10, 24, 48 ve 72 saat) inkübe edilerek Se'nin terapötik ve toksik dozu bulundu. 500 nM dozunda ve 24 saatte hücre canlılığında %25 misli azalma tespit edildi. Se'nin toksik etkisinin 500 nM dozda ve 24 saatte başladığına karar verildi. Se'nin en yüksek terapötik dozu 500 nM da 10 saat olarak belirlendi.



Grafik 5. PC12 hücrelerinde Se'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.5. Topiramatin Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik ve Toksik Dozunun Tayini

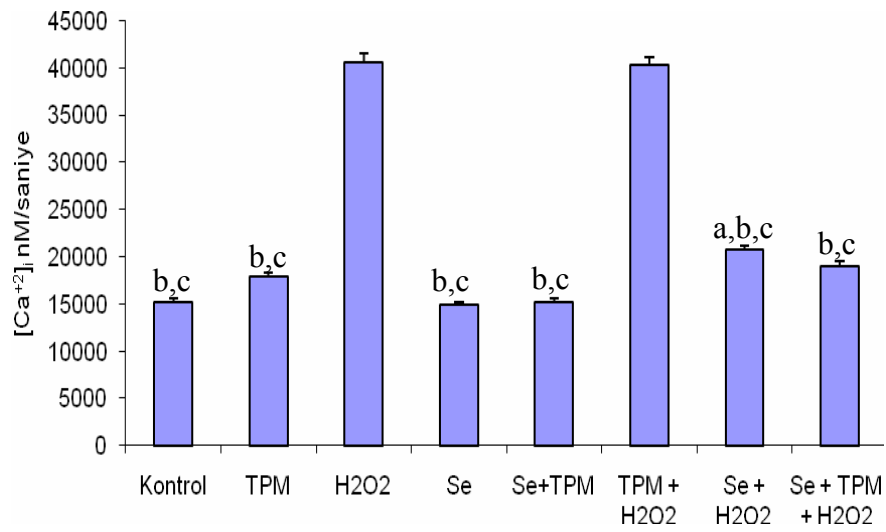
PC12 hücrelerinde TPM'nin hücre canlılığı üzerine etkisi grafik 6'da gösterilmiştir. PC12 hücreleri, 4 farklı dozda (1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM) TPM ile 6 farklı zamanda (30 dk, 1, 2, 5, 10, 24 saat) inkübe edilerek TPM'nin terapötik ve toksik dozu bulundu. 10 µM dozda ve 10 saatte hücre canlılığında %25 misli azalma tespit edildi. TPM'nin toksik etkisinin 10 µM dozda ve 10 saatte başladığı belirlendi. TPM'nin en yüksek terapötik etkisi ise 10 µM doz ve 5 saat olarak tespit edildi.



Grafik 6. PC12 hücrelerinde TPM'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.6. PC12 hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu $[Ca^{+2}]_i$ Salınımı Düzeyleri

PC12 hücre gruplarında oksidatif stresin (H_2O_2) neden olduğu sitozole kalsiyum iyonu $[Ca^{+2}]_i$ salınımı üzerindeki etkileri grafik 7'de gösterilmiştir. H_2O_2 grubunda; kontrol, Se, TPM, Se+TPM gruplarına göre sitozole Ca^{+2} salınımı belirgin düzeyde yüksek saptandı ($p < 0.001$). Kontrol, TPM, Se ve Se+TPM grupları arasında sitozole Ca^{+2} salınımında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Se+ H_2O_2 ve Se+TPM+ H_2O_2 grubunda, H_2O_2 grubuna göre sitozole Ca^{+2} salınımı belirgin düzeyde düşük saptandı ($p < 0.001$). TPM+ H_2O_2 grubunda; kontrol, Se, TPM, Se+TPM, Se+ H_2O_2 ve Se+TPM+ H_2O_2 gruplarına göre sitozole Ca^{+2} salınımı belirgin düzeyde yüksek saptandı ($p < 0.001$). TPM+ H_2O_2 grubu ile H_2O_2 grubu arasında sitozole Ca^{+2} salınımında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Se+ H_2O_2 grubunda; Se, Se+TPM ve kontrol grubuna göre sitozole Ca^{+2} salınımı daha yüksek saptandı ($p < 0.05$).



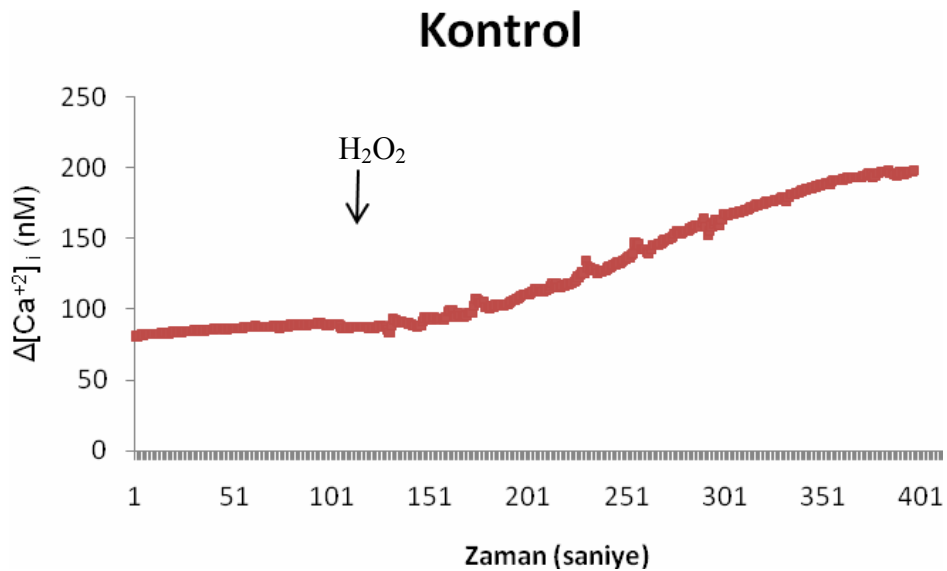
^a p < 0,05 Se, Se+TPM ve kontrol grubuna kıyasla

^b p < 0,001 H₂O₂ grubuna kıyasla

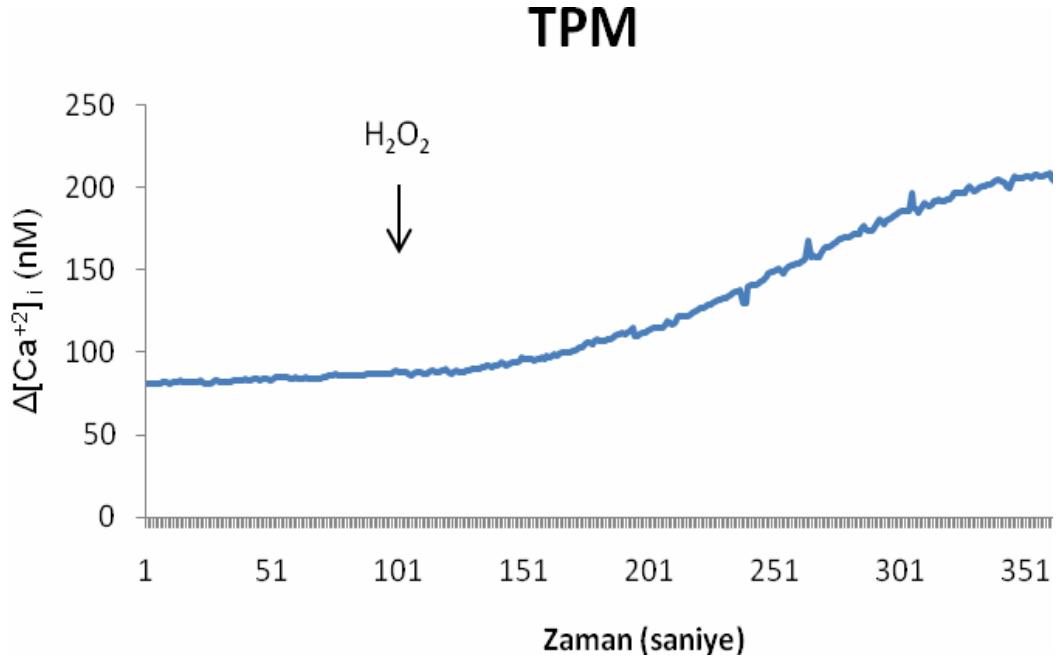
^c p < 0,001 TPM+H₂O₂ grubuna kıyasla

Grafik 7. PC12 hücre gruplarında oksidatif stresin (H₂O₂) neden olduğu sitozole Ca⁺² salınımı üzerindeki etkileri.

