

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA BİLATERAL KAMMON KAROTİD ARTER
OKLÜZYONU İLE OLUŞTURULAN SEREBRAL İSKEMİ VE
REPERFÜZYON MODELİNDE CURCUMİNİN OKSİDATİF
STRES PARAMETRELERİ, KALSİYUM SİNYALİ VE
HİPOKAMPAL APOPİTOZİS ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Dr. Ali SÖYLEMEZ

**NÖROLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

I. DANIŞMAN

Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından BAP-3537-TU2-13 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA – 2014

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde yardımcı olan değerli hocam Doç.Dr. Vedat Ali YÜREKLİ'ye, uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım sonsuz hoşgörü ve anlayış sahibi değerli hocalarım Prof. Dr. Süleyman KUTLUHAN, Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ, Doç. Dr. Hasan Rifat KOYUNCUOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Seden UYAN DEMİRCİ'ye, laboratuvar çalışmaları kapsamında değerlendirme için kıymetli zamanlarını ayırdıkları için Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU ve çok değerli ekibine, deneylerin yapılması sırasında beni destekleyen Öğr. Gör. İbrahim ONARAN'a teşekkürü bir borç biliyorum.

Asistanlık sürem boyunca benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen ve tezimin gerçekleşmesi süresince her an yardımına koşan Arş. Gör. Dr. Hatice DEĞİRMENCİ ye, Arş. Gör. Dr. Burcu BAHAR KURT a şükranlarımı sunarım.

Tüm bu tez aşamaları sürerken yanında olamadığım ancak sevgisini her zaman yüreğimde hissettiğim içimin Gülen yüzü biricik oğlum Erol Alp' e, en sıkıntılı ve zor anlarımda benden dualarını ve desteklerini esirgemeyen eşsiz aileme çok teşekkür ederim.

Son olarak tüm asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım personelimden hemşiresine tüm nöroloji kliniğimize teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Ali SÖYLEMEZ

SİMGE VE KISALTMALAR

AF	Atriyal Fibrilasyon
AF	Atriyal Fibrilasyon
AMPA	Amino-3-hid- roksi-5-metiloksazol-4-propiyonik asit
ASA	Asetil Salisilik Asit
AST	Aspartat Transaminaz
BBT	Bilgisayarlı BeyinTomografi
Ca	Karsinom
COX-2	Siklooksijenaz- 2
CRP	C-Reaktif Protein
DM	Diyabetes Mellitus
DNA	Deoksi Ribo Nükleik Asit
GABA	Gama Amino Butirik Asid
GİA	Geçici İskemik Atak
GDNF	Glial Hücre Kökenli Nörotrofik Faktör
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
HBSS	Hank's Blanced Salts Solution
HT	Hipertansiyon
I/R	İskemi- Reperfüzyon
ICE	interlökin-1-beta dönüştürücü enzim
INR	International Normalised Ratio
İNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
İSK	İntraserebral Kanama
Kaspaz	Cysteine Aspartate Specific ProteASE
KAT	Katalaz
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KC	Karaciğer
LTP	Long Term Potentiation
MCAO	Mediyal Serebral Arter Oklüzyonu
MDA	Malondialdehid
MI	Miyokard İnfarktüsü
MMP	Metalloproteinaz
MRI	Manyetik Rezonans- Imaging
mRNA	Messenger RNA
NGF	Nöronal Büyüme Faktörü
NMDA	N-Metil D-Aspartat
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
Nrf2	Nükleer Faktör Eritroid 2- İlişkili Faktör2
PB	Peocessing Body
PFO	Patent Foramen Ovale
PKc	Protein Kinaz c
RNA	Ribo- Nükleik Asi
rTPA	recombinant tissue Plasminogen Activator
SAK	Subaraknoid Kanama

SG	Stres Granülleri
SOD	Süperoksid Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
SSS	Santral Sinir Sistem
SVO	Serebrovasküler Olay
TRP	Transient Teseptör Potential
TOAST	Trial of Organization in Acute Stroke Treatment
TRPV1	Transient Reseptör Potential- Vanilloid 1

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Serebrovasküler Hastalıklar.....	3
2.1.1. İnsidans	3
2.1.2. Prevelans	3
2.1.3. Serebral Dolaşım	4
2.1.4. Sınıflandırma.....	5
2.1.5. İnme Risk Faktörleri.....	8
2.1.6. Fizyopatoloji	12
2.1.7.Nöropatogeneizde Rol Alan Mekanizmalar (Şekil 1):	13
2.1.8. İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	22
2.2. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanal Ailesi.....	24
2.2.1.TRPV1	26
2.2.2 TRPV1 Ekspresyonu ve Fonksiyonları :	28
2.3. Hipokampus	29
2.4. Kaspaz Sistemi.....	30
2.5. Kalsiyum Sinyalizasyonu	31
2.6. Serebral İskemide Tedavi	32
2.7. Curcumin (Turmeric)	33
2.7.1. Curcuminin Kimyasal Özellikleri:	33
3. MATERYAL-METOD	36
3.1. Gereç ve Yöntemler	36
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	36
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.1.3. Hayvanlar ve I/R Modeli:	37

3.2. Hipokampus Hücrelerinin İzolasyonu.....	39
3.3. Laboratuvar Analizleri.....	42
3.3.1. Hücre İçi Ca^{+2} Ölçülmesi.....	42
3.3.2. Apoptozis Analizi.....	43
3.3.3. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini	43
3.3.4. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini.....	43
3.4. Etik Kurul İzni	44
3.5. İstatistiksel Analiz.....	44
4. SONUÇLAR.....	45
4.1. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus hücre içi serbest kalsiyum iyon ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerinde curcumin ve TRPV1 kanal blokörü kapsazepinin etkileri.....	45
4.2. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus apoptozis düzeyleri üzerinde curcuminin etkileri.	46
4.3. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri üzerinde curcuminin etkileri.	47
4.4. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus hücre içi ROS üretimi üzerinde curcuminin etkileri.	48
5. TARTIŞMA.....	49
ÖZET.....	57
ABSTRACT	59
KAYNAKLAR.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nöropatogeneizde rol alan mekanizmalar (3)	15
Şekil 2. Serbest radikallerin oluşumu ve detoksifikasyonu (58).....	17
Şekil 3. Serebral iskemiye takiben gelişen inflamatuvar süreç ve sonuçları (64)	20
Şekil 4. İnflamatuvar kaskad ve sonuçları (66).....	21
Şekil 5. Apoptotik hücre ölüm kaskadı (49)	22
Şekil 6. TRP Kanallarının hücre zarındaki yerleşimi ve geçirgenliği	25
Şekil 7. TRP ailesi	26
Şekil 8. TRPV1 kanalı ligandları	27
Şekil 9. TRPV1 kanalının moleküler yapısı ve agonistleri.....	28
Şekil 10. Curcuminin metabolitlerinin kimyasal yapısı.....	35
Şekil 11. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde sitozolik Ca^{+2} düzeyleri üzerinde curcumin ve TRPV1 kanal blokörü kapsazepinin (CPZ ve 0.1 mM ve 30 dakika inkübasyon) etkileri. Hücrelerin uyarılması TRPV1 kanal aganosti kapsaisin (CAP ve 0.01 mM) ile yapılmıştır.....	45
Şekil 12. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde sitozolik Ca^{+2} düzeyleri üzerinde curcumin ve TRPV1 kanal blokörü kapsazepin (CPZ ve 0.1 mM ve 30 dakika inkübasyon) in etkileri. Hücrelerin uyarılması TRPV1 kanal aganosti kapsaisin (CAP ve 0.01 mM) ile yapılmıştır. $ap < 0.001$ ve $bp < 0.05$ kontrol grubuna kıyasla. $cp < 0.05$ ve	45
Şekil 13. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus apoptozis değerleri üzerinde curcuminin etkileri. $^ap < 0.001$ ve kontrol grubuna kıyasla.....	46
Şekil 14. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus kaspaz 3 aktivitesi üzerinde curcuminin etkileri. $^ap < 0.05$ ve kontrol grubuna kıyasla.....	47
Şekil 15. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus kaspaz 9 aktivitesi üzerinde curcuminin etkileri. $ap < 0.05$ ve kontrol grubuna kıyasla.....	47
Şekil 16. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus ROS düzeyleri üzerinde curcuminin etkileri. $ap < 0.05$ ve kontrol grubuna kıyasla. $bp < 0.05$ ve İskemi grubuna kıyasla.	48
Şekil 17. Hücre içi Ca^{+2} girişi ve endoplazmik retikulum aracılı apoptozis	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. İskemik inmede TOAST sınıflandırması (12,15).....	6
Tablo 2. İskemik inme alt gruplarının standardize sendromik sınıflaması (12,16)	6
Tablo 3. İnme Risk Faktörleri.....	9
Tablo 4. Deney gruplarının sınıflandırılması.....	38

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Deney sırasında uygulanan bilateral kommon karotid arter oklüzyon aşamaları.....	39
Resim 2. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 1	40
Resim 3. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 2	40
Resim 4. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 3	41

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serebrovasküler olay (SVO) nedenli ölümler birçok ülkede halen 3. sırada yer almaktadır. İnmeyle bağlı sakatlıklar ise büyük ekonomik ve sosyal kayıplara neden olmaktadır (1). İnme tedavisindeki gelişmelere rağmen şimdiye kadar bulunmuş etkili bir nöroprotektif ajan yoktur (2). Serebral iskemi, arteriyel kan akımının azalmasına bağlı olarak serebral dokular için gerekli oksijenizasyonun sürdürülememesi durumudur. İskemi sonrasında oluşan reperfüzyon sonucunda, iskemik dokuya ulaşan oksijen serbest oksijen radikallerini (SOR) artırarak paradoks sekonder hasarlara neden olur (3,4). Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde atom veya molekülde elektronlar eşlenik olarak bulunurken hasara neden olmazlar ancak, moleküle bir elektron girmesi yada çıkması onu reaktif hale getirir (5). Yapılan çalışmalar oksidatif stresin iskemi reperfüzyon (I/R) sonrasında oluşan nöronal hasarda önemli bir etken olduğunu göstermiştir. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksinitrit ve hidrojen peroksit I/ R hasarı sonrasında nöronal dokuda saptanan başlıca serbest radikallerdir ve serebral iskemi sonrasında oluşan nöronal kayıpta önemli rol oynamaktadırlar (6). Mitokondri içine doğru olan oksidatif akım sonrasında mitokondri dışı membranı geçirgen hale gelerek sitozolden mitokondriye bax-2 translokasyonu gerçekleşir ve böylece iskemi reperfüzyon hasarı sürecinde hücre ölümünden sorumlu temel mekanizmalardan birisi olan apoptozis meydana gelir (7,8,9).

Oksidatif metabolizma sırasında oluşan SOR hasarının engellenmesinde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) gibi oldukça önemli hücre içi savunucu enzimler rol oynarlar (4). Hücre içi savunma mekanizmalarının eksik veya yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres meydana gelir (10).

Deneyisel çalışmalarda, I/R hasarında antioksidan etkileri olduğu gösterilen ajanlar arasında; melatonin, N-asetil sistein, alfa- lipoik asit, zeaksantin, beta gluklan gibi ajanlar sayılabilir.

Curcumin, bir polifenol olup, bir çok Asya ülkesinde yemeklerde kullanılan *Curcuma longa* rhizome isimli bitkiden elde edilen bir baharat türüdür (11) ve apoptotik süreç üzerine etkisinden dolayı anti-oksidan (12), antiinflamatuvar(13) ve antikanserogenik (14) özellikleri olduğu gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmalar curcuminin serebral I/ R hasarında oksidatif hasarı azalttığını ve nöroprotektif etkileri olduğunu göstermiştir (15).

Bu çalışmada deneysel olarak bilateral kammon karotid arterlerin oklüzyonu (BCCAO) ile oluşturulan global serebral iskemi reperfüzyon modelinde curcuminin oksidatif stres parametrelerine, kalsiyum sinyalizasyonuna, transient reseptör potential- vanilloid 1 (TRPV1) ve hipokampal apoptozis üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Serebrovasküler Hastalıklar

2.1.1. İnsidans

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) inmeyi; serebral işlevlerin hızla gelişen fokal veya global bozukluğuna bağlı olarak klinik bulguların, 24 saat veya daha uzun sürmesi veya ölümle sonuçlanması durumu olarak tanımlar (16).

İnme, ölüme neden olan hastalıklar arasında üçüncü sırada yer almakla birlikte sakatlığa yol açan hastalıklar sıralamasında 1. sıradadır. İnsidans; belirli bir zaman periyodunda, belirli bir zamanda ortaya çıkan yeni inme vakalarını ifade eder. Malgrem ve arkadaşları tarafından belirlenen insidans kriterleri şunlardır; inmenin tanımı iyi yapılmalı, geçici iskemik atak (GİA) dışlanmalı, tüm popülasyon incelenmeli, kayıtlar iyi tutulmalı ve ilk atak vakaları belirlenerek yaşlara göre incelenmelidir (17).

İnme insidansı yaşla birlikte artmaktadır. Yapılan çalışmalarda inme insidansı; 55- 64 yaş arası 1000 kişide 1.7- 3.6, 65-74 yaş arası 1000 kişide 4.9-8.9, 75 yaş ve üzerinde ise 13.5-17.9 kişi olarak belirlenmiştir (18,19). 45 yaş altı inme olguları tüm vakaların %3-5 ini oluşturmakla birlikte tam insidansı belirlemek oldukça zordur. 15-45 yaş arası vakalarda yapılan bir çalışmada inme insidansı 1/10.000 olarak saptanmıştır (20). 55- 64 yaş arası inme riski, kadın cinsiyet ile karşılaştırıldığında erkeklerde 2-3 kat daha fazla iken, bu oran 85 yaşına doğru giderek azalmaktadır (21).

2.1.2. Prevelans

Bir popülasyonda belirli bir zamanda ortaya çıkan eski ve yeni inme vakalarının sayısının, risk altındaki nüfusa bölünmesi sonucunda elde edilen orandır. Bu oran yaşa bağlı artmakla birlikte yaşayabilen hastalara ve inme insidansına göre değişmektedir. Türkiye de bu konuda yapılmış sağlıklı bir çalışma olmamakla

birlikte (22), inme prevalansı Japonya’ da 20/ 1000 iken Batı ülkelerinde bu oran 8/ 1000 olarak belirlenmiştir (23, 24).

İnme tipinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, tüm inmelerin % 80-90 ını iskemik inmeler oluşturmaktadır ve bu inmelerinde % 42 sinde aterosklerozun rolü olduğu belirlenmiştir (25). Kardiyak kökenli inmelerin sıklığı % 22-33 arasında değişirken, laküner enfarkt insidansı %13- 20 arasındadır (26, 27). 1995-1996 yılları arasında Türk Beyin Damar Hastalıkları Derneği öncülüğünde 3100 vakalık bir seride gerçekleştirilen çok merkezli inme çalışmasında, ülkemizde iskemik inme % 72 oranında saptanırken, hemorajik inme %28 olarak saptanmıştır. Ortalama yaş iskemik inmelerde 63 ± 12 iken, hemorajik inmelerde 59 ± 12 ’dir (28).

2.1.3. Serebral Dolaşım

Beyin; iki serebral hemisferin oluşturduğu serebrum, beyin sapı ve serebellumun bir bütünüdür. Serebral hemisferlerin her biri ise derindeki büyük yapılar (bazal gangliyonlar, talamus, assosiasyon yolları ve ventriküler sistem) ve onu saran serebral korteksten oluşur. Serebral korteks frontal, parietal, temporal ve oksipital loblara ayrılır. Serebellum; mezensefalon, pons ve medullayı içeren beyin sapı ile birlikte arka çukurda yer alır. Beynin arteriyel dolaşımı; internal karotid arterler tarafından oluşturulan ön sistem ve vertebral ile baziller arterler tarafından oluşturulan arka sistemle sağlanır. Vertebrobaziler sistem, beyin sapı, serebellum, temporal lobun mediali, oksipital lob ve talamusun bir kısmını beslerken; frontal ve parietal loblar, temporal lobun lateral kısmı, derin serebral yapılar ön sistem tarafından beslenir. Her iki karotid arter birbirine anterior serebral arterlerin arasında yer alan anterior komünikan arter ile bağlanır. Ayrıca her iki karotid arter posterior komünikan arterler aracılığıyla baziler arterin uzantısı olan posterior serebral arterlere de bağlanır (29).

2.1.4. Sınıflandırma

İnmeler; nöroradyolojik, hematolojik, biyokimyasal ve kardiyolojik faktörler dikkate alındığında; serebral iskemi (%60-80), intraserebral hemoraji (%10-15) ve subaraknoid kanama (%3-10) olarak üç temel gruba ayrılır (26).

1993 yılında yayınlanan “Trial of Organization in Acute Stroke Treatment” (TOAST) çalışmasında önerilen kriterler (Tablo 1) inme sınıflandırmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (30). Bunun yanısıra lokalizasyona göre sendromik bir sınıflandırma da kullanılır (Tablo 2).

Tablo 1. İskemik inmede TOAST sınıflandırması (12,15).

1. Geniş arter ateroskleroza (tromboz ve emboli)
2. Kardiyo-embolizm
3. Küçük damar oklüzyonu (laküner infarkt)
4. Diğer belirlenen etyolojiler
5. Sebebi belirlenemeyen etyolojiler

Tablo 2. İskemik inme alt gruplarının standardize sendromik sınıflaması (12,16)

1. Total anterior sirkülasyon infarkt
2. Parsiyel anterior sirkülasyon infarkt
3. Posterior sirkülasyon infarkt
4. Laküner infarkt

İskemik inmeler TOAST sınıflandırmasında 5 ana grupta toplanır:

1- *Geniş Arter Ateroskleroza (Tromboz ve Emboli)*: Tüm iskemik inmelerin %50'si geniş arter sklerozuna bağlıdır. Özellikle ekstrakraniyal ve daha nadir olarak intrakraniyal damarlarda ve bu damarların sıklıkla bifurkasyon bölgelerinde, seneler içerisinde oluşan aterom plaklarının stabilitelerinin bozulmasıyla oluşan trombozların neden olduğu inmelerdir. Oluşan aterotrombotik lezyon damarın stenozuna veya oklüzyonuna yol açarak hemodinamik mekanizmalarla borderline adı verilen sınır alanlarda infarktlara da neden olabilirler. Bu patolojik süreçte proksimal arterin %70-80 ve üzerindeki darlıkları söz konusudur. Bununla birlikte, kolesterol ve trombosit gibi parçacıklar aterotrombotik plaktan koparak arterden artere emboli yoluyla distal arterleri oklüde edebilirler. Geniş arter ateroskleroza bağlı inmelerde, hikayede sıklıkla intermittant kladikasyon ve süresi 15 dakika ile 1 saat arasında değişen geçici iskemik ataklar vardır (26,27).

Klinik olarak serebral kortikal disfonksiyon (örneğin apraksi, afazi, anopi ve ihmal) yada serebeller bozukluk görülebilir (26). Muayene sırasında distal nabızların zayıflaması yada alınamaması ve karotis üzerinde duyulan üfürüm ayırıcı tanıda oldukça önemlidir. Ekstremitelerde güçsüzlük başlıca nörolojik defisiti oluşturmakla birlikte, özellikle arterden artere emboli olgularında fokal kortikal bulgular ortaya çıkar (26,27).

Tanısal çalışmalar ile potansiyel kardiyak kökenli emboli kaynağı dışlanmalıdır. Radyolojik olarak; ultrasonografik yada anjiyografik ipsilateral intrakraniyal veya ekstrakraniyal vasküler yapılarda %50 ve üzerinde stenoz veya ülsere plaklar gösterilmelidir. Aynı zamanda bilgisayarlı beyin tomografisi (BBT) yada manyetik rezonans (MRI) görüntülemeye saptanan infarkt çapı 1,5 cm'den büyük olmalıdır (31).

2- Kardiyοembolizm: Tüm iskemik inmelerin %20'sini oluşturur. Arteryel tıkanıklığın nedeni kalp kaynaklı embolidir. Bazen bilinç bozukluğunun eşlik ettiği ani gelişen inmeler başlıca klinik özellikleri oluşturur. İlerleyen saatlerde nörolojik defisit bazı olgularda hızla düzelebilir. İnme ile birlikte epileptik nöbetler görülebilir. (26,27). Kardiyοembolizme neden olan başlıca kardiyak patolojiler arasında; hasta sinüs sendromu, yakın zamanda geçirilmiş miyokard infarktüsü, kardiyak trombüs, atriyal fibrilasyon ile (AF) birlikte ya da tek başına romatizmal mitral kapak hastalığı, non valvüler AF, valvüler vejetasyon, prostetik aort ve mitral kapak, sol ventrikülde akinetik/ hipokinetik alan, atriyal miksuma, dilate kardiyomiyopati, parodoksal emboli gibi patolojiler sayılabilir (31).

Beyin BT ve MRI'de, bir arter sulama alanına uyan geniş kortikal infarktlar saptanmakla birlikte, birden çok vasküler alanda çok sayıda lezyonun varlığı yada sistemik embolizm bulguları ayırıcı tanıda yol gösterici parametrelerdir (26). Ultrasonografide yada anjiyografide, proksimal geniş arterde %50 ve üzerinde darlık ya da ülsere plaklar olmamalıdır (31).

3- Küçük Damar Oklüzyonu (Laküner İnfarktılar): Tüm iskemik inmelerin %25'ini oluşturan bu inme tipi genellikle yaşlı, hipertansiyonu (HT) ve diabetes mellitusu (DM) olan hastalarda görülür. Saf motor, saf sensoriyel, sensorimotor inme ve ataksik hemiparezi vb başlıca klinik özellikleri oluştururlar. Nöroradyolojik

olarak 1.5 cm den küçük, derin bölgelerde yerleşen infarktların gösterilmesi ile tanı konulur (17,28). Tanı koyarken kardiyak kökenli emboliler ve geniş arter oklüzyonları dışlanmalıdır (26,27,31)

4- *Diğer Belirlenen Etiyolojiler:* Bu grupta santral sinir sisteminin (SSS) primer ve sekonder vaskülitleri, CADASIL ve serebral amiloid anjiopati gibi nadir görülen küçük damar hastalıkları, konjenital vasküler bozukluklar, mitokondriyal hastalıklar, travma ve diseksiyon ile hematolojik hastalıklar yer alır ve tüm iskemik inmelerin %5'inden daha azını teşkil ederler. Detaylı hematolojik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik testler ile birlikte anjiyografi ve bazen gerekli görülmesi halinde leptomeningeal biyopsi gibi yöntemlerle tanı konulur (26,27). Muhtemel kardiyembolizm ve geniş arter aterosklerozu ekarte edilmelidir (26).

5- *Sebebi Belirlenemeyen Etiyolojiler:* Detaylı inceleme yapılmasına rağmen nedeni saptanamayan serebral infarktlar ve yeterli araştırma yapılamayan vakalar bu grup içinde değerlendirilir. Ayrıca yapılan incelemelerde birden fazla etiyolojik neden saptanan vakalar da bu gruba dahil edilmiştir (26,27).

2.1.5. İnme Risk Faktörleri

Koruyucu ve sağaltıcı hekimlik açısından inme risk faktörlerinin saptanması büyük önem taşımaktadır. İnmede risk faktörleri multifaktöriyel bir süreç olmakla birlikte (32) aterogeneizde rol oynayan patolojiler ile büyük ölçüde örtüşmektedir. Değiştirilebilir ve değiştirilemeyen olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır (Tablo3).

Tablo 3. İnme Risk Faktörleri

Değiştirilemeyen Faktörler	Değiştirilebilir Faktörler	
	Kesinleşmiş Faktörler	Kesinleşmemiş/ Yeni Risk Faktörleri
Yaş Cinsiyet İrk, Etnik Köken Hereditör, Ailesel Özellikler	HT Diabetes Mellitus, Hiperinsülinemi, Glikoz İntoleransı Kalp Hastalıkları Hiperkolesterolemi, Hiperlipidemi Geçici İskemik Atak (TİA) Asemptomatik Karotis Stenoza	Aşırı Alkol Kullanımı Obezite Fiziksel İnaktivite Beslenme Alışkanlıkları Hiperhomosisteinemi Oral Kontraseptif Kullanımı İlaç Kullanımı ve Madde Bağımlılığı Migren Fibrinojen Eksikliği Hiperkoagülabilité Enflamasyon (Fibrin oluşumu ve Fibrinoliz, Antikardiyolipin Antikorları)

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri;

a) Yaş: Yaş ilerledikçe inme riskinin arttığı bilinmektedir (26). SVO genel olarak yaşlı nüfusta görülen bir hastalıktır ve olguların %75'i 65 yaş ve üzerindedir. Elli beş yaşından sonraki her 10 yıl için inme oranı ikiye katlanmaktadır (33).

b) Cinsiyet: İnme kadınlara göre erkeklerde daha fazla görülmektedir. Ancak, kadınlarda inme nedenli ölüm hızı daha yüksektir (26,34). Her 10 yaş artışla inme, kadınlarda 1,93 kat artarken erkeklerde 1,66 kat artmaktadır (34).

c) İrk: İnme insidansı, beyazlara oranla zencilerde, Çinlilerde ve Japonlarda daha yüksektir (26).

d) Aile Öyküsü: Aile öyküsünün risk faktörü oluşunda çeşitli etmenler rol oynamaktadır. Bunlar; benzer yaşam tarzları, beslenme alışkanlıkları ve bazı hereditör özellikler olabilir (26).

Değiştirilebilir Risk Faktörleri;

a) Hipertansiyon: Tüm inme tipleri için birincil risk faktörüdür, değişik faktörlerle hemorajik ya da iskemik inmeye neden olmaktadır (26). Hipertansiyon, endotel disfonksiyonuna neden olarak endotelin lipoproteinlere geçirgen hale gelmesini sağlar ve böylece ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunur (35). Hastaların sistolik kan basıncı 160 mmHg, diastolik kan basıncı 90 mmHg üzerinde olduğunda, rölatif inme riskinin 4 kat arttığı düşünülmektedir (34). İnme riski; kan basıncı 130-139/85-89 mmHg olanlarda 1,5 kat artmıştır (36).

b) Diyabetes Mellitus (DM): Diyabet iskemik inme riskini 2-6 kat artırırken İSK riskini değiştirmez (27,37). Diyabeti olan hastalarda, uzun süreli sıkı kan şekeri kontrolünün mikrovasküler komplikasyonlarda azalma sağladığı ancak inme riskinde bir azalma olmadığı saptanmıştır (38). Bir çalışmada, geçici iskemik atak ve vasküler inme risk faktörleri karşılaştırılmış ve diyabet hastalığının inme grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (39).

c) Kalp Hastalıkları: İskemik inmelerin %20 sinin nedeni kardiyak embolilerdir. Özellikle gençlerde kriptojenik inmelerin %40'ında potansiyel bir kardiyak emboli kaynağı vardır. Miyokard infarktüsü (MI), orta yaş üstünde en sık görülen kardiyoemboli nedenidir. İnme gelişme riski MI'den sonraki ilk 2 hafta içinde en yüksek değere ulaşır. İleri yaşlarda ise emboli riskinin en önemli nedeni non valvüler atrial fibrilasyondur (26). Retrospektif çalışmaların meta analizinde 55 yaşın altındaki kriptojenik inmeli hastalarda patent foramen ovale (PFO) prevalansı, nedeni bilinen inmeli hastalara göre 6 kat daha fazla bulunmuştur (40).

d) Hiperlipidemi: Ülkemizde 40 nöroloji merkezinin katıldığı bir çalışmada, 3100 inme vakasının hastane tabanları verileri incelenmiş ve hem hemorajik hem de iskemik inmede hiperkolesteroleminin bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (41). HDL kolesterolün 35 mg/dl altında olması ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörüdür. HDL kolesterol düşüklüğü ile birlikte TG seviyelerinin yüksek olması kardiyovasküler hastalık açısından bir risk faktörüdür (42). Düşük HDL kolesterol düzeylerinin rekürren inme ile ilişkili olduğu SPARCL çalışmasında bildirilmiştir (43).

e) Sigara: Sigara; karbon monoksit düzeylerini artırarak endotel disfonksiyonuna neden olur. Ayrıca fibrinojen seviyesini artırır ve trombosit

aktivasyonuna yol açarak koagülasyona zemin hazırlar. İskemik inme risk faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada, sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde 1,8 kat artmış olarak bulunmuşken, sigara bırakıldıktan 5 yıl sonra bu risk içmeyenlerle aynı düzeye inmektedir (26).

f) Karotis Üfürümü ve Aseptomatik Karotis Stenozu: Stenozun derecesinin artmasıyla inme riski de yükselmektedir (26). %75'in altında darlığı olan aseptomatik hastalarda inme riski %1' den azdır. Ancak %75 ve üzerinde olan darlıklarda bu oran %2 ile 5 arasında değişmektedir. Risk semptomatik yani geçici iskemik atak ve/ veya inme geçiren olgularda ilk yılda % 10 iken takip eden ilk 5 yılda bu oran %30-35 lere kadar yükselmektedir.

g) Geçici İskemik Atak ve Tamamlanmamış İnme: İnmelerin tümü için önemli bir risk faktörüdür (44). İnme riski geçici iskemik atak geçiren hastalarda ortalama %4'tür (43).