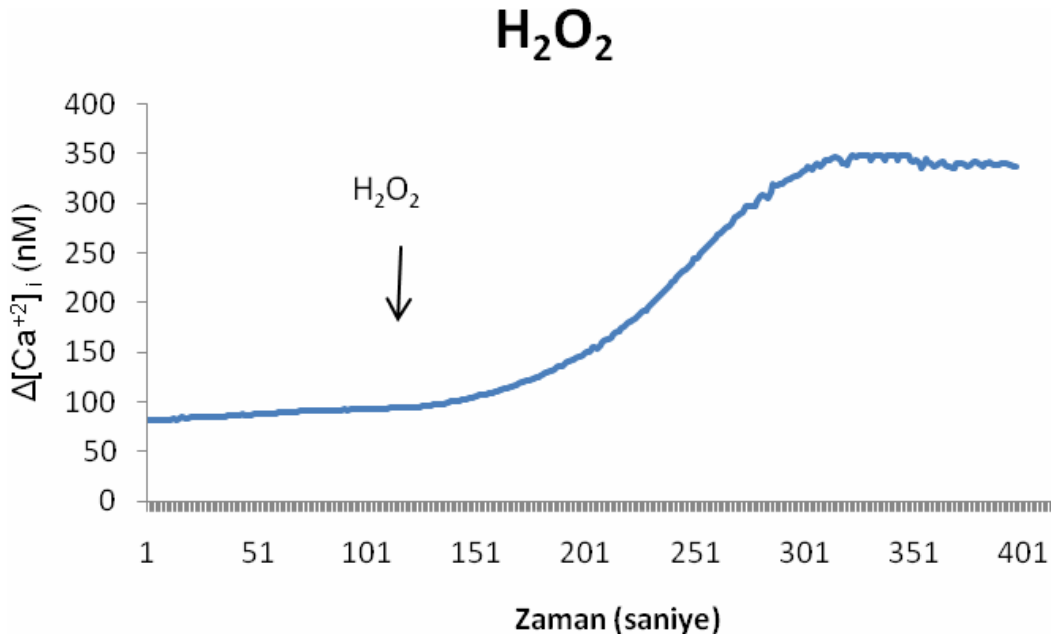
Sitozole Ca⁺² salınımının zaman akım grafikleri gruplara spesifik ve tüm gruplar birlikte olarak aşağıda gösterilmiştir.



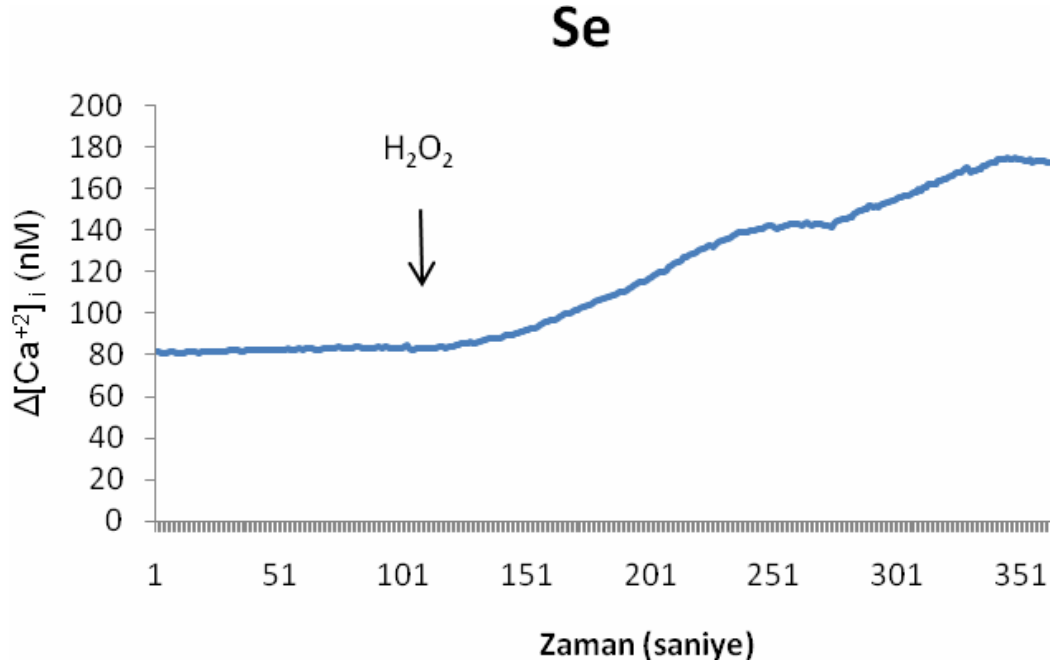
Grafik 8. Kontrol grubunda sitozole Ca⁺² salınımının zaman akım grafiği



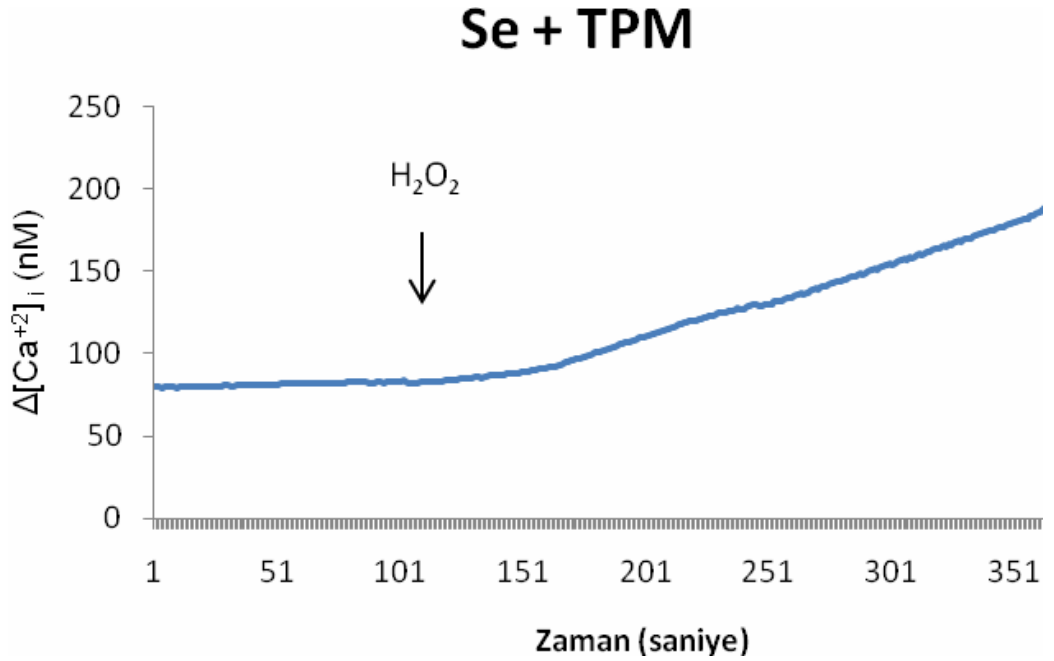
Grafik 9. TPM grubunda hücre sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği



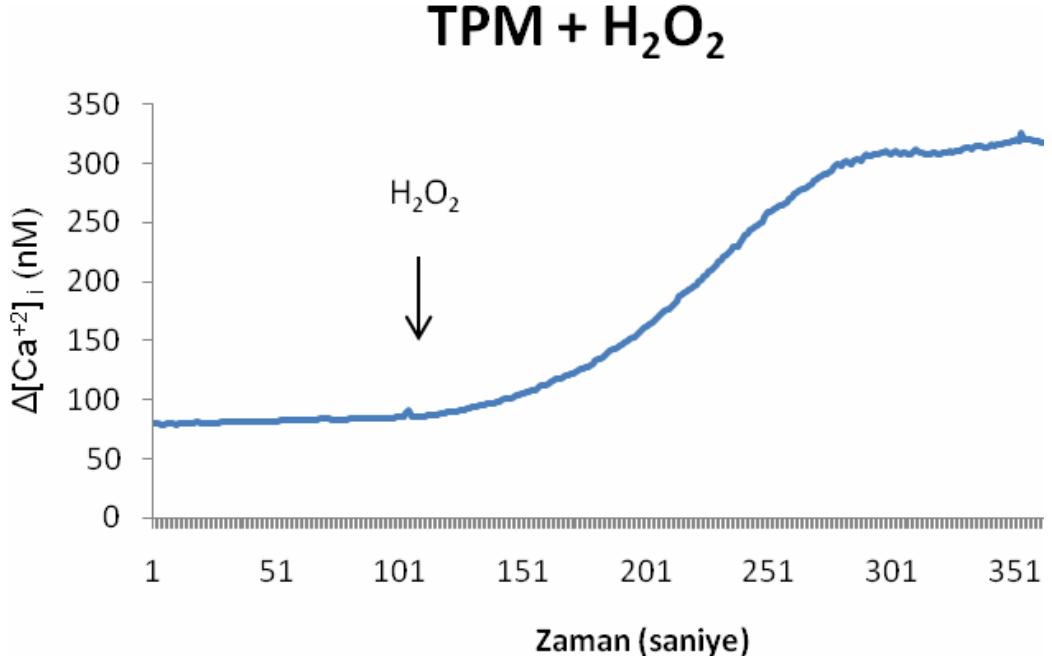
Grafik 10. H_2O_2 grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği



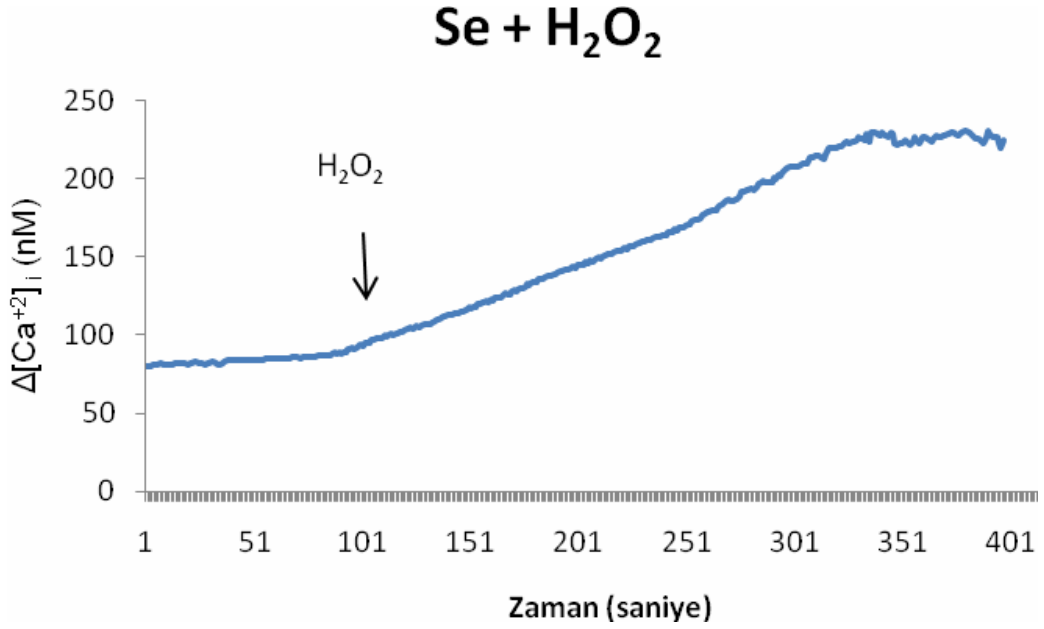
Grafik 11. Se grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği



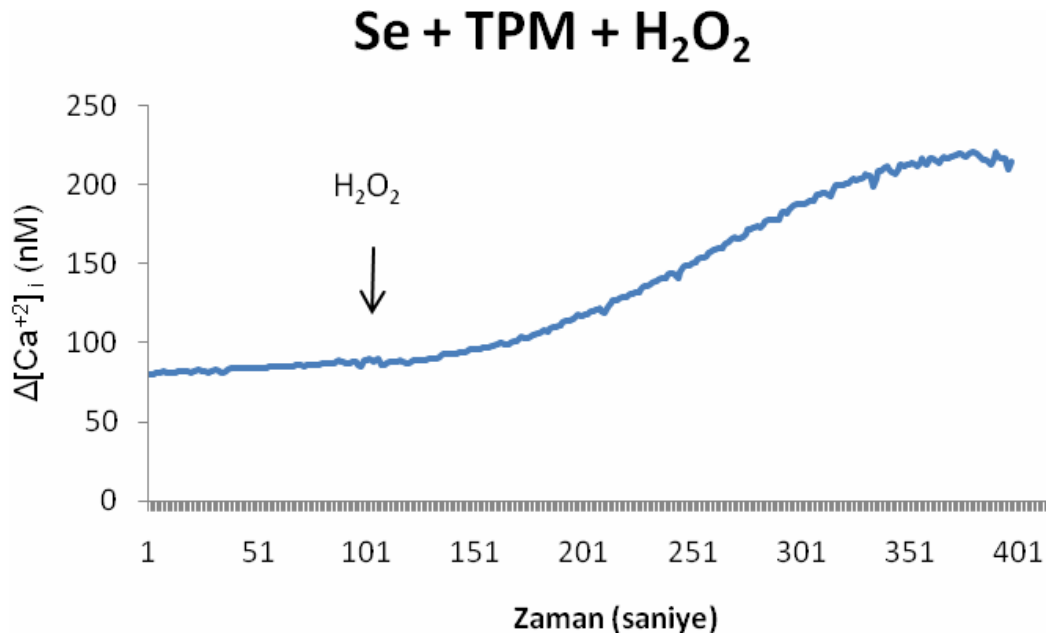
Grafik 12. Se+TPM grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği



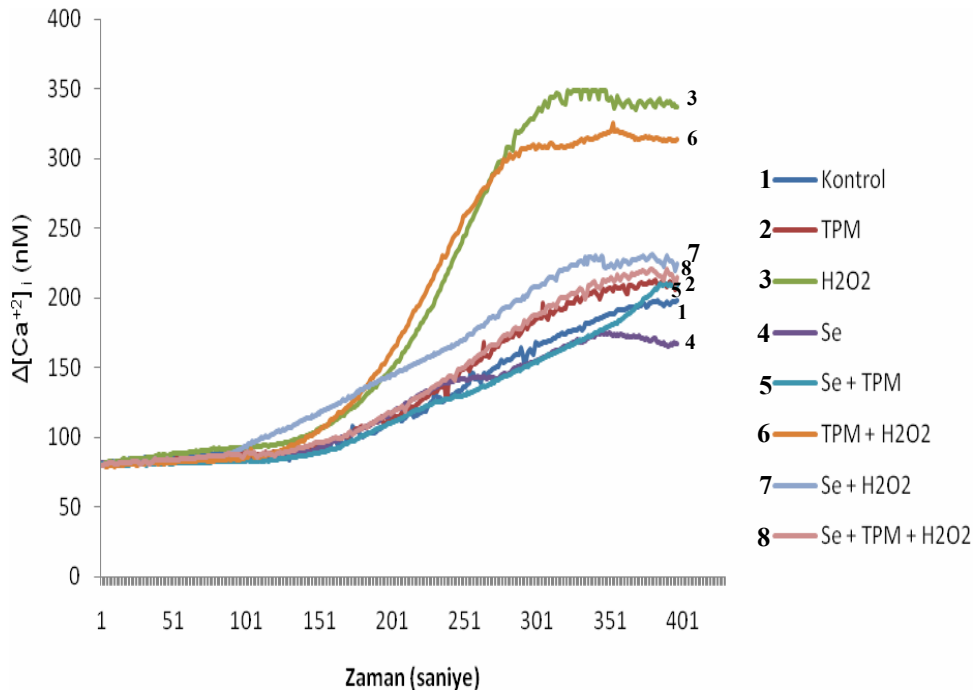
Grafik 13. TPM+H₂O₂ grubunda sitozole Ca⁺² salınışının zaman akım grafiği



Grafik 14. Se+H₂O₂ grubunda sitozole Ca⁺² salınışının zaman akım grafiği



Grafik 15. Se+TPM+H₂O₂ grubunda sitozole Ca⁺² salınışının zaman akım grafiği



Grafik 16. PC12 hücre gruplarının sitozole Ca⁺² salınışının zaman akım grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, PC12 hücrelerine H₂O₂ vererek oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde, TPM ve Se'nin antioksidan enzimler üzerine, sitozole Ca⁺² salınımı üzerine ve hücre canlılığı üzerine etkilerini araştırmak, alınan sonuçlarla da TPM'nin etki mekanizmasının aydınlatılarak, Se ile birlikte verilmesinin fayda veya zararlarının araştırılması amaçlandı. Çalışmamız, TPM ve Se'nin oksidatif stres üzerindeki etkilerini PC12 hücre ortamında değerlendiren ilk çalışmadır. Çalışmamızda TPM, Se ve H₂O₂ uygulamaları hücre canlılığı testi olan MTT yöntemi sonucunda bulunan doz ve sürelerde yapıldı.

Hidrojen peroksit, serbest radikallerin endojen kaynağıdır ve hücresel düzeyde oksidatif strese neden olur (107). Bizim çalışmamızda, H₂O₂ verilen grupta; kontrol, TPM, Se ve Se+TPM gruplarıyla karşılaştırıldığında, lipid peroksidasyon ürünüde anlamlı artma, GSH düzeyinde anlamlı azalma saptandı. Yine H₂O₂ verilen grupta, Se ve Se+TPM gruplarıyla karşılaştırıldığında, GSH-Px düzeyinde anlamlı azalma saptandı. Bu durum, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak H₂O₂'nin, endojen antioksidan savunma sisteminin koruma kapasitesine zarar vererek oksidatif stresi arttırdığını (22,147) ve oluşan reaktif oksijen türlerinin hücre membran ve lipoproteinlerindeki poliansatüre yağ asitleri ile etkileşime girip, lipid peroksidasyon sürecini başlattığını gösterdi (148). Oluşan oksidatif strese bağlı aşırı serbest radikal üretimi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olmak üzere birçok kanalı uyararak sitozole kalsiyum akışını daha da uyarmaktadır. Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir (19,149). Çalışmamızda, H₂O₂ verilen grupta, sitozole kalsiyum iyonu [Ca⁺²]_i salınımı kontrol, TPM, Se ve Se+TPM gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum, yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak H₂O₂'nin apoptozis yollarını tetiklediğini düşündürdü (22,145).