Kesinleşmemiş Risk Faktörleri;

a) *Obesite:* Vücut kitle indeksi $>30 \text{ kg/m}^2$ olan hastalarda ve özellikle erkeklerdeki abdominal obezitenin inme riskini 1.75- 2.37 kat artırdığı saptanmıştır (26).

b) *Alkolizm:* Bir alkolik epizodun yada kronik alkol kullanımının özellikle hemorajik inmelerde olmak üzere tüm inmelerde önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (26).

c) *Hiperhomosisteinemi:* Homosistein düzeyi yüksek olan hastaların homosistein düzeyi düşük olan hastalar ile karşılaştırıldığı Framingham çalışmasında; rölatif inme riski oranı, homosistein düzeyi yüksek olan hastalarda 1,82 olarak bulunmuştur (26).

d) *Fiziksel İnaktivite:* Her gün en az 30 dakika yapılan orta düzeydeki bir fiziksel aktivitenin inme riskini azalttığı tespit edilmiştir (45).

e) *Hormon Tedavisi:* Yapılan prospektif ve kontrollü çalışmalarda; oral kontraseptif kullanan hastalarda kullanmayanlara göre iskemik inme riskinin göreceli olarak 5-26 kat arttığı, subaraknoid kanama (SAK) geçirme riskinin ise 3-6 kat arttığı

gösterilmiştir (26). Hormon replasman tedavisi yapılan kadınlarda, aterotrombotik inme riski 2,6 olarak bulunmuştur (26), ancak daha sonra yapılan çalışmalarda bu doğrulanamamıştır (46).

f) Madde Bağımlılığı: Bağımlılık yapıcı madde kullanımının (kokain, eroin, amfetamin gibi) hemorajik ve iskemik inme sıklığını artırdığı bilinmesine rağmen, bu konuda yapılmış geniş ölçekli herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Amfetamin ve psikostimülan ilaçlar vaskülit neden olarak inmeye sebep olurlarken, kokain daha çok hemorajik inmeye neden olur (47). Ve yine kokain inmeye neden olan en sık kullanılan maddedir (31, 48).

g) İnflamasyon: Hücreler arası adezyon moleküllerinin aterosklerozlu bölgede endotel tarafından eksprese edilmesi ve endarterektomi preparatlarında, aktive T lenfositler ve makrofajların bulunması, akut inflamatuvar cevabın, plak destabilizasyonu ve semptomların ortaya çıkışını kolaylaştıran bir etken olduğunu düşündürmektedir. Lökosit sayısı ilk kez miyokard infarktüsü veya iskemik inme için sigaradan ve diğer vasküler risk faktörlerinden bağımsız bir risk faktörü olarak meta analizlerde gösterilmiştir. Nötrofil sayısı özellikle artmış risk ile en ilişkili olanıdır. Yapılan çalışmalarda, özellikle rekürren olaylarda bir hafta öncesinde lökosit sayısında artış olduğu saptanmıştır (32).

h) Fibrinojen Yüksekliği: Karotid arter stenozu ve tekrarlayan inmelerde bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (33).

i) Hiperkoagülabilité: Protein C, protein S, anti-trombin III eksikliği, faktör V Leiden mutasyonu, protrombin 20210 A mutasyonu ve antifosfolipid antikor pozitifliği gibi hiperkoagülabilitéye neden olan trombofililerde daha çok venöz trombozlar görülmekle birlikte iskemik inmelerde ortaya çıkabilir.

2.1.6. Fiziopatoloji

Serebral kan akımının otoregulasyonu, kan basıncı ve kafa içi basınç değişiklikleri karşısında beyin kan akımının kesintisiz, sabit, fizyolojik düzeylerde sürdürülebilmesini sağlar (49). Otoregulasyon sayesinde, ortalama arteriyel basıncın

50- 150 mmHg arasındaki değerlerinde serebral kan akımı oldukça iyi bir şekilde korunmuş olur (26).

Beyin damar tıkanıklıklarında iskemik bölgenin merkezi periferdeki alanlara göre daha fazla etkilenmektedir. İskemik alanda 3 ayrı komponent tanımlanmıştır (50). İskeminin merkezinde yerleşen, geri dönüşümsüz hücre hasarı ve hücre ölümünün meydana geldiği '*kor*' bölgesi, bu bölgenin hemen periferinde bulunan ve reperfüzyonun sağlanması halinde kalıcı hasar gelişmeden kurtarılabilmek özelliğine sahip olan '*penumbra*' ve penumbra'nın dışındaki alan ise '*oligemi*' bölgesi olarak adlandırılır (50). Penumbra ilk defa 1981 yılında Astrump ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir (51).

Penumbra, iskeminin süre ve şiddetine bağlı olarak iskeminin infarkta doğru ilerlediği dinamik bir süreçtir. Penumbra, bir anatomik lokalizasyonu tanımlamaz (52). İskemik bölgedeki dokunun iskemiden nasıl etkileneceği iskeminin süresine ve şiddetine bağlıdır (53). Serebral kan akımının 5 ml/100gr/ dk olduğunda 30 dakika sonra, 10 ml/100gr/dk olduğunda 3 saat, 15 ml/100gr/ dk olduğunda 3.5 saat, 18 ml/100gr/ dk olduğunda ise 4 saatte infarkt gelişmektedir (54).

Genellikle, inme başlangıcından saatler sonra, iskemik penumbra bu progresif olaylardan etkilenir. İskemik beyin bölgelerinde otonöregülasyon mekanizması bozulur ve sonuç olarak penumbradaki kan akımı, sistemik arteriyel basınca ve kan viskozitesine bağımlı hale gelir. Böylece, sistemik arteriyel basınçtaki azalma iskemik bölgenin genişlemesinde önemli bir artışa neden olabilir (26).

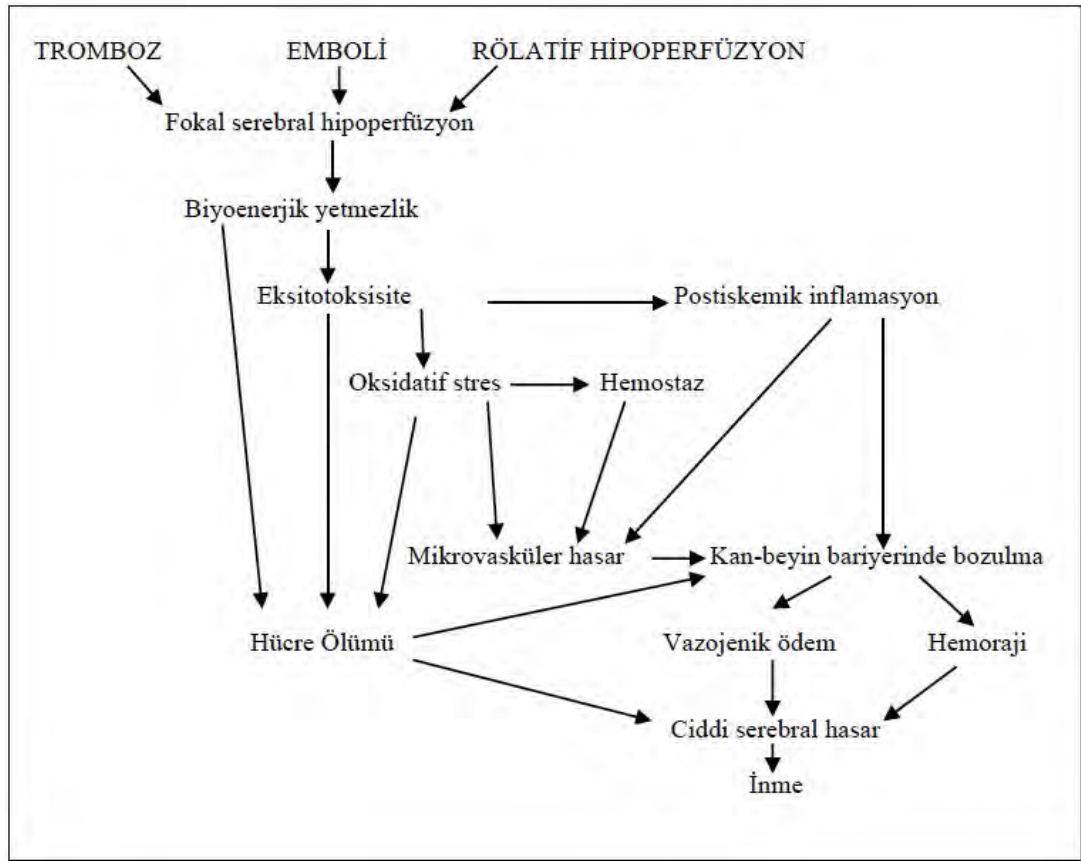
Akut iskemik inmenin nöropatogenezinde fokal hipoperfüzyon, eksitotoksite, oksidatif stres, kan-beyin bariyerinin bozulması, mikrovasküler hasarlanma, hemostaz, post iskemik inflamasyon ve apoptozis yer alır. İskemik kaskad saatlerce veya günlerce devam eder (3).

2.1.7.Nöropatogenezde Rol Alan Mekanizmalar (Şekil 1):

1- Serebral Hipoperfüzyon: Normal şartlarda 50-55 ml/100gr/dk düzeyinde olan serebral kan akımı, nöronların ve diğer serebral hücrelerin fonksiyonlarının kesintisiz olarak devam etmesi için hassas bir regülasyonla sabit tutulur (26).

Kortikal serebral kan akımının global olarak 20 ml/100gr/dk düzeylerine düşmesi bilinç kaybına ve elektroensefalografide dalga frekansında azalmaya neden olur. Ancak hücre ölümü olmadan bir süre daha bu durum tolere edilebilir (49). Kan akımı 18 ml/100gr/dk ya düştüğünde ise iyon homeostazisi tehlikeye girer ve nöronlar anaerobik mekanizmaları kullanarak canlılıklarını sürdürmeye çalışırlar (55). Kan akımı 10 ml/100gr/dk nın altına düştüğünde hücre zarı bütünlüğü tamamen kaybolarak kalsiyum hızla hücre içine geçer ve geri dönüşümsüz hücre hasarı gerçekleşmiş olur (49).

Hipoperfüzyon; tromboz, trombo veya kardiyak emboli, rölatif hipoperfüzyon gibi farklı nedenlerle oluşabilir. Çoğu olguda neden, büyük servikal veya intrakraniyal arterlerin aterotrombozudur. Diğer etyolojiler ise küçük penetran arterlerin tıkanması (laküner inme), arterit, arteryel diseksiyon, değişik genetik ve hematolojik hastalıklardır (3). Tüm infarktların yaklaşık %99'u trombotik ya da embolik olayların sonucunda gelişir ve hemen hepsi arter oklüzyonu sonucunda oluşur. Bazen infarkt lokal vazospazm, bir aterom plağı içine kanama yada bir damarın dıştan basıya uğraması sonucunda oluşabilir (30).



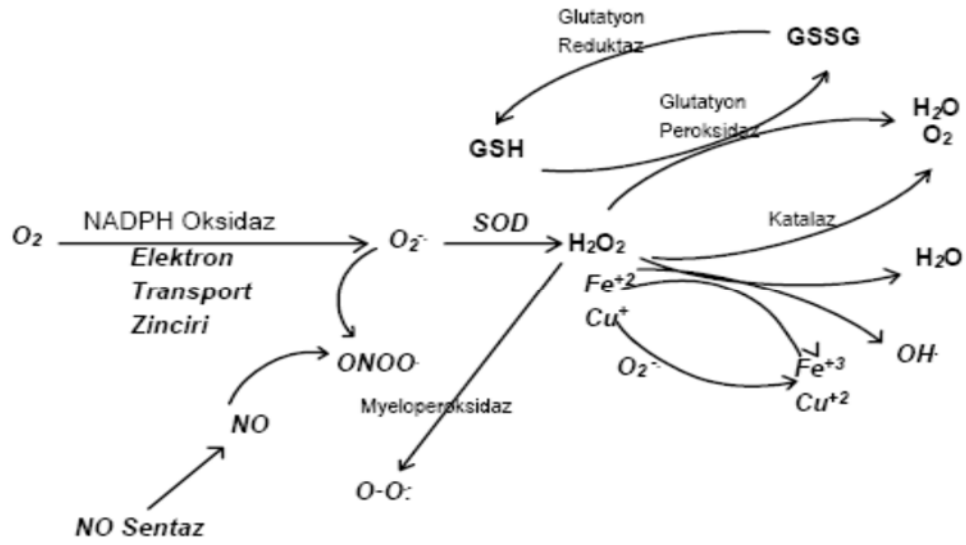
Şekil 1. Nöropatogeneizde rol alan mekanizmalar (3)

2- Hücresel Biyoenerjik Yetmezlik: Lokal hipoperfüzyon sonrasında enerji bağımlı iyon transport pompaları hızla bozulur ve nöronlar depolarize olmaya başlar. Somatodendritik ve presinaptik voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aktive olarak eksitator aminoasitler ekstrasellüler alana geçer. Ayrıca enerji bağımlı presinaptik eksitator aminoasitlerin geri alımının gecikmesi sonucunda ekstrasellüler alanda glutamat düzeyi artar (3). Fizyolojik koşullarda hücreler fazla Ca^{+2} u atarak hücre içi Ca^{+2} artışını tolere ederler. Ancak enerji azlığı durumlarında, pompa ve sekestrasyon mekanizmaları çalışamaz hale gelir ve hücre içinde biriken Ca^{+2} seviyesindeki ani artışlar lipazları, proteazları, endonükleazları aktive ederek serbest radikal oluşumuna neden olurlar ve nöronal ölümü tetikleyebilirler (52). Proteolitik enzimler plazma zarının ve hücre iskeletinin yıkılmasına neden olurlar. İmmun sistem hücrelerin aktivasyonunu takiben hücre içinde artan kalsiyum, fosfolipaz A2 yi aktive ederek araşidonik asit kaskadını başlatmış olur (49). Bu döngüde araşidonik asit siklooksijenaz yolu ile tromboksan A2 ve prostoglandinlere metabolize olurken,

lipooksijenaz yolu ile lökotrienlere metabolize olur (49). Süreç serbest radikal ve lipid hidroksiperoksidlerin yapımıyla kısır bir döngü içine girer ve bu sayede nöron ölümü gerçekleşir (56).

3- Eksitotoksisite: Glutamat ve aspartat majör eksitatör aminoasitler olmakla birlikte santral sinir sisteminin primer eksitatör nörotransmitteri glutamattır. Watkin's ve arkadaşları farmakolojik ve elektrofizyolojik metodlar kullanarak spesifik glutamat agonistleri olan 3 farklı reseptör alt tipi olduğunu bulmuşlardır. Bunlar; N-metil-D-aspartat (NMDA), amino-3-hidroksi-5-metiloksazol-4-propiyonik asit (AMPA) ve kainik asite duyarlıdır (49). Genel olarak, eksitotoksik hücre ölümü akut ve gecikmiş olmak üzere ikiye ayrılır. Buna göre akut eksitotoksisite, dakikalar veya saatler içerisinde oluşan ve hücrenin sodyum, klor ve su alarak şişmesi sonucunda lizisin gerçekleştiği bir süreçtir. Gecikmiş eksitotoksisite ise; kalsiyum bağımlı NMDA reseptörü aracılığıyla hücrenin 16-24 saat içinde ölüme gitmesi olarak tanımlanır. Eksitotoksinlere maruz kalan mitokondriye büyük oranda kalsiyum geçişi olur ve bu geçişin enerji eksikliği, sitokrom c salınımı ve artmış süperoksit salınımı aracılığı ile hücre ölümünü tetikleyebileceği düşünülmektedir (57).

4- Oksidatif Stres: Serbest radikaller normal fizyolojik koşullarda da rol oynarlar. Bir çok hücrel enzim ve taşıma sisteminde sınırlı miktarda ara ürün olarak oluşan serbest radikaller, fizyolojik koşullarda biyolojik korunma mekanizmaları ile ortamdan uzaklaştırılırlar; SOD, GSH-Px ve KAT gibi enzimlerle zararsız hale getirilebilirler (52).



Şekil 2. Serbest radikallerin oluşumu ve detoksifikasyonu (58)

Endojen hücresel antioksidan mekanizmaların aşıldığı durumlarda oksidatif stres meydana gelir (52). Serbest radikaller serebral kan akımını etkileyerek NO ile süperoksitin etkileşmesi sonucunda CO_2 'ye olan vasküler yanıtın gecikmesine neden olurlar ve vazodilatasyon oluşmaz. Aksine vazokonstriksiyon yaparlar. Buna ilaveten platelet agregasyonunu arttırırlar (2). Post iskemik dokularda major serbest oksijen radikalleri kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Bu enzim, reperfüzyon sonrasında moleküler oksijeni kullanarak hipoksantini ksantine çevirir (59).

Başlıca serbest oksijen radikalleri süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir.

Superoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$): Oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur (60) (Şekil 2). Süperoksit radikali, hidrojen peroksit oluşumunda primer radikaldir (3).

Süperoksit radikali kendisi direkt olarak fazla zarar vermeyen bir serbest radikaldir. Asıl önemli olmasının nedeni, hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (58). Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit zayıf reaktiflerdir ve dokularda direkt hasar oluşturmazlar. Demir gibi maddelerin varlığında daha güçlü reaktiflere dönüşerek hücre hasarını arttırırlar (59).

Hidrojen peroksit Radikali: Süperoksit dismutaz serbest radikal hasarına karşı koruyucu bir enzimdir ve oksidan hasar ile birlikte artan sğperoksit SOD sayesinde hidrojen peroksit indirgenir (60). (Şekil 2). Süperoksit radikali üretildiği bölgelerde kalırken hidrojen peroksit aksine membranları geçerek sitozole diffüze olur ve uzun ömürlü bir oksidandır. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikaline yıkılabilir. Hidrojen peroksit aynı zamanda serbest demir ile de reaksiyona girebilme potansiyeline sahiptir. Bu reaksiyonun sonucunda demir okside olurken hidroksil radikali ortaya çıkar (58).

Hidroksil (OH) Radikali: hidroksil bilinen en reaktif radikaldır. Geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksit toksik hidroksil radikaline dönüşür (58) (Şekil 2).

Yüksek toksik peroksinitritin (ONOO^-) NO ve süperoksitten oluşumu önemlidir (3) (Şekil 2). NO bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranarak lipid peroksidasyonunu engeller. Bununla birlikte süperoksit düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksit ile reaksiyona girerek prooksidan bir madde olan peroksinitriti oluşturur (58). NO' e bağlı hücre ölümünden sorumlu temel mekanizma, NO' in süperoksit anyonu ile reaksiyona girmesiyle oluşan peroksinitrit anyonu olabilir (52).

Serbest oksijen radikallerinin intrasellüler depolardan Ca^{+2} salınımını artırarak proteinlerin denatürasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olması sonucunda hücre iskeleti ve DNA'da hasar meydana gelir (3).

5- Kan Beyin Bariyerinin (KBB) Bozulması: Serebral arterlerde kan akımı kesildiğinde mikrodamarlar etkilenerek KBB de hasarlanma başlar (49). İskemide; mikrodamarlarda geçirgenlik bozulur, mikrovasküler endotelden adezyon molekülleri oluşmaya başlar, zamanla bazal membran ve ekstrasellüler matriks bileşenleri kaybolur ve hücre matriks adezyonu bozulur (61). Reperfüzyon ile birlikte olan iskemide nöron hasarı tek başına olan iskemiden daha fazladır. Burada belirleyici etmen iskeminin şiddeti ve süresidir. Deneysel hayvan modellerinde 2-3 saatlik iskemiye takiben reperfüzyon gerçekleştirilen ratlarda reperfüzyon gerçekleştirilmeyen ratlara göre daha fazla hasar olduğu gösterilmiştir. Bu hasar '*reperfüzyon hasarı*' olarak adlandırılmaktadır (49). Bu olay trombolitik tedavi kullanımında belirgin kısıtlamalara yol açar. Gecikmiş reperfüzyon, iskele ile oluşan

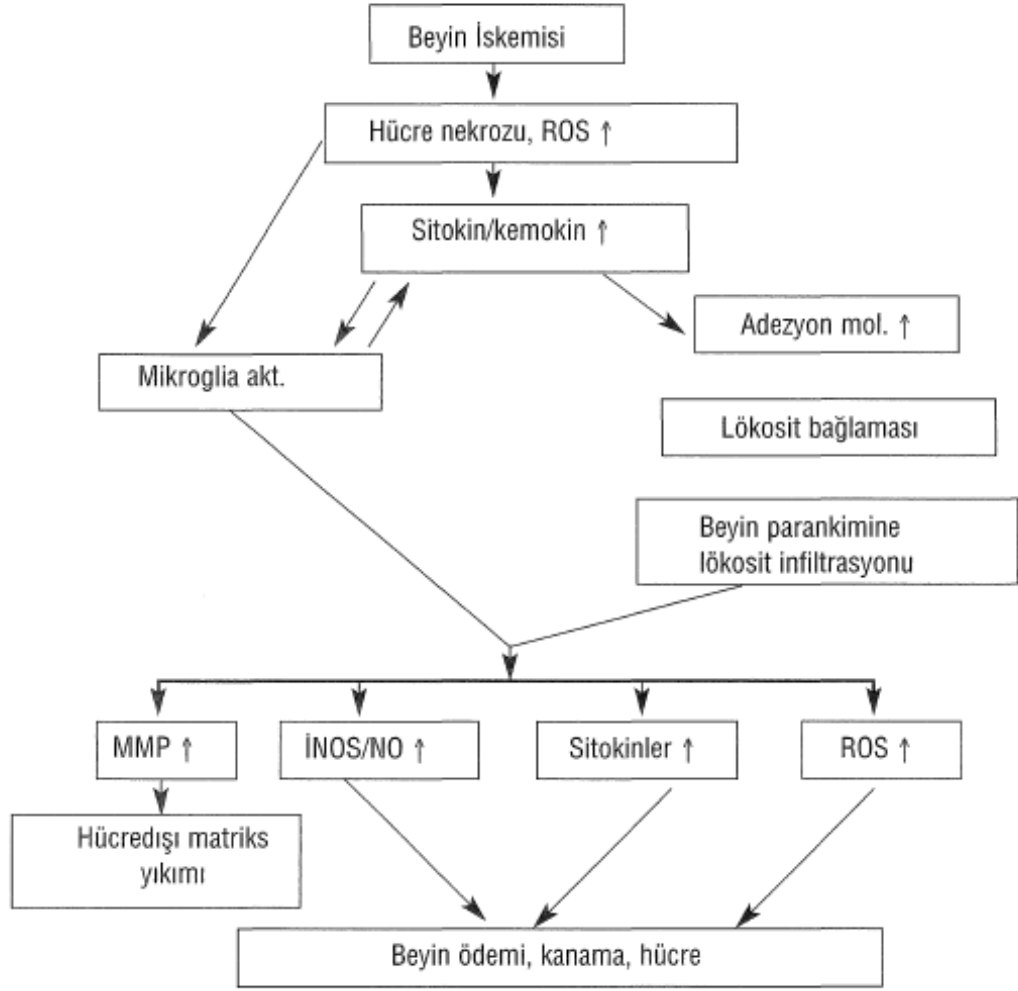
arter duvarı ve nörondaki hasarların daha da artmasına neden olur (62). Bu olayın patofizyolojisinde KBB nin bozulması önemli rol oynamaktadır. KBB yıkımındaki esas faktörlerin serebral iskemi ve reperfüzyon sonrasında ortaya çıkan nitroz oksit ve süperoksitin reaksiyona girmesiyle oluşan peroksinitritin olduğu gösterilmiştir (52).

6- İskeminin İndüklediği Mikrovasküler Hasar: Akut iskemide, endotel hasarı sonucunda serebral otonöregülasyon bozulur. Endotel hasarı sonucunda, nitroz oksit ve prostosiklin salınımı azalırken endotelin1 üretimi artar. Böylece vasküler tonus artarak infarkt alanına olan kollateral kan akımı azalır. Bu sayede iskemik hasarlanma daha da artar. Vazokonstriksiyonun ve otonöregülasyonun bozulması penumbranın kan basıncı değişikliklerinden korunamamasına neden olur.

7- Hemostazın Aktivasyonu: Endotel hasarı sonucunda doku faktörleri kan dolaşımına geçer. Vasküler tıkanmadan 2 saat sonra aktive plateletler mikro damarlarda birikirler. Trombositlerden salınan tromboksan A₂ vazospazma neden olur ve lökosit migrasyonu ile de inflamasyon şiddetlenir (3).

8- İskemi Sonrası İnflamasyon: Her hasarlanmada olduğu gibi serebral iskemi ve reperfüzyon sonrasında da nöronal harabiyete neden olan inflamatuvar yanıt ortaya çıkar. Nöronlar, astrositler, mikroglia ve hepsinden önemlisi endotel hücreleri iskemiyeye yanıt olarak sitokinler salgırlar (63).

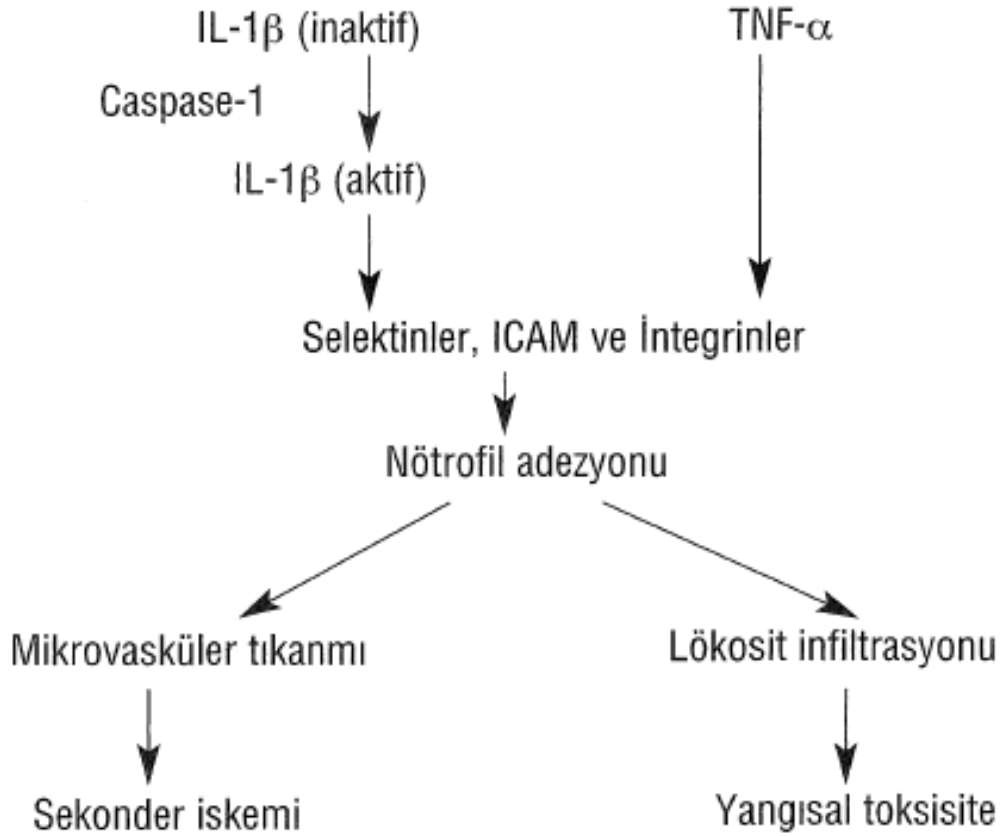
İlk olarak mikroglia ve astrositler reaktif oksijen ürünleriyle temas sonrası aktif hale gelirler. Astrositler; sitokin, kemokin ve indüklenabilen nitroz oksit semtetaz (iNOS) salgılayarak inflamasyonu artırır. İskemiden 4–6 saat sonra damar duvarına lökosit migrasyonu başlar ve daha fazla proinflamatuvar mediatör salınarak penumbranın sekonder hasarlanması gerçekleşmiş olur.



Şekil 3. Serebral iskemiyi takiben gelişen inflammatuar süreç ve sonuçları (64)

İskemik beyin hücrelerinde, inflamasyonla ilişkili en çok çalışılmış sitokinler TNF α , IL1, IL6 ve IL10 dur (3). Bu sitokinler ateş, C-reaktif protein (CRP) ve fibrinojen gibi akut faz reaktanlarının artışı, lökosit agregasyonu ve hücre adezyon moleküllerinin salınımında önemli rol oynarlar (63). Proinflammatuar sitokin artışı ve antiinflammatuar özellikte olan IL 10 düzeyindeki azalma daha büyük infarkt ve daha kötü klinik ile ilişkili bulunmuştur (3). İnflammatuar sitokinler özellikle IL6 ve TNF- α ile birlikte hücre adezyon molekülleri erken nörolojik kötüleşme ve infarkt hacminde büyümeyle ilişkilidir. Hemorajik transformasyon gelişiminde matriks metaloproteinazlar (MMP) önemli rol oynarlar. Özellikle yüksek MMP-9 düzeyleri ile hemorajik transformasyon riski arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir

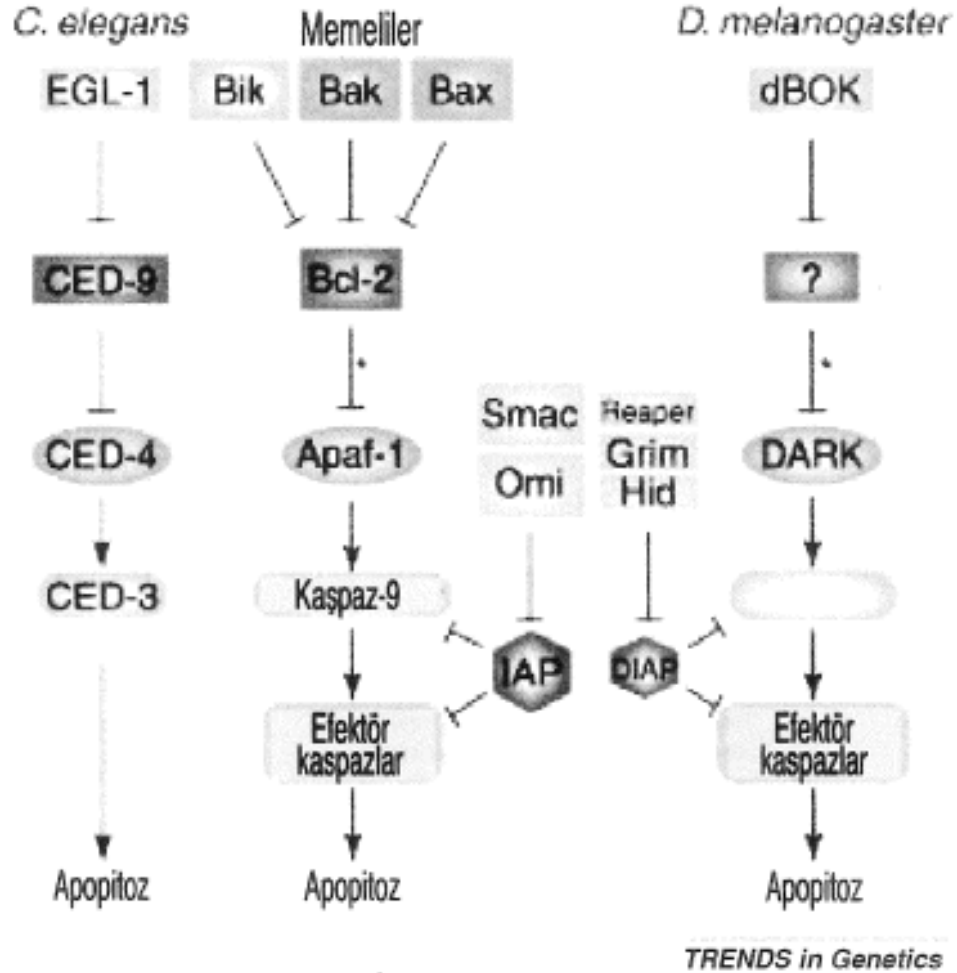
(63). MMP-9 ile endotel duvara yapısal destek sağlayan vasküler bazal laminanın yıkılması, iskeminin 2-6. saatinde başlayıp reperfüzyonun 24. saatinde en yüksek düzeyine ulaşır (65).