Epilepside altta yatan patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir (1). Aşırı serbest radikal üretimi ve oksidatif stresin epilepsi patofizyolojisinde rol oynayabileceğini gösteren artan sayıda kanıt vardır (2,19,129). Yapılan in vivo çalışmalarla serbest radikallerin eksitotoksikite oluşumuna direk olarak katıldığı gösterilmiş ve serbest radikallerin eksitotoksik mekanizmalarına

katıldığı nörolojik hastalıklarda antioksidanların faydalı olabileceği belirtilmiştir (150).

Mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stres epileptik nöbetlerin hem nedeni hem de sonucudur (2). Nazıroğlu ve arkadaşları, pentilentetrazol ile nöbet oluşturulan sıçanların beyin korteksinde kontrollere göre, MDA düzeyinde anlamlı artma, GSH ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı azalma bildirmişlerdir (151). Yapılan bir çalışmada kainik asit ve pilokarpin sonrası lipid peroksidasyonun göstergesi olan tioabarbitürik asit ürünlerinin status sonrası 12. saate kadar artmaya devam ettiği gösterilmiştir (152). Yapılan başka bir hayvan çalışmasında ise pilokarpin ile tetiklenmiş status epileptikus sonrası 24. saatte kontrol grubuna göre lipid peroksidasyonun %77 civarında arttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada GSH konsantrasyonunun kontrol grubuna göre %55 oranında azaldığı gösterilmiştir (153). İlhan ve arkadaşları yaptığı iki çalışmada pentilentetrazol ile farelerde oluşturulan epileptik nöbetlerde beyin dokusunda MDA ve NO düzeylerinin arttığını, SOD aktivitesinin değişmediğini bildirmiştir (154,155). Ülkemizde yapılan bir çalışmada yeni epilepsi tanısı almış 27 hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrası eritrositlerinde lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim düzeyleri 25 tane sağlıklı kontrol ile karşılaştırılmıştır. Tedavi öncesi hastalarda kontrol grubuna göre lipid peroksidasyonu artmış olarak bulunurken, eritrosit GSH ve GSH-Px enzim düzeylerinde bir değişiklik saptanmamıştır (156). Kutluhan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, pentilentetrazol ile nöbet oluşturulan sıçanlarda plazma ve eritrosit lipid peroksidasyon düzeyi anlamlı olarak yüksek, eritrosit GSH ve GSH-Px enzim aktivitesi ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur (157). Devi ve arkadaşları yaptıkları derlemede çeşitli epilepsi modellerinde beyin korteksindeki oksidatif stres bulgularını toplamışlardır. Çalışmalarda lipid peroksidasyonu, değerlendirilen tüm nöbet modeli gruplarında yüksek bulunmuş fakat antioksidan enzim aktiviteleri ile ilgili farklı sonuçlar vardır. Lityum-pilokarpin ile oluşturulan status epileptikus modelindeki bir çalışmada GSH, GSH-Px aktivitesinin azaldığı, SOD ve katalaz aktivitesinin ise arttığı saptanmıştır. Pilokarpin ile oluşturulan status epileptikus modelindeki çalışmalardan birinde katalaz, SOD, GSH-Px aktivitesinin azaldığı, diğerinde katalaz aktivitesinin arttığı ve GSH aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Kainik asit ile oluşturulan nöbet modelini içeren bir çalışmada da GSH ve GSH R

aktivitesinin azaldığı ve GSSG aktivitesinin ise arttığı bildirilmiştir (4). Freitas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanlarda pilokarpin ile oluşturulan epileptik nöbet modelinde hipokampusta MDA ve nitrit düzeylerinin arttığı ancak SOD ve katalaz aktivitelerinin değişmediği saptanmıştır (158). Epilepsi ve oksidatif stres üzerine yapılan çalışmalarda çelişkiler mevcuttur. Bunun nedeni kullanılan metotların farklılığı ve beyin dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin diğer organlara göre düşük olması nedeniyle oksidatif strese olan yanıtın net olarak gösterilememesi olabilir.

Hücresele düzeyde incelendiğinde, artmış nöbet aktivitesi NMDA ve voltaj bağımlı iyon kanallarının aracılığı ile yoğun Ca^{+2} akışına yol açarak hücre içi Ca^{+2} u artırır ve mitokondriyal Ca^{+2} artışı ile serbest radikal üretimi ve nöronal ölüm gelişir (19). Son çalışmalar kazanılmış epilepsilerde Ca^{+2} homeostaz bozukluğunun rol oynadığını göstermiştir (18,29). Sun ve arkadaşları, glutamat hasarının indüklediği epileptogenezde kültür hücrelerinde intrasellüler Ca^{+2} düzeyinin geri dönüşümlü yükseldiğini tespit etmişlerdir. Epileptojenik glutamat maruziyetinde ekstrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunun azaldığını, NMDA reseptör antagonistleri verildiğinde intrasellüler Ca^{+2} yükselmesinin azaldığını ve epileptik aktivitenin inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca non NMDA reseptör antagonizminin Ca^{+2} düzeyi ve epileptogenez üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ca^{+2} yükselme süresi ve total Ca^{+2} miktarının istatistiksel olarak epileptogenez gelişmesi ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Epileptik nöronlarda glutamatın indüklediği Ca^{+2} yüksekliğinin kontrol nöronlarına göre daha uzun sürede normal düzeyine gerilediği gösterilmiştir (159). İdiyopatik jeneralize epilepsilerde, VBKK'nın subunitlerinde defektlerin (özellikle P/Q tip ve T tip) nöbet genetiğine katkıda bulunduğu ve ağ bağlantı aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (18). Pal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz inhibitörü thapsigarginin, epileptik nöronlarda Ca^{+2} salınımını anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (160).

Topiramate, nöroprotektif etkinliği olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş yeni kuşak bir entiepileptiktir (7,9,151). Fakat bu etkisini hangi mekanizma üzerinden gösterdiğine yönelik araştırmalar ve tartışmalar halen devam etmektedir. Angehagen ve arkadaşları, primer nöronal-astroglial kültürde TPM'nin glutamat ve kainatın

neden olduğu nörotoksositeye karşı koruyucu olduğunu bulmuşlar ve TPM'nin nöroprotektif etkisini kainat reseptörleri üzerine olan inhibitör etkisine ve glutamatin neden olduğu intrasellüler Ca^{+2} akışını azaltmasına bağlı olabileceğini düşünmüşler (161). Noh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TPM'nin, in vitro oksijen-glukoz deprivasyonunun neden olduğu nöronal ölüm üzerine ve in vivo immatür beyinde hipoksik iskeminin neden olduğu hasar üzerine güçlü nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Çalışmanın in vitro verileri, TPM'nin oksijen glukoz deprivasyonunun neden olduğu nöronal hasara karşı nöroprotektif etkisini AMPA reseptörlerinin inhibisyonu üzerinden olabileceğini göstermiştir. İn vivo hipoksik iskeminin neden olduğu nörotoksitede ise sitozolik serbest Ca^{+2} da, serbest radikallerde ve hücre ölümünü indükleyen moleküllerde artma olduğundan nöroproteksiyon mekanizmasında farklı moleküler olayların ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir (9). Kudin ve arkadaşları pilokarpin ile oluşturulan epilepsi modelinde, TPM'nin mitokondrial fonksiyonlar üzerine etkisini değerlendirmişler ve eksternal Ca^{+2} a karşı hipokampal mitokondri üzerine koruyucu etkisi olduğunu bulmuşlar. TPM'nin nöroprotektif etkisinin mitokondrial geçirgenlik kanalları üzerine olan inhibitör etkisi ile direk ilişkili olabileceği sonucuna varmışlar (162). Mitokondrial geçirgenlik kanalları apoptotik nöronal ölümü geciktirir, TPM'nin nöroprotektif etkisi antiapoptotik fonksiyonlar ile ilişkili olabilir (9). Nazıroğlu ve arkadaşları, pentilentetrazol ile nöbet oluşturulan sıçanlarda, TPM'nin; mikrozomal kalsiyumu, beyin korteks ve mikrozomal lipid peroksidasyon seviyelerini azaltarak, GSH seviyesini, plazma membran Ca ATPaz aktivitesini ve vitamin A, E, C konsantrasyonlarını arttırarak oksidatif strese karşı koruyucu etkisini göstermişlerdir (151). Maria ve arkadaşları, kokainin neden olduğu oksidatif stres üzerine TPM'nin önleyici etkisini değerlendirmişler ve TPM'nin hipokampal GSH ve GSH-Px düzeylerini arttırarak oksidatif stresi önleyebileceğini düşünmüşlerdir (163). Nazıroğlu ve arkadaşlarının diğer bir çalışmasında, pentilentetrazol ile nöbet oluşturulan sıçanlarda TPM ile serum nitrik oksid, beyin korteks ve mikrozomal lipid peroksidasyon seviyelerinin azaldığı, bununla birlikte beyin korteks GSH, beyin mikrozomal GSH ve GSH-Px düzeylerinin ise arttığı bildirilmiştir (149). Tüm bu çalışmaların aksine; Pavone ve Cardile, TPM'nin primer sıçan astrosit kültüründe

lipid peroksidasyon düzeylerini arttırarak oksidatif strese neden olduğunu göstermişlerdir (164).