Şekil 4. İnflamatuar kaskad ve sonuçları (66)

9- *İskemiyle İndüklenen Apoptozis:* Fokal iskemi oluştuğunda bazı hücreler eksitotoksik şişme, osmotik parçalanma ve nekrozla hızla ölürken bazıları da apoptotik mekanizmalarla yavaş yavaş ölmektedir. Bazı hücrelerde ise özellikle apoptoz ve nekroz birlikte gözlenmektedir. Çok kısa süreli (10-20 dk) iskemiden sonra dokuya kan sağlandığında, nöronlar canlılıklarını başlangıçta kazansalar da yaklaşık 3 gün içinde yavaş yavaş ölürler. Bu durum '*gecikmiş hücre ölümü*' olarak adlandırılır (52). Gecikmiş hücre ölümü, hücre içine NMDA reseptörleri ile aşırı Ca^{+2} girişi sonucu gerçekleşir. Fosfolipaz A₂, kalpain gibi Ca^{+2} bağımlı enzimlerin

aktivasyonu ve serbest radikal oluşumu gecikmiş hücre ölümüne yol açar (52).



Şekil 5. Apoptotik hücre ölüm kaskadı (49)

2.1.8. İskemi Reperfüzyon Hasarı

Yapılan çalışmalar beyinde iskemik hasarın 10 dakika gibi kısa bir sürede oluştuğunu ve reperfüzyon hasarı için 15 dakikalık bir sürenin yeterli olduğunu göstermiştir (67). Kan akımının hızla sağlanması, penumbra alanının hızla kurtarılmasını sağlayabilirse de bu durum paradoks olarak hasarı arttırabilir. Reperfüzyon hasarı multifaktöriyel etiolojiye sahiptir (3). Bu etiolojiler arasında 4 temel mekanizma iyi bilinmektedir. Bunlar; hidrostatik hasarlanma, immun sistem ve

platelet kaynaklı mediatörlere bağlı zedelenme, peroksinitrit oluşumu ve eksitotoksitedir.

a) Hidrostatik Zararlanma: İskemi nöral dokular ile birlikte yapısal bütünlük ve direnci bozarak reaktif vasküler yatağın da hasarlanmasına neden olur. Reperfüzyonla birlikte artan intravasküler basınç vazokonstriksiyon yapılamaması nedeniyle dengelenemez. Bu durum reperfüzyon sonrasında ortaya çıkan intraserebral kanamanın ana sebebini oluşturur (1).

b) İmmün Sistem Hücreleri ve Platelet Kaynaklı Mediatörlere İkincil Hasarlanma: Lökositler; reperfüzyon hasarı, endotel hasarı, küçük damarların tıkanması, KBB'nin bozulması ve inflamasyonda önemli rol oynarlar. Plateletler ise reperfüzyon hasarı esnasında oksidatif stres ürünlerinin açığa çıkmasına katkıda bulunarak inflamasyonun alevlenmesine neden olan biyokimyasal mediyatörleri sentezlerler (3).

c) Nitröz Oksite İkincil Zararlanma: Nitröz oksitin geç ama uzun süreli artışı iskemi sonrası 24-72 saatte ortaya çıkar ve nitröz oksit sentezi ile ilgili 3 temel izoenzim vardır. Bunlar; endotelyal (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenbilir (iNOS) tür. Bunlar arasında inflamatuvar süreç ile ilişkili olan iNOS olup nitröz oksit aracılı hasara katkıda bulunur. Sadece dolaşımdaki astrosit, mikroglia ve lökositler iNOS ekspresyonu yapabilirler (49). Beyinde iskemi sonrasında oluşan NO peroksinitrit oluşmasına katkıda bulunarak DNA hasarına neden olur (68). Peroksinitrit aynı zamanda iskemik beyin dokusunda oluşan kan beyin bariyeri bozukluğunun temel nedenidir (3).

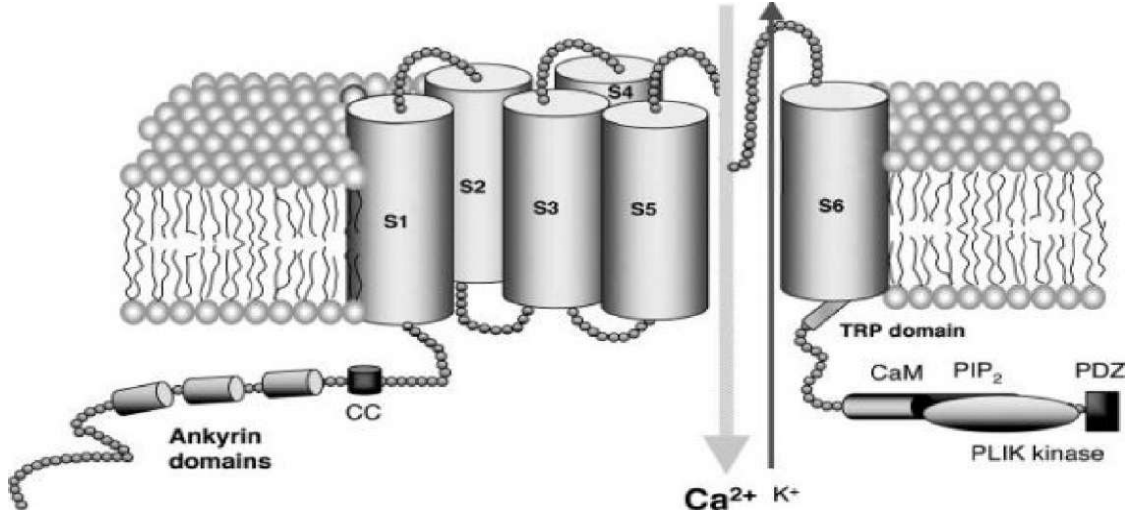
d) Eksitotoksite: Aşırı glutamat salınımına bağlı gelişen eksitotoksite, serebral iskemide en önemli nöron ölüm mekanizmalarındandır (1). Eksitatör nörotransmitter toksisitesi başlıca 2 safhadan oluşur. 'akut şişme ve geç dejenerasyon'. Akut değişiklikler hemen daima nöronun depolarize olmasıyla başlar. Sonuç olarak oluşan elektrokimyasal çekim nedeniyle hücre dışındaki klor hücre içine girer ve bunu iyon dengesinin sürdürülebilmesi için bir katyon (sıklıkla Na⁺)

giriş izler ve süreç hücre şişmesiyle sonuçlanır. Hücre içine aşırı Ca^{+2} girişiyle ikinci faz başlar (56). Glutamat hem NMDA grubu voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarını açık tutarak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun hızla yükseltir, hem de ikincil mesajcılar yoluyla NOS enzimini arttırarak penumbradaki nöronların dejenerasyonuna neden olur (1).

2.2. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanal Ailesi

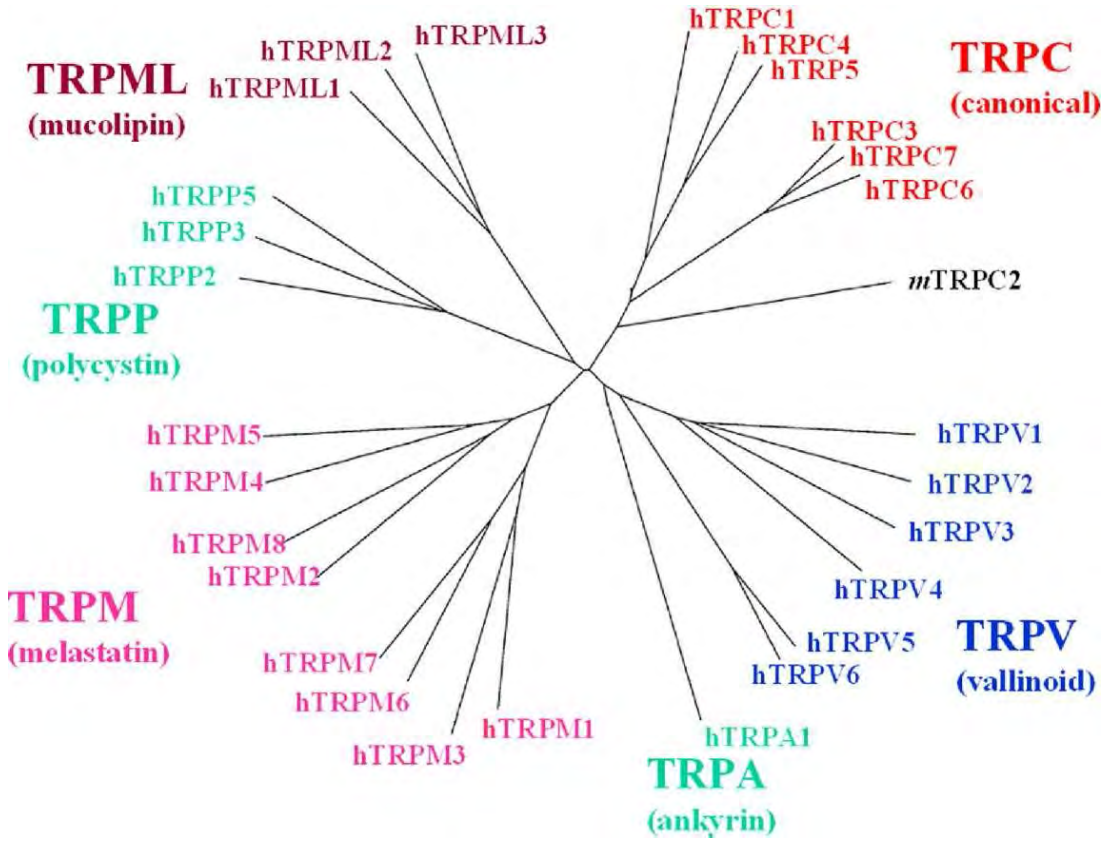
TRP kanal üst ailesi memelilerde bulunan, voltaj bağımlı olmayan, kalsiyum, sodyum ve potasyuma geçirgen, katyon kanallarıdır (69). TRP proteini ilk defa *Drosophila Melanogaster* türü sirke sineği fotoreseptörleri üzerine yapılan araştırmalar sırasında keşfedilmiştir (70, 71). TRP mutant genindeki eksik proteinin, Ca^{+2} iyonunun hücreye başlıca giriş yollarından biri olabileceği sonucuna varılmıştır (72).

TRP kanalları dokunma, duyma, tat alma, görme, termal hassasiyet gibi duyuların algılanmasında çok önemli bir role sahiptir. Genel olarak N-terminal, transmembran bölgesi ve C-terminal olmak üzere 3 ana bölgeden meydana gelmiştir. Tekrarlanan ankrin ve coiled-coil (cc) diye adlandırılan yapılar N-terminal üzerinde bulunurken, TRP homoloji ve enzimatik Nudiks boks segmentleri C-terminal bölgesi üzerinde yer almaktadır. C-terminal bölgesinde enzimatik bir bölge bulunması aynı zamanda kanal vazifesi görmesi nedeniyle ‘chanzyme’ olarak da adlandırılabilirler. İyonların bir taraftan diğerine geçişi, transmembran bölgesindeki beş ve altıncı segmentler arasından gerçekleşmektedir (Şekil 6)



Şekil 6. TRP Kanallarının hücre zarındaki yerleşimi ve geçirgenliği

TRP kanalları insan ve fareler gibi omurgalılar dışında sinek ve solucan gibi hayvanlarda da bulunmaktadır (73). TRP kanalları sekans sınıflandırmasına göre yedi alt aileden oluşmaktadır. Bu alt ailelerden altı tanesi; canonical veya klasik tip olarak adlandırılan (C), vanilloid reseptör (V), melastatin (M), ankrin (A), mukolipin (ML) ve polisistin (P) memelilerde bulunurken sadece omurgasızlarda bulunan ve TRP bölgesi içermeyen TRPN, memelilerde bulunmamaktadır (Şekil 7).

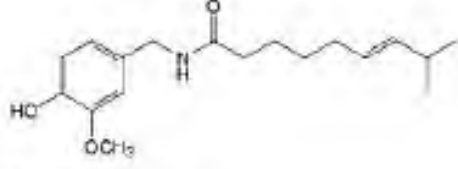


Şekil 7. TRP ailesi

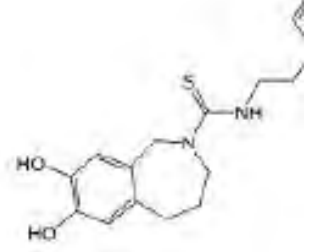
2.2.1. TRPV1

TRPV1, ilk olarak görüntüleme temelli kalsiyum ekspresyon metodu ile ortaya konulmuştur (74). Kapsaisin (acı biber ekstresi), vaniloid bileşikler, asidoz ve sıcaklık (43°C) tarafından aktive edilir. Ayrıca hücre membran depolarizasyonu ile de aktive olabildiği gösterilmiştir (75,76). Anandamid, TRPV1 kanallarının aktivitesini düzenler ve endojen bir CB reseptör agonistidir (77). Ayrıca TRPV1 in, hücre ölümü/ yaşam süresinin belirlenmesinde, nöronal hücre tiplerinin farklılaşmasında, nöral prekürsörlerin proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (78).

TRPV1 channel ligands



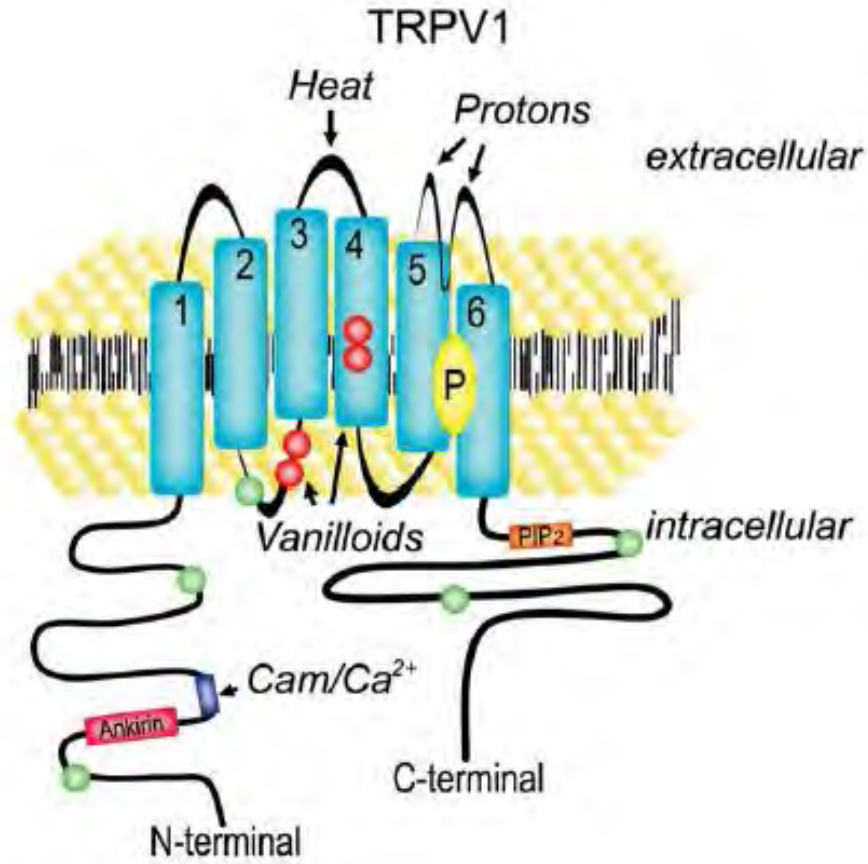
Capsaicin



Capsazepine

Şekil 8. TRPV1 kanalı ligandları

TRPV1, sınırlı kalsiyum selektivitesi olan nonselektif bir katyon kanalı proteindir. Temel olarak tetramerik homomer yapısında olup 6 adet transmembran segmenti içerir (79). Reseptör aktivitesi protein kinaz A, C ve fosfolipaz C gibi çeşitli intrasellüler sinyal proteinleri tarafından module edilir (80). İnflamatuar mediyatörlere ve proinflamatuar sitokinlere (bradikinin, serotonin, histamin vb.) duyarlıdır (81). TRPV1 proteini, ATP bağımlı fosforilasyon ile aktive olurken defosforilasyon ile inaktive olur (82).



Şekil 9. TRPV1 kanalının moleküler yapısı ve agonistleri

2.2.2 TRPV1 Ekspresyonu ve Fonksiyonları :

TRPV1, esas olarak dorsal kök ganglionlarının afferent nosiseptörlerinde, trigeminal ve nervus vagusun kaudal gangliyonu olan nodosa gangliyonunda bulunur ve termal uyarılar ile zararlı kimyasalların saptanmasında önemli rol oynar (83). TRPV1 kanal aktivasyonu, duysal nöronlarda kalsiyumun hücre içine geçişine neden olarak substans P, kalsitonin gen related peptid (CGRP) ve glutamat gibi nöropeptidler ile proinflatuar sitokinlerin geçişini artırır ve böylece periferik sinirlerden santral sinir sistemine ağrı sinyali iletilmiş olur (84). Yapılan çalışmalarda TRPV1 in epitelial hücreler, makrofajlar, mast hücreleri, nötrofil, düz kas hücreleri ve fibroblast gibi nöronal olmayan dokularda da olduğu saptanmıştır (85). TRPV1 , hipokampus ve striatum dahil bir çok beyin bölgesinde önemli fonksiyonlara sahiptir

(86). Çalışmalar, periakvaduktal gri madde gibi ağrı transmisyonunda ve modülasyonunda etkili olan bölgelerde TRPV1 in daha fazla eksprese edildiğini göstermiştir (87). TRPV1, glutamat salınımı kontrol ederek sinaptik transmisyonu yardımcı olur (74). TRPV1 aktivasyonu sonucunda periferde serbest sinir uçlarından (74), santralde ise bazal gangliyonlar, hipotalamus, periakvaduktal gri madde ve hipokampusta glutamat salınımında artış meydana gelir (88,89). GABA erji sistem ise TRPV1 aktivasyonundan etkilenmez (90). Hipokampusta hafıza ve öğrenmede rol oynadığı gösterilmiştir (91).

TRPV1 in sadece fizyolojik olaylarda değil aynı zamanda inflamatuvar barsak hastalıkları (92), migren (93), otoimmün diyabet (94) ve obezite (95) gibi patolojik süreçlerde de arttığı gösterilmiştir.

TRPV1 ekspresyonu büyüme faktörlerinin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak değişir. Özellikle, nöronal büyüme faktörü (NGF) ve glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) dorsal kök gangliyonlarında TRPV1 ekspresyonunun düzenlemesinde önemli rol oynarlar (96).

2.3. Hipokampus

Hipokampus bir gri cevher tabakası olup, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarındandır.

Hipokampusa tüm duyularla ilgili doğrudan yada dolaylı olarak çok sayıda afferent lif gelir. Bu duyular forniks yoluyla hipokampusu terk eder. Miyelinli liflerden meydana gelen forniks; talamus, hipotalamus ve septal sahada sonlanır. Bu da hipokampus ile subkortikal alanlar arasındaki çeşitli devrelerin varlığını gösterir.

Hafıza ve özellikle de kısa süreli hafıza üzerinde rolü olan hipokampusun yokluğunda, verbal veya sembolik anıların saklanması mümkün olmayacaktır.

Yakın hafıza olarak tutulan bilgilerin sağlamlaştırılması uykunun REM safhasında meydana gelir. Bu safhada, hipokampusa işaret eden serotonerjik rafe nukleusları aktiftir. (97). Hipokampus; uzun süreli bir sinaptik ilişki türü olan LTP (long term potentiation) ve iskemiye seçici duyarlılık gibi konularda oldukça dikkat çeken bir

yapıdır. Ayrıca hipokampusun bir diğer özelliği de hipereksitabilitesidir. Örneğin hafif elektriksel uyarılar, hipokampus bölgelerinde uyarı kesildikten sonra saniyeler süren lokal epileptik nöbetlere neden olur. Bu da hipokampusun normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir (98).

2.4. Kaspaz Sistemi

Yapılan çalışmalar, kaspaz adı verilen intrasellüler proteazların apoptosisin gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğunu göstermiştir.

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü sürecinde önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE" olarak türetilmiştir. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rolü olduğu gösterilmiştir (99).

Kaspaz-1, kaspaz ailesinin prototipidir ve önceleri prointerlökin-1-beta'nın biyolojik aktif formuna dönüşümünden sorumlu, ICE (interlökin-1-beta dönüştürücü enzim) olarak da adlandırılan, bir sistein proteaz olarak tanımlanmıştır (100). Memelilerde en az 14 kaspaz tanımlanmıştır. Filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (kaspaz-1) ile ilişkili ve ced-3 benzeri olmak üzere iki subgrubu olduğu görülür. Proenzimlerin kısa (kaspaz 3,6,7) veya uzun prodomain barındırmalarına göre de kaspazları daha alt gruplara ayırmak mümkündür.

Kaspazlar tetrapeptit motiflerini aminoasit spesifitelerine göre tanır ve p4 pozisyonundaki aminoasitlere göre üç spesifik gruba ayrılır. Grup 1 kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 13) P4 pozisyonunda hidrofobik aminoasitleri tanırlar ve sitokinlerin maturasyonuna aracılık ederler. Grup 2 kaspazların yeğledikleri ayırma noktası hücre ölümü sırasındaki pek çok proteinlerde gözlenir ve bununla bağlantılı olarak da grup 2 kaspazlar (kaspaz-2, 3, 7) apoptosisin major efektörleri olarak bilinirler. Grup 3 kaspazlar (kaspaz-6, 8, 9, 10) ise P4 pozisyonunda alifatik aminoasitleri tanır ve grup 2 kaspazların aktivasyonunda görev alır.

2.5. Kalsiyum Sinyalizasyonu

Çevresel koşullardaki ani değişiklikler hücre için stres kaynağıdır. Hücre içi stres kaynakları arasında UV, ısı şoku, radyasyon, ozmotik şok, metaller, oksidatif stres, düşük pH, glukoz eksikliği, ksenobiyotikler, iskemi, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar sayılabilir (101).

Çevresel ve genetik faktörler her canlının yaşam süresini belirler. Hücrelerin, herhangi bir stres ile karşılaştıkları zaman yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli bazı proteinlerin sentezine son verirler ve karşılaştıkları stres ile mücadele edebilecekleri proteinleri sentezlemeye başlarlar (102). Stres ile karşılaşıldığında yeni proteinlerin sentezlenebilmesi için mRNA metabolizmasının yeniden programlanması gerekir.

Translasyonun ertelenmesinde veya sonlandırılmasında birçok protein rol oynar. Bunlardan bir tanesi de stres altındaki hücrede mRNA'ların RNA granülleri formuna çevrilmesi ile proteinlerin translasyonunun ertelenmesi yoludur (103). Çeşitli stresler ile oluşan RNA granülleri 'processing body' (PB) veya stres granülleri (SG) olarak adlandırılır (104). Stres ölümcül değil ise SG geri dönüşümlüdür. Stres ortadan kalktığında translasyon başlar. Fakat stres uzun süreli ve ölümcül ise oluşan SG geri dönüşümsüzdür ve hücre ölümü ile sonuçlanır (105). SG ve PB'ler transkripsiyon, adezyon ve sinyalizasyonda rol oynayan çeşitli proteinleri de içerirler. Bu nedenle SG ve PB'lerin mRNA'nın translasyonu ve bozulumundan başka farklı fonksiyonlarının da olduğu düşünülmektedir (106). Stres altındaki hücrede mRNA'nın sitozolik granüler forma çevrilmesinde ortak bir sinyal molekülü tetikleyici olabilir. Bütün hücrelerde kalsiyum homeostazı çok önemlidir ve hücre plastisitesinden, programlanmış hücre ölümüne kadar çok geniş fonksiyonları düzenler (107,108). Stres ile karşılaşan hücrede kalsiyum düzeyinin yükselmesi ile SG oluşması ve bunun sonucunda translasyonun durması arasında bir ilişki olabilir. Stres uzun süreli ve ölümcül ise kalsiyum düzeyinin çok daha fazla yükselmesi mRNA translasyonunu engellediği için hücre ölümü gerçekleşebilir. Hücrenin yaşamını mikro çevresi etkiler. Hücrenin değişen çevre koşullarına göre mRNA

translasyonunu yeniden düzenlenmesinde kalsiyumun rolü olabilir. Hücrede kalsiyumun metabolizma, gen ekspresyonu, hücre ölümü, transkripsiyon ve proliferasyon gibi çok çeşitli fonksiyonları vardır (109,110). Hücre granülleri ile kalsiyumun hücredeki fonksiyonları arasında paralellik vardır. Bu nedenle hücresel granüllerin oluşmasında sinyal molekül kalsiyum olabilir.

2.6. Serebral İskemide Tedavi

Serebral iskemi tedavisinde anti agregan, anti koagülan, trombolitik, anti ödem ve nöroprotektif tedaviler yer alır (30).

1- Akut İskemik İnmede Antiagregan Tedavi: Akut iskemik inmede üzerinde en çok araştırma yapılmış anti agregan ajan asetil salisilik asit (ASA) tir. Akut iskemik inme olgularında kontrendikasyon yoksa ve intrakraniyal kanama dışlanmış ise bütün hastalara ASA nın rutin başlanması önerilmektedir.. Akut iskemik inme kılavuzları da bu şekilde öneride bulunmaktadır (30).

2- Akut İskemik İnmede Antikoagülan Tedavi: Kay ve arkadaşları tarafından 1995 yılında 308 akut iskemik inmeli hastada yapılan çalışmada, ilk 48 saatte başlanmak şartıyla, rekürren inme riski düşük doz nadroparin (düşük molekül ağırlıklı heparin), yüksek doz nadroparin ve plasebo tedavisi karşılaştırılmıştır. Altıncı ayda elde edilen mortalite sonuçları düşük nadroparin tedavisi alan grupta %45, yüksek nadroparin tedavisi alan grupta %52 ve plasebo alan grupta %65 olarak saptamıştır. Rekürren iskemik inme heparin alan grupta azalmakla birlikte hemorajik inme oranının arttığı saptanmıştır (26,27). Oral warfarin tedavisi diğer bir tedavi seçeneğidir ve dozu, INR 2,5-3 arasında tutulacak şekilde ayarlanır (30).

3- Akut İskemik İnmede Trombolitik Tedavi: İskemik inmede tedavinin temel amacı reperfüzyonun en kısa sürede sağlanmasıdır (111). Trombolitik tedavi, beyin kan akımını yeniden sağlamayı amaçlar. Trombolitik tedavide plazminojen aktivatörleri kullanılır. İnsan ve hayvanlarda trombolitik tedavi amacıyla çeşitli ajanlar kullanılmış olup rtPA (recombinant tissue Plasminogen Activator), streptokinaz, ürokinaz bunlardan en sık kullanılanlarıdır (26,27). En etkin trombolitik ajan olan alteplazinin ilk 3 saatte kullanılması önerilmektedir (112).

İnmenin başladığı süre ile trombolitik tedaviye başlama arasındaki süre uzadıkça tedaviden elde edilen başarı oranı azalır (26). Donanımlı bir hastaneye başvurabilen ve trombolitik tedavisi tamamlanabilen hasta oranı % 5 tir (113). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda plazminin, tromboliz ve kanama açısından plazminojen aktivatörlerinden hemostatik güvenilirlik açısından daha güvenilir olduğu gösterilmiştir. Plazmin trombus içine tromboliz için gerekli dozdan çok daha yüksek dozlarda uygulansa bile tolere edilebilmektedir (114).

4- Nöroprotektif Tedavi: Nöron korumadaki amaç, çeşitli ajanlarla beyinde oluşan zarar verici etkileri en kısa sürede engellemek ve reperfüzyon hasarını en aza indirmektir (30). Akut inmede en önemli tedavi yöntemi reperfüzyonun sağlanması olmakla birlikte buna nöroprotektif tedavinin eklenmesi çok daha faydalı olabilir (30).

2.7. Curcumin (Turmeric)

Turmeric (Curcuma Longa) zencefil ailesinin bir üyesi olup zerdeçal yada hintsafranı olarak ta bilinmektedir. İlk kez Vogel tarafından 1842 yılında izole edilen curcumin, turmericin aktif bileşenidir. Baharatın % 2 ila 5 ini oluşturur ve turmerice karakteristik sarı-turuncu rengini verir. Su içinde neredeyse hiç çözünmeyen curcumin sarı- turuncu renkli kristalimsi bir tozdur. 1910 yılında Lampe ve Milobedeska tarafından yapısında diferiloylmetan olduğu saptanmıştır (117).

Curcuma Longa bitkisinin rizomlarından elde edilen curcumin{1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene- 3,5-dione} (diferuloyl methane) gıda ürünlerinde tatlandırıcı ve renklendirici olarak kullanılmaktadır (118,119).