Çalışmamızda; TPM+H₂O₂ verilen grupta; H₂O₂ verilen gruba göre GSH düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum, TPM'nin; H₂O₂'nin antioksidan savunma sistemine zarar verici etkisini önlediğini göstermektedir. TPM+H₂O₂ verilen grupta H₂O₂ verilen gruba göre, lipid peroksidasyon düzeyi anlamlı düzeyde düşük bulundu. Bu bulgu, TPM'nin, H₂O₂'nin neden olduğu membran poliansature yağ asidi oksidasyonunu önlediğini göstermektedir. Bu sonuçlara göre; TPM, nöroprotektif etkisini lipid peroksidasyon düzeyini azaltarak ve GSH düzeyini arttırarak gösteriyor olabilir. Ayrıca TPM grubu ile kontrol grubu arasında sitozole saniyede Ca⁺² salınımında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuç da, TPM'nin Ca⁺² sinyali üzerinde toksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Bizim çalışmamızın sonuçları, TPM nin nöroprotektif etkisini gösteren çalışmaları desteklemektedir (149,151,163).

Topiramatin hem Ca⁺² hem de Na⁺ iyon girişi üzerinde düzenleyici etkisi vardır (5,41). Bu her iki iyonun sitozole girmesi mitokondri depolarizasyonu ile serbest radikal üretimini arttırmaktadır (19,165). Bizim sonuçlarımıza göre, TPM'nin sitozole Ca⁺² serbestlenişi üzerinde etkisinin olmayıp oksidatif stres üzerinde inhibitör yönde etkisinin olması TPM'nin Na⁺ kanalları üzerindeki etkisinin daha baskın olduğunu düşündürmektedir.

Antiepileptik ilaçlar ile oksidatif stres ilişkisi üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Kıyıcı ve arkadaşları, karbamazepin, valproik asit, fenitoin kullanan hastalarda eritrosit MDA düzeylerini değerlendirdikleri çalışmada, fenitoin kullanan grupta diğer gruplara ve kontrole göre eritrosit MDA düzeylerinde anlamlı artış saptamışlardır (166). Liu ve arkadaşları, uzun dönem fenitoin ve karbamazepin monoterapisi alan hastalarda yaptıkları çalışmada fenitoinin serum MDA ve SOD düzeylerini arttırdığını, karbamazepinin ise hafif düzeyde SOD artışı dışında anlamlı değişiklik yapmadığını göstermişler ve sonuç olarak karbamazepinin oksidatif dengeyi daha az bozduğunu belirtmişlerdir (167). Yeni epilepsi tanısı alan ve valproik asit tedavisi başlanan hastaların prospektif olarak takip edildiği bir çalışmada lipid peroksidasyonun tedavi öncesi değerlere göre arttığı, GSH-Px

aktivitesinin tedavi öncesi değerlere göre azaldığı gösterilmiştir (156). Yalçın ve arkadaşları epileptik çocuklarda karbamazepin ve fenobarbital kullanımının, eritrosit lipid peroksit düzeylerinde kontrollere göre anlamlı artış yaptığını göstermiş ve antiepileptik ilaç alanlarda antioksidan kullanmanın faydalı olabileceğini bildirmişlerdir (168). Peker ve arkadaşlarının yaptığı çalışma valproik asit kullanan epilepsi hastalarının serumunda MDA, SOD, katalaz düzeylerinin değişmediğini göstermiştir (169). Sobaniec ve arkadaşlarının antiepileptik kullanan çocuklarda kontrolle karşılaştırmalı yaptıkları çalışmada; valproik asit tedavisi alanlarda eritrosit MDA düzeyinin artarken, GSH-Px düzeylerinin azaldığı; karbamazepin kullananlarda eritrosit MDA düzeyinin azalırken, GSH-Px düzeylerinin arttığı; politerapi alanlarda ise eritrosit MDA düzeylerinin azalırken, GSH-Px düzeylerinin arttığı bulunmuştur (170). Oliveira ve arkadaşları farelerde pilokarpin ile oluşturdukları epilepsi modelinde, levitirasetamın hipokampusta lipid peroksidasyon ve nitrit-nitrat düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığını göstermişlerdir (171). Michoulas ve arkadaşları, valproik asit tedavisi alan çocukların idrarında, oksidatif stresin göstergesi olan 15-F2t-isoprostane düzeyinin kontrollere göre anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir (172). Kubera ve arkadaşları, kainat ile oluşturulan status epileptikus modelinde, TPM'nin piriform kortekste lipid peroksidasyon düzeylerini azaltarak antioksidan rol oynayabileceğini bulmuşlardır (173). Bashkatova ve arkadaşları sıçan beyin dokusunda yaptıkları çalışmada, pentilentetrazol uygulaması ile oluşan lipid peroksidasyon düzeyindeki artışın fenobarbital, lamotrijin, fenazepam, meksidol, α -tokoferol tedavileri ile azaltıldığını göstermişlerdir (174). Kinoshita ve arkadaşlarının fenobarbital verilen farelerde yaptıkları çalışmada, karaciğer hücre çekirdeklerinde 8-OH-deoksiguanozin oluşumu gösterilmiştir (175). Bahsedilen bu çalışmalar arasında çelişkiler olmakla birlikte eski kuşak antiepileptik ilaçların oksidatif stres oluşturmaya meyilli oldukları, yeni kuşak antiepileptik ilaçların ise oksidatif stres oluşturmayıp hatta azaltıcı etkilerinin olabileceği değerlendirilebilir. Bizim çalışmamız bu değerlendirmeyi desteklemektedir.

Selenyum, insan organizmasında bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynayan bir eser elementtir. Önemli fonksiyonlarından biri antioksidan özelliğidir. Sinir sistemi fonksiyonlarının devamında Se'nin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Se,

GSH-Px enziminin yapısında kofaktör olarak görev alır. Ashrafi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, dirençli nöbetleri olan çocuk hastalarda ortalama serum Se seviyesi ve GSH-Px aktivitesi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (14). Shams ve arkadaşları yaptıkları çalışmada epileptik hastalarda serum Se seviyesini ve GSH-Px aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulmuşlar, Se ve GSH-Px'in epilepsi patojenezinde önemli rolü olabileceği sonucuna varmışlardır (15). Fizyolojik seviyelerde sodyum selenitin nöronal hücre kültüründe eksitotoksik hücre hasarına karşı koruyucu olduğu ve hatta primer hasarı azalttığı gösterilmiştir (84). Pentilentetrazol ile nöbet oluşturulan sıçanlarda, Se ile plazma ve eritrosit lipid peroksidasyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, eritrosit GSH ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ise anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (157). Nöbet sırasında artmış nörometabolik aktivite nöronal membranların instabilitesine yol açarak peroksidatif hasar ile birlikte oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına, lipid peroksidasyonuna, nöbetlerin dirençli olmasına ve nöronal hasarın artmasına neden olmaktadır. Nöbetlerin kontrolünde antioksidan savunma sistemi aktivitesindeki azalma veya serbest oksijen radikali oluşumundaki artma ile sonuçlanan membran lipid peroksidasyonunun kritik role sahip olduğu belirlenmiştir. Se eksikliği, GSH-Px aktivitesindeki azalma ile lipid peroksidasyonuna neden olur, sonuçta membran hasarı ve nöronal hücre kaybı meydana gelir (14). Devi ve arkadaşları yaptıkları derlemede çeşitli epilepsi modellerinde farklı antioksidanların epileptik nöbet üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Pentilentetrazol ile nöbet oluşturulan farelerde N-asetil sisteinin nöbete karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Pilocarpin ile nöbet oluşturulan sıçanlarda tokoferolün ve C vitamininin ilk nöbet latansını uzattığı ve nöbetleri azalttığı bulunmuştur. Kainik asit ile nöbet oluşturulan farelerde melatoninin nöbet insidansını azalttığı ve FeCl₂ ile sıçanlarda oluşturulan nöbet modelinde lipoik asidin nöbet aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (4).

Çalışmamızın sonucunda; Se+H₂O₂ verilen grupta, H₂O₂ verilen gruba göre lipid peroksidasyon düzeyi anlamlı düzeyde düşük, GSH ve GSH-Px düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Yine Se+H₂O₂ grubunda H₂O₂ grubuna göre, sitozole [Ca⁺²]_i salınımı belirgin düzeyde düşük bulundu. Çalışmamıza göre Se'nin sitozole [Ca⁺²]_i salınımını azaltıcı etkisi, apoptozise karşı koruyucu etkisinin

olduğunu destekleyebilir. Bu bulgulara göre Se; epilepsi patofizyolojisinde suçlanan serbest radikal artışı ve Ca^{+2} artışı düzenleyerek tedavide faydalı olabilir (19).