2.7.1. Curcuminin Kimyasal Özellikleri:

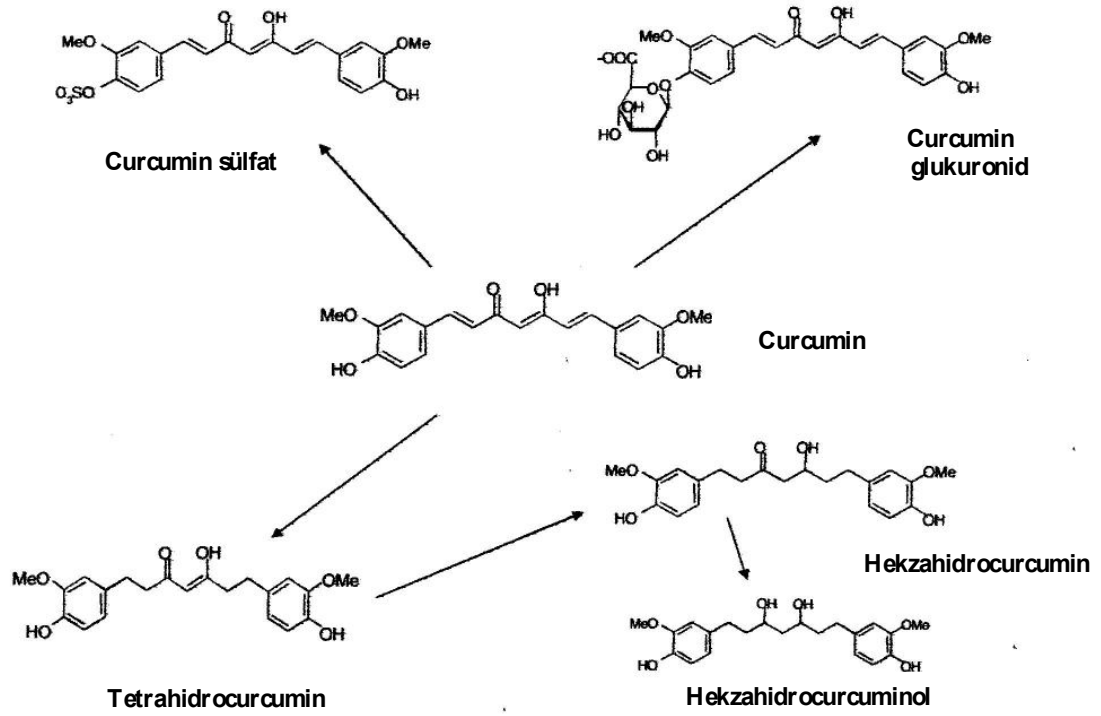
Polifenolik bir bileşik olan curcuminin keto ve enol formu bulunmaktadır. Asidik olan keto formu nötral sıvı solüsyonlarında ve hücre zarında bulunur. pH 3- 7 arasında curcumin güçlü bir hidrojen atomu donörü iken, pH 8 in üzerine çıktığında

enol formu hakimdir ve curcumin bir elektron donörü gibi davranır. Bu özellik curcuminin antioksidan bir bileşik olmasını sağlar ve antioksidan etkisinin tipik bir mekanizmasını oluşturur. Curcuminin rengi pH 7 nin üzerinde sarıdan kırmızıya döner. 368. 37 g/mol molekül ağırlığına ve 183 °C erime ısısına sahiptir. Suda çözünmeyen ancak; aseton, DMSO4 ve etanolde çözünen bir moleküldür (120).

Doğal bir Curcuma Longa bitkisinde % 70-76 curcumin, % 16 demethoksicurcumin ve % 8 bisdemethoksicurcumin olmak üzere 3 temel curcuminoid bulunmaktadır (121). Transformasyonu barsaklarda gerçekleşir ve oldukça polar renksiz transforme ürünler ortaya çıkar (122).

Sıçanlarda yapılan bir çalışma, oral yolla verilen curcuminin %60 ının barsaklardan emildiğini ve idrarda glukuronid ve sülfat konjugatlarının olduğunu göstermiştir. Ayrıca curcumin büyük oranda gayta ile de atılmaktadır.

Curcuminin intraperitoneal olarak verildiği başka bir çalışma ise (0.1 gr/kg), ilk olarak dihidrocurcuminin tetrahydrocurcumine transforme olduğunu ve bunların da hemen monoglukronid konjugasyonuna uğradığını göstermiştir (120). Curcuminin etkin olan biyomolekülünün tetrahydrocurcumin olduğu ve bu molekülün mikrozomal enzimatik reaksiyonlarla metabolik aktivite gösterebileceği öne sürülmüştür (121).



Şekil 10. Curcuminin metabolitlerinin kimyasal yapısı

Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada, artrit, diyabet, nörodejeneratif, kardiyovasküler ve pulmoner hastalıklarda curcuminin teropotik bir ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (123). Apoptotik süreç üzerine olan etkisi nedeniyle antioksidan (12), antiinflamatuvar (13), antikanserogenik (14) özellikleri olduğu gösterilmiştir. Mediyal serebral arter oklüzyonu yapılarak (MCAO) gerçekleştirilen bir çalışmada nükleer faktör eritroid ilişkili faktör2 (Nrf-2) düzeylerini artırarak antioksidan- detoksifikasyon sistemini düzenlediği, böylece infarkt volümünde ve beyin ödeminde azalma sağladığı gösterilmiştir (124).

Bu çalışmada, ratlarda deneysel global serebral I/R modeli oluşturularak curcuminin oksidatif stres parametleri, kalsiyum sinyalizasyonu, hipokampal apoptozis ve TRPV1 kanalları üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL-METOD

3.1. Gereç ve Yöntemler

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Laminer akım kabini Jouan B4I (Fransa)
2. Hassas terazi, Scaltec SPB 32 (İsviçre)
3. Soğutmalı santrifüj, Kubota, (Japonya)
4. Derin dondurucu, Uğur (Türkiye)
5. Inverted floresan mikroskop, Zeiss, Axiovert 40CFL (Almanya)
6. Otomatik pipetler, Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. pH metre, Hanna Instruments (Portekiz)
8. Manyetik karıştırıcı, Nüve (Türkiye)
9. CO₂ İnkübatör, Heal Force, Smart Cell (Japonya)
10. Hücre kültürü flask, Cell Star, Greiner bio-one (Almanya)
11. 96 Kuyucuklu şeffaf mikropate, Greiner Bio-one (Almanya)
12. 96 Kuyucuklu siyah mikropate, Greiner Bio-one (Almanya)
13. Plate reader fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN (Avusturya)
14. Vorteks, Nüve NM 100 (Türkiye)
15. Floresan spektrofotometre: (Cary Eclipse, Varian Firması, Avustralya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)
2. DMSO(Dimethyl Sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)

3. Falcon tüp (15 ml sterile polypropylene cnical bottom Screw cap tup 92159, Biolab, Macaristan)
4. Penicillin Streptomisin
5. RPMI-1640
6. 25 cm²'lik kültür kabı (25, 24cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre)
7. 75 cm² kültür kabı (75 cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre)
8. Penisilin-G (100 U/ml) Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA)
9. RPMI 1640 (Hyclone, USA)
10. Dihydrorhodamine-123 (DHR-123)
11. EGTA, Merck (Almanya)
12. Triton X-100, Sigma (Almanya)
13. Fura-2 AM, Invitrogen (ABD)
14. Caspaz-3 kiti, (AC-DEVD-AMC) Sigma (Almanya)
15. Caspaz-9 kiti, (AC-LEHD-AMC) Bachem (İsviçre)

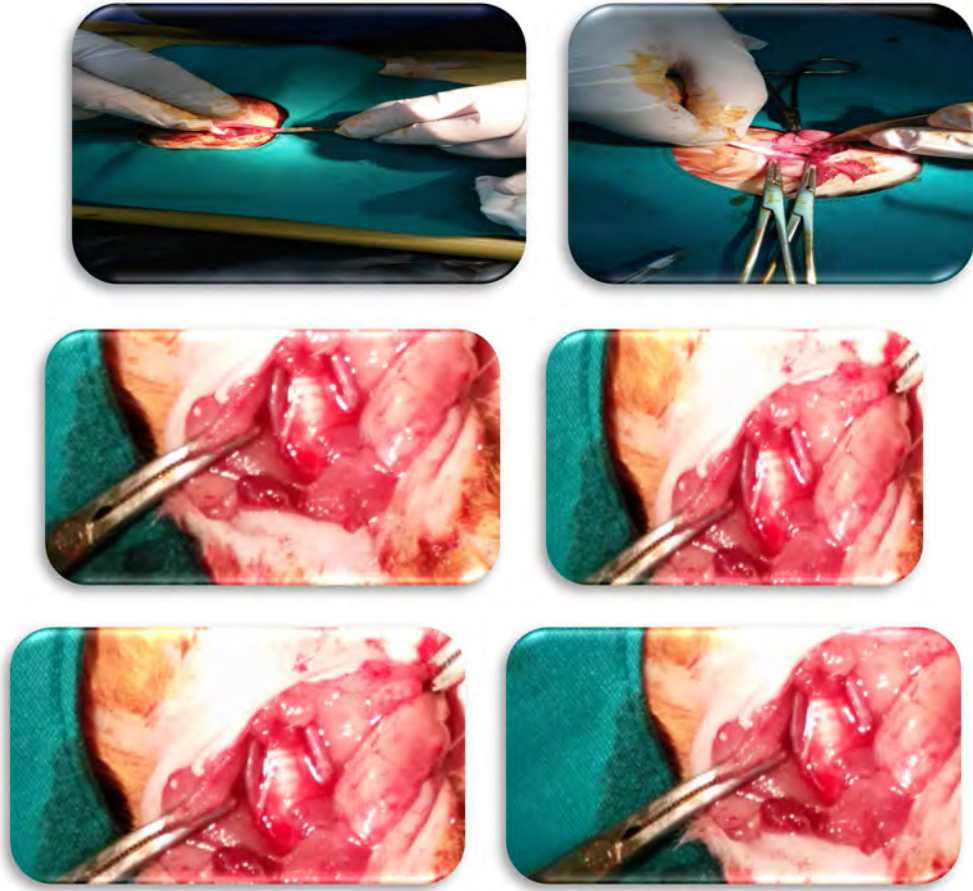
3.1.3. Hayvanlar ve I/R Modeli:

Bu çalışmada Sprague- Dawley cinsi toplam 32 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (23 °C) koşullarında yaşatılmışlardır. Tüm gruplar yeteri kadar su ve yem (Korkutelim Yem, Standart Sıçan Yemi) ile beslenmişlerdir. Sıçanlar tablo 4' de gösterildiği şekilde 3 gruba ayrılmıştır.

Tablo 4. Deney Gruplarının Sınıflandırılması

GRUPLAR	
Grup I (n=8)	Kontrol
Grup II (n=12)	İskemi+ Reperfüzyon
Grup III (n=12)	Curcumin + İskemi + Reperfüzyon

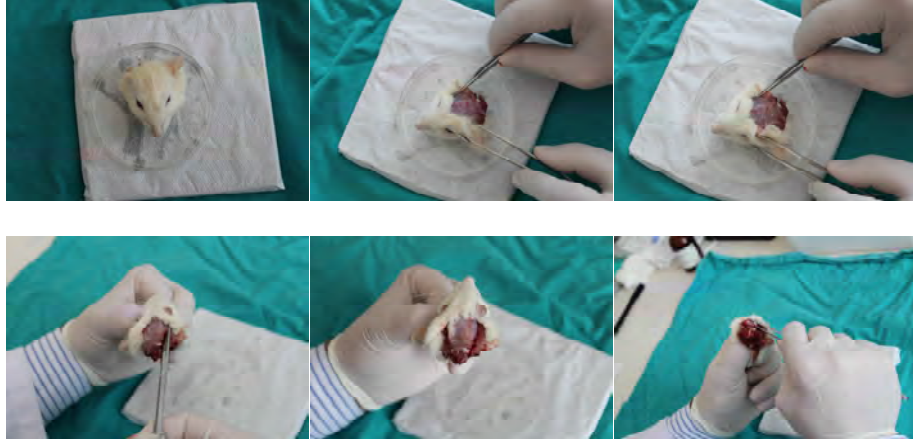
Global serebral iskemi reperfüzyon bazı basit değişiklikler yapılarak modifiye Jingtao metodu uygulanarak gerçekleştirilmiştir (125). Kısaca; sıçanlar, intraperitoneal olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) ve % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında orta hatta boynun ön yüzünde kesi ile trakeaya paralel olarak sternokleidomastoid ve sternohyoid kaslar arasından girilerek her iki kammon karotid arterler (CCA) ortaya çıkarıldı. Her iki CCA; etrafındaki kaslardan, ligamentlerden ve adventisyalardan dikkatli bir şekilde ayrıldı. Nervus vaguslar özenle her iki CCA üzerinden diseke edildi. İlaç uygulanmasından önce, 2. ve 3. gruplardaki sıçanlar bilateral kammon karotid arterler bulldog klempler ile oklude edilerek 20 dakika boyunca iskemiye maruz bırakıldı. İkinci ve üçüncü gruba 20 dakika oklüzyon ile iskemi oluşturulduktan sonra klempler açılarak 48 saat boyunca reperfüzyon uygulandı. Curcumin 50, 100 ve 300 mg dozlarında çözündürülemediği için 3. gruba curcumin 10 mg/kg/gün dozunda, günlük tartılıp DMSO4 te çözündürüldükten sonra her bir sıçana 1 ml hacimde olacak şekilde, reperfüzyon sonrası hemen ve 24 saat sonrasında intraperitoneal yol ile verildi. Eş zamanlı olarak kontrol grubuna 1 ml serum fizyolojik intraperitoneal yol ile 2 doz olarak verildi (Resim 1).



Resim 1. Deney sırasında uygulanan bilateral kommon karotid arter oklüzyon aşamaları.

3.2. Hipokampus Hücrelerinin İzolasyonu

Hipokampus hücreleri ratlara inhalasyon (eter) anestezisi işleminden sonra dekapitasyon işlemini takiben hiç vakit kaybedilmeden kafatası ince uçlu makas aracılığıyla kesildi ve beyin bir bütün halinde 3-5 ml HBSS (Hank's Blanced Salts Solution) solüsyonu içerisine çıkarıldı.



Resim 2. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 1

Pens yardımıyla nazikçe tutularak bistüri yardımıyla serebellum, beyin dokusundan ayrıldı ve beynin frontal lobu uç kısmından sağlı sollu 2 hemisferde küçük parçalar kesildi. Bu işlemi hipokampusu daha kolay ve zarar vermeden çıkartabilmek için yaptık. Sonra her iki serebral hemisferi ayırmak için ortadan sagittal kesit atıldı. Daha sonra buz aküsü üzerine konulan kağıt havlu üzerine HBSS solüsyonu dökülerek (3-4 ml) üzerine her bir hemisfer işlem sırası geldiğinde konuldu ve üzerine tekrar 2-3 ml civarında HBSS solüsyonu döküldü.



Resim 3. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 2

Sonrasında hipokampal bölge 2 adet pens yardımıyla nazik hareketlerle çıkarıldı ve çıkartılan hipokampuslar içerisinde 1ml HBSS bulunan ependorfa yavaşça konularak iki ucu sivri küçük makas yardımıyla olabildiğince küçük parçalara bölününceye kadar parçalama işlemi uygulandı.