Çalışmamızda, Se+TPM+ H_2O_2 grubunda, H_2O_2 grubuna göre lipid peroksidasyonu ve sitozole Ca^{+2} salınımı düzeyleri anlamlı olarak düşük; GSH düzeyi anlamlı olarak yüksek saptandı. Se+TPM grubunda H_2O_2 grubuna göre, GSH-Px düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu bulgular TPM ve Se'nin birlikte verilmesi durumunda da oksidatif stres üzerinde düzenleyici etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlarımızla; TPM ve Se'nin ratlarda oksidan/antioksidan denge üzerine yapılmış çalışmaları hücre kültürü ortamında hücre düzeyinde desteklemiş olduk (151,157).

Sonuç olarak, PC12 hücrelerine H_2O_2 vererek oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde, TPM ve Se'nin hem birlikte hem de ayrı ayrı verilmeleriyle oksidatif stresten koruyucu etkilerinin olduğu görüldü.

ÖZET

Topiramamat ve Selenyumun PC12 Hücrelerinde Ca^{+2} Sinyali, Oksidatif Stres ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Epilepsi tam olarak anlaşılmayan biyokimyasal ve moleküler olaylardan kaynaklanan yaygın ve heterojen bir nörolojik hastalıktır. Oksidatif stresin epilepsi patofizyolojisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Selenyumun (Se) epileptik hastalarda antioksidan savunma mekanizmasını düzenleyerek nöronal hasara karşı koruma sağladığı bildirilmiştir. Topiramamatın (TPM) nöroprotektif etkisi birçok çalışmada rapor edilmiş olmasına rağmen muhtemel etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, TPM ve Se'nin PC12 hücrelerinde, lipid peroksidasyonu, glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), sitozolik Ca^{+2} salınımı ve hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemektir.

PC12 hücreleri; kontrol, TPM, Se, H_2O_2 , TPM+ H_2O_2 , Se+ H_2O_2 , Se+TPM ve Se+TPM+ H_2O_2 olmak üzere sekiz gruba ayrıldı. H_2O_2 , TPM and Se'nin doz ve süreleri hücre canlılığını değerlendirmede kullanılan MTT analizine göre belirlendi. Hücreler 10 μ M TPM ile 5 saat ve 500 η M Se ile 10 saat inkübe edildi. Ardından hücreler analizden önce 10 saat boyunca 100 μ M H_2O_2 ye maruz bırakıldı.

Lipid peroksidasyon düzeyi; kontrol, TPM, Se, Se+TPM, Se+ H_2O_2 , TPM+ H_2O_2 ve Se+TPM+ H_2O_2 gruplarında H_2O_2 grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,05$). GSH-Px aktivitesi; Se ve Se+TPM gruplarında H_2O_2 grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,01$). GSH seviyesi; kontrol, TPM, Se, Se+TPM, Se+ H_2O_2 , TPM+ H_2O_2 ve Se+TPM+ H_2O_2 gruplarında H_2O_2 grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,05$). Sitozolik Ca^{+2} salınımı, H_2O_2 ve TPM+ H_2O_2 gruplarında kontrol, TPM, Se, Se+TPM, Se+ H_2O_2 , Se+TPM+ H_2O_2 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,001$). Sitozolik Ca^{+2} salınımı, Se+ H_2O_2 grubunda kontrol, Se ve Se+TPM gruplarına göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,05$).

Sonuç olarak, bu çalışmada TPM ve Se'nin PC12 hücrelerinde oksidatif stres üzerine koruyucu etkileri olduğu gösterilmektedir.

Anahtar sözcükler: Epilepsi, topiramamat, selenyum, oksidatif stres, $[Ca^{+2}]_i$ salınımı, PC12 hücreleri.

SUMMARY

Effects of Topiramate and Selenium on Ca^{2+} Signaling, Oxidative Stress and Cell Viability in PC12 Cells

Epilepsy is a common and heterogeneous neurological disorder arising from biochemical and molecular events that are incompletely understood. It has been widely suggested that oxidative stress products play an important role in the pathophysiology of epilepsy. It has been reported that selenium (Se) provides protection against the neuronal damage in patients with epilepsy by restoring the antioxidant defense mechanism. The neuroprotective effects of topiramate (TPM) have been reported in several studies but the putative mechanism of action remains elusive.

The aim of this study is to investigate the effects of TPM and Se on lipid peroxidation, glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), cytosolic Ca^{2+} release and cell viability in PC12 cells.

PC12 cells were divided into eight groups namely control, TPM, Se, H_2O_2 , TPM+ H_2O_2 , Se+ H_2O_2 , Se+TPM, Se+TPM+ H_2O_2 . The doses and times of H_2O_2 , TPM and Se were determined by MTT assay which is used to evaluate cell viability. Cells were incubated with 10 μM TPM for 5 hours and 500 ηM Se for 10 hours. Then, cells were exposed to 100 μM H_2O_2 for 10 hours before analysis.

Lipid peroxidation levels were significantly lower in the control, Se, TPM, TPM+ H_2O_2 , Se+ H_2O_2 , Se+TPM, Se+TPM+ H_2O_2 groups than in the H_2O_2 group ($p < 0,05$). GSH-Px activities were significantly higher in the Se and Se+TPM groups than in the H_2O_2 group ($p < 0,01$). GSH levels were significantly higher in the control, Se, TPM, TPM+ H_2O_2 , Se+ H_2O_2 , Se+TPM, Se+TPM+ H_2O_2 groups than in the H_2O_2 group ($p < 0,05$). Cytosolic Ca^{2+} release was significantly higher in the H_2O_2 and TPM+ H_2O_2 groups than in the control, Se, TPM, Se+ H_2O_2 , Se+TPM, Se+TPM+ H_2O_2 groups ($p < 0,001$). Cytosolic Ca^{2+} release was significantly higher in the Se+ H_2O_2 group than in the control, Se, Se+TPM ($p < 0,05$).

In conclusion, the present study demonstrates that TPM and Se have protective effects on oxidative stress in PC12 cells.

Keywords: Epilepsy, topiramate, selenium, oxidative stress, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ release, PC12 cells.

KAYNAKLAR

1. Noseworthy JH. Neurological Therapeutics Principles and Practise. Volume 1, Chapter 29, Second edition, London: Informa Healthcare, 2006: 336.
2. Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(12):1951-62.
3. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2010; 88(1):23-45.
4. Devi PU, Manocha A, Vohora D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9(18): 3169-77.
5. Mula M, Cavanna AE, Monaco F. Psychopharmacology of topiramate: from epilepsy to bipolar disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2006; 2(4):475-88.
6. Reife R, Pledger G, Wu S-C. Topiramate as add-on therapy: pooled analysis of randomised controlled trials in adults. *Epilepsia* 2000; 41(1):66-71.
7. Angehagen M, Ben-Menachem E, Rönnbäck L, Hansson E. Novel mechanisms of action of three antiepileptic drugs, vigabatrin, tiagabine, and topiramate. *Neurochem Res* 2003; 28(2):333-40.
8. Latini G, Verrotti A, Manco R, Scardapane A, Del Vecchio A, Chiarelli F. Topiramate: its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8(1):10-23.
9. Noh MR, Kim SK, Sun W, Park SK, Choi HC, Lim JH, et al. Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol* 2006; 201(2):470-8.
10. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7):775-806.
11. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356: 233–41.
12. Boosalis MG. The role of selenium in chronic disease. *Nutr Clin Pract* 2008; 23(2):152-60.
13. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ* 2008; 400(1-3):115-41.
14. Ashrafi MR, Shabani R, Abbaskhanian A, Nasirian A, Ghofrani M, Mohammadi M, et al. Selenium and intractable epilepsy: is there any correlation?. *Pediatr Neurol* 2007; 36(1):25-9.
15. Shams S, Ashrafi MR, Nori M, Irani H, Ashtiani MTH, Mohseni A. Selenium and glutathione peroxidase deficiency in epileptic children. *Iran J Pediatr* 2007; 17:173–8.
16. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31(2);51–6.
17. Berridge MJ. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* 1998; 21:13-26.
18. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 2008; 60(9):575-90.
19. Nazıroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res*. 2009; doi: on. 1007/s 11064-009-0015-8.

20. Zhou H, Li X, Gao M. Curcumin protects PC12 cells from corticosterone-induced cytotoxicity: possible involvement of the ERK1/2 pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 104(3):236-40.
21. Bai O, Wei Z, Lu W, Bowen R, Keegan D, Li XM. Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *J Neurosci Res* 2002; 69(2):278-83.
22. Wei Z, Bai O, Richardson JS, Mousseau DD, Li XM. Olanzapine protects PC12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J Neurosci Res* 2003; 73(3):364-8.
23. Yıldırım M, Marangoz C. Anticonvulsant effects of melatonin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Res* 2006; 1099(1):183-8.
24. Rowland. LP. *Merrit's Neurology*. 11 th edition, 2005;990.
25. Noseworthy JH. *Neurological Therapeutics Principles and Practise*. Volume 1, Chapter 28, Second edition, London: Informa Healthcare, 2006: 317.
26. Mac TL, Tran DS, Quet F, et al. Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review. *Lancet Neurol* 2007; 6:533 -43
27. Holmes GL. Role of Glutamate and GABA in The Pathophysiology of Epilepsy. *MRDD Research Reviews* 1995; 1:208-19.
28. Badawy RA, Harvey AS, Macdonell RA. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy. *J Clin Neurosci* 2009; 16(3):355-65.
29. Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintainance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 2005; 105(3):229-66.
30. Kaya M. Nöronal Uyarılabilirliğin Kontrolü: Uyarıcı ve İnhibe edici Sinaptik Geçiş. *Epilepsi*, Bora İ, Yeni SN, Gürses C. İstanbul: Nobel Tıp kitabevleri, 2008:15-24.
31. Subutay-Öztekin N. *Epilepsi Fizyopatolojisi*. Türkiye Klinikleri Nöroloji 2004; 2(2):97-101.
32. Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol* 2003; 2(1):33-42.
33. Şahiner T. *Epilepside temel mekanizmalar*. *Epilepsi*, Bora İ, Yeni SN, Gürses C. İstanbul: Nobel Tıp kitabevleri, 2008: 29-34.
34. Shank RP, Gardocki JF, Vaught JL. TPM: preclinical evaluation of a structurally novel anticonvulsant. *Epilepsia* 1996; 37:148-61
35. Spina E, Perugi G. Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy. *Epileptic Disord* 2004; 6:57-75.
36. D'Amico D, Grazi L, Bussone G. Topiramate in the prevention of migraine: a review of its efficacy, tolerability, and acceptability. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2006; 2:261-7.
37. Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia* 2000; 41(1):3-9.
38. Recacha R, Costanzo MJ, Maryanoff BE, Chattopadhyay D. Crystal structure of human carbonic anhydrase II complexed with an anti-convulsant sugar sulphamate. *Biochem J* 2002; 361(3):437-41.

39. Vajda FJ. New antiepileptic drugs. *J Clin Neurosci* 2000; 7(2):88-101.
40. Zona C, Ciotti MT, Avoli M. Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 1997; 231(3):123-6.
41. Lyseng-Williamson KA, Yang LP. Topiramate: a review of its use in the treatment of epilepsy. *Drugs* 2007; 67(15):2231-56.
42. Glauser TA. Topiramate. *Epilepsia* 1999; 40(5):71-80.
43. Karamustafalıoğlu O, Demirkıran S. Psikiyatrik bozukluklarda topiramate kullanımı. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2004; 14:26-37.
44. Poulsen CF, Simeone TA, Maar TE, Smith-Swintosky V, White HS, Schousboe A. Modulation by topiramate of AMPA and kainate mediated calcium influx in cultured cerebral cortical, hippocampal and cerebellar neurons. *Neurochem Res* 2004; 29(1):275-82.
45. Kuzmiski JB, Barr W, Zamponi GW, MacVicar BA. Topiramate inhibits the initiation of plateau potentials in CA1 neurons by depressing R-type calcium channels. *Epilepsia* 2005; 46(4):481-9.
46. Sonat FA. Antiepileptikler ve Yeni Bir Antiepileptik Olan Topiramatin Epilepsi Tedavisindeki Yeri ve Önemi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2009; 15(6):987-92.
47. Sankar R, Holmes GL. Mechanisms of action for the commonly used antiepileptic drugs: Relevance to antiepileptic drug-associated neurobehavioral adverse effects. *J Child Neurol* 2004; 19:6-14.
48. Kaminski RM, Banerjee M, Rogawski MA. Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology* 2004; 46:1097-104.
49. Nieubauer M, Gruenthal M. Topiramate reduces neuronal injury after experimental status epilepticus. *Brain Res* 1999; 837:263-9.
50. Onat F, Eşkazan E. Antiepileptik İlaçlar. *Epilepsi*, Bora. İ, Yeni SN, Gürses C. İstanbul: Nobel Tıp kitabevleri, 2008:603.
51. Garnett WR. Clinical pharmacology of topiramate: a review. *Epilepsia* 2000; 41(1):61-5.
52. Anderson GD. A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. *Ann Pharmacother* 1998; 32:554-63.
53. Perucca E. A pharmacological and clinical review on topiramate, a new antiepileptic drug. *Pharmacol Res* 1997; 35:241-56
54. Langtry HD, Gillis JC, Davis R. Topiramate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in the management of epilepsy. *Drugs* 1997; 54:752-73.
55. Privitera M. Topiramate: a new antiepileptic drug. *Ann Pharmacother* 1997; 31:1164-73
56. Faught E, Wilder BJ, Ramsay RE, et al. Topiramate placebo-controlled dose-ranging trial in refractory partial epilepsy using 200, 400, and 600 mg daily dosages. *Neurology* 1996; 46:1684-90.
57. Biton V, Montouris GD, Ritter F, et al. A randomized, placebo controlled study of topiramate in primary generalized tonic clonic seizures. *Neurology* 1999; 52(7):1330-7.

58. Elterman RD, Glauser TA, Wyllie E, et al. A double-blind, randomised trial of topiramate as adjunctive therapy for partial-onset seizures in children. *Neurology* 1999; 52:1338-44.
59. Faught E, Wilder BJ, Ramsay RE, et al. Topiramate placebo controlled dose- ranging trial in refractory partial epilepsy using 200, 400, and 600 mg daily dosages. *Neurology* 1996; 46(6): 1684-90.
60. Sachdeo RC, Glauser TA, Ritter F, et al. A double-blind, randomized trial of topiramate in Lennox-Gastaut syndrome. *Neurology* 1999; 52(9):1882-7.
61. Korean Topiramate Study Group. Low dose and slow titration of topiramate as adjunctive therapy in refractory partial epilepsies: a multicentre open clinical trial. *Seizure* 2002; 11(4):255-60.
62. Glauser TA, Levisohn PM, Ritter F, et al. Topiramate in Lennox-Gastaut syndrome: open-label treatment of patients completing a randomized controlled trial. *Epilepsia* 2000; 41(1): 86-90.
63. Browne TR, Holmes GL. *Epilepsi El Kitabı, Türkçe çeviri editörü Komsuoğlu SŞ, Güneş Tıp Kitabevleri, 2007:191.*
64. Hardy G, Hardy I. Selenium: the Se-XY nutraceutical. *Nutrition* 2004; 20(6):590-3.
65. Navarro Alarcon M, Lopez Ga de la Serrana H, Perez-Valero V, Lopez Martinez MC. Selenium concentrations in serum of individuals with liver diseases (cirrhosis or hepatitis): relationship with some nutritional and biochemical markers. *Sci Total Environ* 2002; 291:135-41.
66. Combs GF. Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 2001; 85:517-47.
67. Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev* 2004; 9(3):239-58.
68. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 2003; 86:1-12.
69. Birringer M, Pilawa S, Flohe L. Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 2002; 693-718.
70. Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45(3):164-78.
71. Ip C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr* 1998; 128(11):1845-54.
72. Canoruç N, Canoruç F, Aslan Ç, Yılmaz Ş, Turgut C, Dursun M, ve ark. Karaciğer hastalıklarında (siroz veya hepatit) homosistein ve selenyum düzeyleri. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2006; 5:26-30.
73. Van Cauwenbergh RV, Robberecht H, Va Vlaslaer V. Comparison of the serum selenium content of healthy adults living in the Antwerp region (Belgium) with recent literature data. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 18:99-112.
74. Köhrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(13-14):1853-63.
75. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000; 346:1-8.
76. Hamilton SJ. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* 2004; 326:1-31.

77. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58:391–402.
78. Hartikainen H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol* 2005; 18:309-18.
79. Li N, Gao Z, Luo D, Tang X, Chen D, Hu Y. Selenium level in the environment and the population of Zhoukoudian area, Beijing, China. *Sci Total Environ* 2007; 381:105-11.
80. Czuczejko J, Zachara BA, Stauback-Tpoczwska E, Halota W, Kedziora J. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:1147-54.
81. Ramaekers VT, Calomme M, Vanden Berghe D, Makropoulos W. Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics* 1994; 25:217-33.
82. Willmore LJ, Rubin JJ. Antiperoxidant treatment and ironinduced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathological studies. *Neurology* 1981; 31:63-9.
83. Öztaş B, Kılıç S, Dural E, İspir T. Influence of antioxidants on the blood-brain barrier permeability during epileptic seizures. *J Neurosci Res* 2001; 66:674-8.
84. Savaskan NE, Brauer AU, Kuhbacher M, Eyupoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, et al. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity 2002; 17:112-4.
85. Gümüştas MK, Atukeren P. Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklar ile ilişkisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi* 2008; 62:329-40.
86. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(2):145-58.
87. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-55.
88. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 2005; 21:24-8.
89. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 2008; 35(3):211-5.
90. Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi* 2009; 20(2):79-83.
91. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189:41-54.
92. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007; 18(9):567-79.
93. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3:30-9.
94. Altınışık M, www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf
95. Lyras L, Perry HR, Perry KE, Ince GP, Jenner A, Jenner P, et al. Oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in cortical brain regions from patients with dementia with Lewy bodies. *J Neurochem*. 1998; 71:302-12.

96. Şimşek F. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu. Türkiye Klinikleri Pediatri. 1999; 8:42-7.
97. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. Progress in Neurobiology 1998; 56:359-84.
98. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 1992; 59:1609-23.
99. Vladimirov YA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. Biochemistry (Mosc) 2009; 74(13):1545-66.
100. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33(2):110-8.
101. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. APMIS 2007; 115:81-103.
102. Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. Regul Toxicol Pharmacol 2000; 32(3):283-92.
103. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. FASEB J 2003; 17(10):1195- 214.
104. Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, ve ark. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. Düşünen Adam 2005; 18(3):129-35.
105. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. Neurology 1993; 43:1656-65.
106. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001; 54(3):176-86.
107. Valko M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(1): 44-84.
108. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı, Klinik Gelişim 2009; 22(3):5-13.
109. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1997; 3(4):92-5.
110. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, Mccauley RD, Hall JC. Glutathione. ANZ J Surg 2003; 73:517-22.
111. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 2000; 153(1-3):83-104.
112. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. Biomed Pharmacother 2003; 57(3-4):145-55.
113. Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. Biochim Biophys Acta 2009; 1790(11):1555-68.
114. Orhan H, Şahin G. Glutatyon S-Transferazların Klinik ve Toksikolojik Önemi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri 1995; 15:303-15.
115. Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri 2002; 22:442-8.
116. Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. Eur J Clin Invest 1999; 29(3):238-45.

117. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104:6255-85.
118. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai JY, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28:625-35.
119. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16:577-86.
120. Wakamatsu TH, Dogru M, Tsubota K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2008; 71(6):72-9.
121. Eraç Y, Selli Ç, Tosun M. Kalsiyumun Çok Yönlü İşlevselliğinde TRPC İyon Kanallarının Rolü. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 2009; 28(2):161-83.
122. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(4):411-25.
123. Benarroch EE. Neuronal voltage-gated calcium channels: brief overview of their function and clinical implications in neurology. *Neurology* 2010; 74(16):1310-5.
124. McKay E, Placzek AN, Dani JA. Regulation of Synaptic Transmission and Plasticity by Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 74(8):1120-33.
125. Bootman MD, Collins JT, Peppiatt CM, Prothero LS et al. Calcium signalling-an overview. *seminars in Cell & Developmental Biology* 2001; 12:3-10.
126. Baron M, Kudin AP, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochem Soc Trans* 2007; 35:1228 -31.
127. Gao J, Chi ZF, Liu XW, et al. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rat. *Neurosci Lett* 2007; 411:152-7.
128. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262:689-95.
129. Patel MN. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. *Free Radic Res.* 2002; 36(11):1139-46.
130. Carter DS, Haider SN, Blair RE, Deshpande LS, Sombati S, DeLorenzo RJ. Altered calcium/calmodulin kinase II activity changes calcium homeostasis that underlies epileptiform activity in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 319(3):1021-31.
131. Pal S, Limbrick JDD, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Induction of spontaneous recurrent epileptiform discharges causes longterm changes in intracellular calcium homeostatic mechanisms. *Cell Calcium* 2000; 28(3):181-93.
132. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73(7):2424-8.
133. Ayasolla KR, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) attenuates the expression of LPS- and Abeta peptide-induced inflammatory mediators in astroglia. *J Neuroinflammation* 2005; 2:21.

134. Cho SA, Seo MJ, Ko JY, Shim JH, Yoo J, Kim JH, et al. Up-regulation of Idh3alpha causes reduction of neuronal differentiation in PC12 cells. *BMB Rep.* 2010; 43(5):369-74.
135. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
136. Shcharbin D, Pedziwiatr E, Blasiak J, Bryszewska M. How to study dendriplexes II: Transfection and cytotoxicity. *J Control Release.* 2010; 141(2):110-27.
137. Ying HS, Gottron FJ, Choi DW. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* 2000; 7(18):1-17.
138. Bank U, Reinhold D, Ansorge S. Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method. *Allerg. Immunol. (Leipz)* 1991; 37:119-23.
139. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res* 2000; 38:325-9.
140. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(11):1957-62.
141. Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med.* 2009; 9(1):1-7.
142. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1):192-205.
143. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71(4):952-8.
144. Bejarano I, Terrón MP. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem.* 2007; 296(1-2):77-84.
145. Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009; 232(1-3):15-23.
146. Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-50.
147. Mahadik SP, Pillai A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of combination of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *International review of Psychiatry* 2006; 18(2):119-31.
148. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15(4):316-28.
149. Naziroğlu M, Kutluhan S, Uğuz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ. Topiramate and vitamin E modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylenetetrazol-induced seizure of rats. *J Membr Biol* 2009; 229(3):131-40.
150. Schulz JB, et al. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 1995; 64(5):2239-47.

151. Naziroglu M, S Kutluhan, M Yilmaz. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol* 2008; 225(1-3):39-49.
152. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MMR, et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters* 2000; 291:179-82.
153. Freitas MR, Vasconcelos SMM, Souza FCF, Viana GSB, Fonteles MMF. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *FEBS Journal* 2005; 272:1307-12.
154. Ilhan A, et al. Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylentetrazol-induced seizures in mice. *Neurochem Res* 2004; 29(12):2287-92.
155. Ilhan A, et al. Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. *Brain Res Bull* 2005; 65(6):495-9.
156. Yüksel A, Cengiz M, Seven M, Ulutin T. Changes in the antioxidant system in epileptic children receiving antiepileptic drugs: two year prospective studies. *J Child Neurol* 2001; 16:603-6.
157. Kutluhan S, et al. Effects of selenium and topiramate on lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in blood of pentylentetrazol-induced epileptic rats. *Biol Trace Elem Res* 2009; 129(1-3):181-9.
158. Freitas RM. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett* 2009; 455(2):140-4.
159. Sun DA, Sombati S, Blair RE, DeLorenzo RJ. Calcium-dependent epileptogenesis in an invitro model of stroke-induced "epilepsy". *Epilepsia* 2002; 43(11):1296-305.
160. Pal S, Limbrick D, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Induction of spontaneous recurrent epileptiform discharges causes long-term changes in intracellular calcium homeostatic mechanisms. *Cell Calcium* 2000; 28:181-93.
161. Anghagen M, Ben-Menachem E, Ronnback L, Hansson E. TPM protects against glutamate- and kainate-induced neurotoxicity in primary neuronal-astroglial cultures. *Epilepsy Res.* 2003; 54:63-71.
162. Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45:1478-87.
163. Muriach M, Lopez-Pedrajas R, Barcia JM, Sanchez-Villarejo MV, Almansa I, Romero FJ. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress and prevention by topiramate. *J Neurochem* 2010; 114:675-84.
164. Pavone A, Cardile V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia* 2003; 44:34-9.
165. Naziroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 2007; 32:1990-2001.
166. Kıyıcı A, Yücel D. Antiepileptik ilaç kullanımı ve oksidatif stres. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2007; 5(2):57-62.

167. Liu CS, et al. Serum trace elements, glutathione, copper/zinc superoxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic patients with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clin Neuropharmacol* 1998; 21(1):62-4.
168. Yalcin AD, Onaran I, Yalcin AS. Effect of antiepileptic drugs on erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation. *Epilepsy Res* 1994; 19(3):249-52.
169. Peker E, et al. Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. *Brain Res* 2009; 1297:194-7.
170. Sobaniec W, et al. Evaluation of the influence of antiepileptic therapy on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in erythrocytes of children with epilepsy. *J Child Neurol* 2006; 21(7):558-62.
171. Oliveira AA, et al. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27(3):395-406.
172. Michoulas A, et al. Oxidative stress in children receiving valproic acid. *J Pediatr* 2006; 149(5):692-6.
173. Kubera M, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Basta-Kaim A, Les'kiewicz M, Tetich M, et al. Effect of topiramate on the kainate-induced status epilepticus, lipid peroxidation and immunoreactivity of rats. *Pol J Pharmacol* 2004; 56:553-61.
174. Bashkatova V, et al. The influence of anticonvulsant and antioxidant drugs on nitric oxide level and lipid peroxidation in the rat brain during penthylenetetrazole-induced epileptiform model seizures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27(3):487-92.
175. Kinoshita A, et al. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1), cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis* 2002; 23(2):341-9.