Resim 4. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 3

Daha sonra parçalanmış hipokampal dokular 15 ml'lik Falcon tüpüne aktararak son hacim 7 ml oluncaya kadar üzerine 37 °C HBSS ilave edildi ve son hacim 10 ml oluncaya kadar da Tripsin enzimi doku homejenizasyonu sağlamak amacıyla ilave edildi.(3 ml). Yarım saat çalkalamalı su banyosuna her 10 dakikada bir pipetaj yapmak üzere konuldu. Yarım saat geçtikten sonra 3 kez 5'er dakika süreyle santrifüje tabi tutularak süpernatantlar döküldü. Dipte kalan hücreler üzerine 5 ml HBSS eklendi. Homojen bir şekilde pipetaj hareketleriyle karıştırılarak yarısı (2,5 ml) ikinci bir 15 ml hacimli falcon tüpüne konuldu. Bölünen bu 2,5 ml lik tüplerin birisine son konsantrasyon 250 μ M olacak şekilde Hcy konularak yarım saat süreyle inkübatörde (37 °C ve %5 CO₂) HBSS solüsyonu içerisinde bekletildi. Sonra hücreleri yıkamak amacıyla santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatant dökülüp 1XPBS tamponu ile homojen hale getirilerek floresan boyar maddesi Fura-2-AM maddesi ilave edilerek 45 dakika süre ile 37 °C de çalkalamalı su banyosuna konuldu.

3.3. Laboratuvar Analizleri

3.3.1. Hücre İçi Ca^{+2} Ölçülmesi

Yukarıda bahsedilen izolasyon işlemini takiben, boyama işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler 300 μ l Ca^{+2} Buffer [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 1,2; $MgCl_2$, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solusyonu ile sulandırıldı ve floresan (siyah) plate kuyucuklarına hücre yoğunluğu (2×10^6) 3'e bölünecek şekilde ayrıldı (126). Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında fluorezan ışık ile uyarılmış ve kayıt alınmıştır. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi [Ca^{+2}]_i değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedilmiş ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplanmıştır (127). TRPV1 çalışmalarında ise uyarım kapsaisin (0.1 mM) ile yapılırken, açılan kanalın TRPV1 mi olduğunu test etmek için, TRPV1 antagonisti kapsazepin (0.04 mM) kullanılmıştır.



Resim 5. Analizlerin yapıldığı kuyucuk okuyucu (plate reader) cihazı

3.3.2. Apoptozis Analizi

İzole edilen hücreler 150 µl 1xPBS ile sulandırıldı. Sonra her bir ependorfta 50 şer µl olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl PBS konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 3-5µl apoptozis boyasından (10 ml) ilave edildi ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına konuldu. Çalkalama sonrası 3500 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve üstte oluşan süpernatant (üstte oluşan hücresiz sıvı kısım) döküldü. Üzerine tekrar PBS eklendi ve 200µl Apopercantage Release solüsyonundan ilave edildi. Pipetaj yaptıktan sonra süpernatant alındı ve plate kuyucuklarımıza yerleştirerek 550 nm de İnfinite 200 Pro(Avusturya) ELİSA cihazında okundu (128).

3.3.3. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini

İzole edilen hücreler 150 µl PBS ile sulandırıldı. Sonrasında her bir ependorfta 50 şer µl olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl RPMI konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 1µl DHR123 ROS boyasından konuldu ve güzelce pipetaj yapıldı.

Ependorflar 30 dk süreyle inkübatöre konuldu. Süre bitimini takiben 4x100 g devirde 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında oluşan süpernatant dökülerek üzerlerine 300 µl PBS koyup güzelce pipetaj yapıldıktan sonra plate kuyucuklarına (infinite 200 marka, Avusturya) her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde hücreler bölündü. Plate readerda florasanlar 498 nm emisyon ve 522 nm eksitasyon (uyarım) dalga boylarında okunmuştur ve aradaki fark değer olarak belirlenmiştir (129).

3.3.4. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 un buffer ham solüsyonlarından 15 ml lik falkon tüplerine konuldu. Her 2 tampona da 2,5µl NP-40 (+23 °C) kimyasalından ilave edildi, sonrasında vortekste karıştırıp floresan kaspaz DTT boyasından kaspaz 3 ve kaspaz 9 bufferlarının üzerine 10µl ve 2,5µl konulup güzelce vortekste karıştırıldı. İzole edilen hipokampal

hücreler 150 µl 1xPBS solüsyonuyla sulandırıldıktan sonra her bir plate kuyucuğuna 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde konuldu. Üzerine de öncesinde hazırlamış olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50µl konuldu ve sonrasında açığa çıkan enzimler (infinite 200 marka, Avusturya) cihazında 360 nm uyarılma ve 460 nm Emilme dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri değerlendirildi. (AC-DEVD-AMC Kaspaz-3 ve AC-LEHD-AMC Kaspaz-9 için). Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi (128).

3.4. Etik Kurul İzni

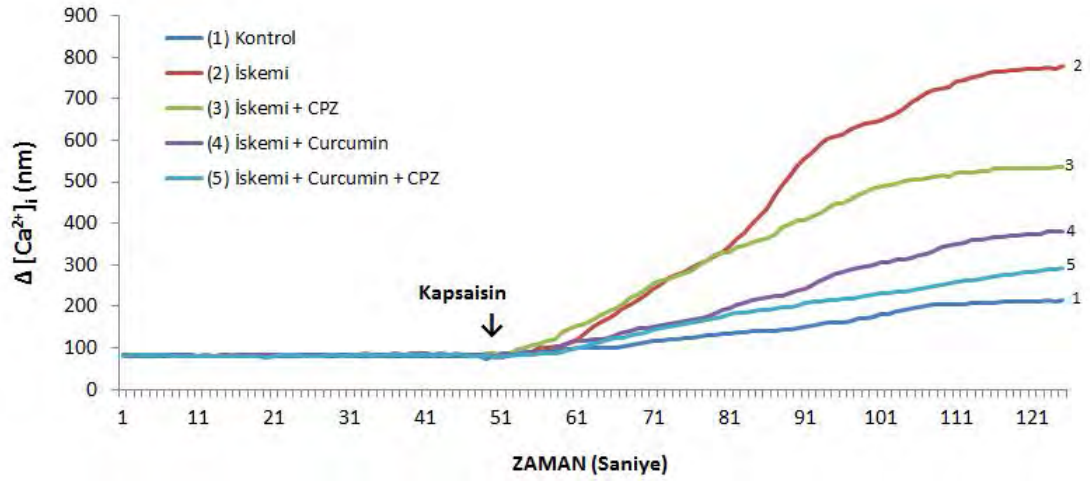
Çalışma protokolü Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (HADYEK) tarafından 27 Mart 2013 tarih ve 01 kararı ile uygun bulunmuştur.

3.5. İstatistiksel Analiz

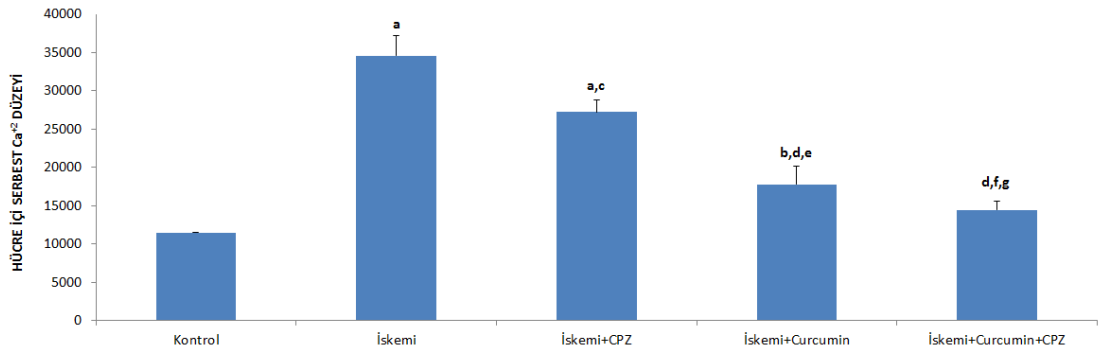
Bütün veriler ortalama $\pm$ standart sapma [mean $\pm$ standard deviation (SD)] olarak verildi. Hipokampus sinir hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 17.0 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus hücre içi serbest kalsiyum iyon ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerinde curcumin ve TRPV1 kanal blokörü kapsazepinin etkileri.



Şekil 11. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde sitozolik Ca^{+2} düzeyleri üzerinde curcumin ve TRPV1 kanal blokörü kapsazepinin (CPZ ve 0.1 mM ve 30 dakika inkübasyon) etkileri. Hücrelerin uyarılması TRPV1 kanal ajanosti kapsaisin (CAP ve 0.01 mM) ile yapılmıştır.

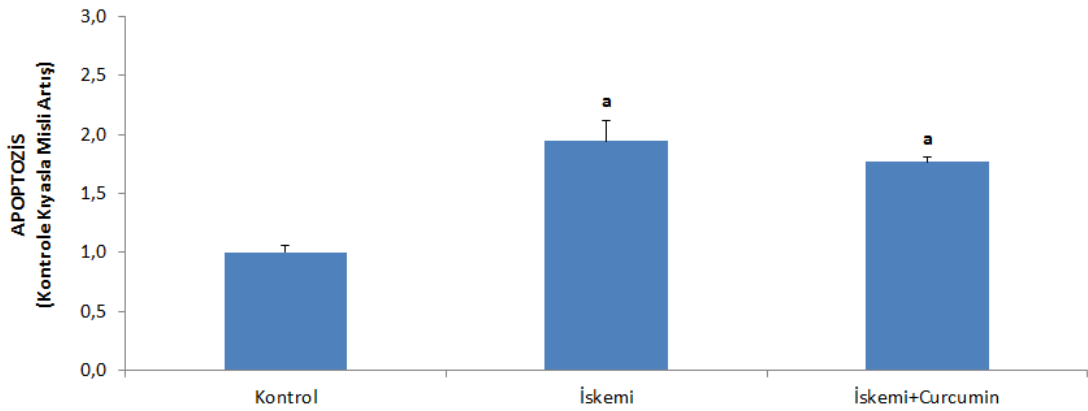


Şekil 12. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde sitozolik Ca^{+2} düzeyleri üzerinde curcumin ve TRPV1 kanal blokörü kapsazepinin (CPZ ve 0.1 mM ve 30 dakika inkübasyon) etkileri. Hücrelerin uyarılması

TRPV1 kanal ajanı kapsaisin (CAP ve 0.01 mM) ile yapılmıştır. $a_p < 0.001$ ve $b_p < 0.05$ kontrol grubuna kıyasla. $c_p < 0.05$ ve $d_p < 0.001$ İskemi grubuna kıyasla. $e_p < 0.05$ ve $f_p < 0.001$ İskemi+CPZ grubuna kıyasla. $g_p < 0.05$ İskemi+Curcumin+CPZ grubuna kıyasla.

Kontrol, serebral iskemi ve serebral iskemi+curcumin gruplarının hücre içi serbest kalsiyum iyon ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri şekil 1 ve 2 de gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla iskemi grubunda $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonları önemli düzeyde ($p < 0.001$) yüksek olduğu gözlenirken, curcumin gruplarda önemli düzeyde düşük bulundu. Ayrıca, TRPV1 kanal blokörü verilen gruplarda da $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonları önemli düzeyde ($p < 0.001$) yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, serebral iskemi de koruyucu etkisini TRPV1 kanalları aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir.

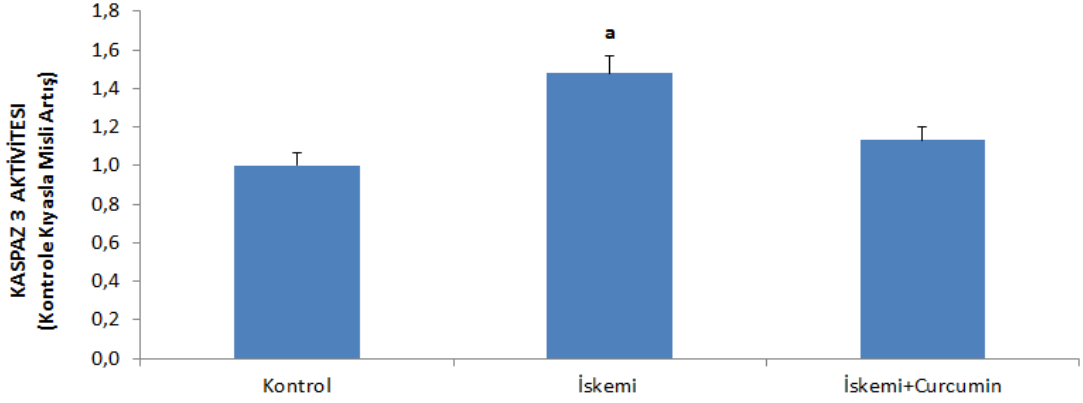
4.2. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus apoptozis düzeyleri üzerinde curcuminin etkileri.



Şekil 13. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus apoptozis değerleri üzerinde curcuminin etkileri. $a_p < 0.001$ ve kontrol grubuna kıyasla.

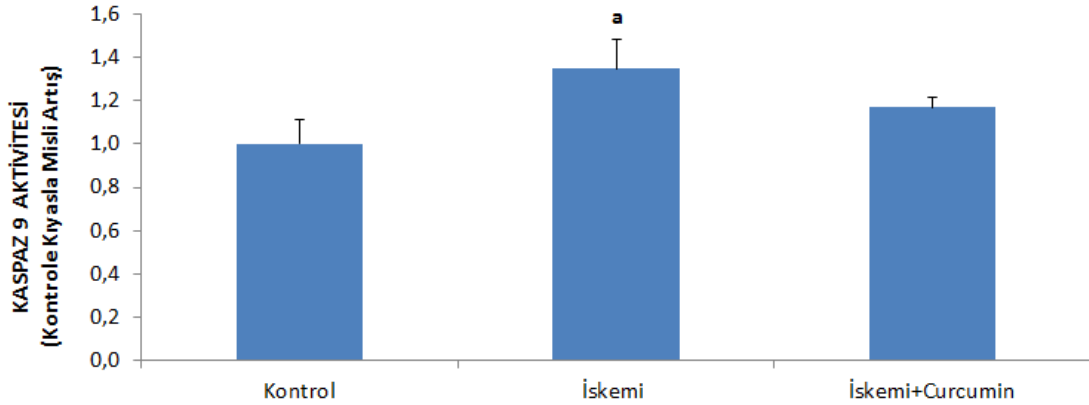
Hücre ölümünün değerlendirildiği apoptozis analizi sonuçlarına göre iskemi+reperfüzyon grubuna göre iskemi+reperfüzyon+curcumin grubunda apoptozisin belirgin olarak düşük olduğu saptanmıştır ve bu sonuç istatistiki olarak oldukça anlamlıdır ($p < 0.001$). Fakat, apoptozis düzeyleri üzerinde curcuminin koruyucu etkisinin olmadığı gözlemlendi.

4.3. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri üzerinde curcuminin etkileri.



şekil 14. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus kaspaz 3 aktivitesi üzerinde curcuminin etkileri. ^a $p < 0.05$ ve kontrol grubuna kıyasla.

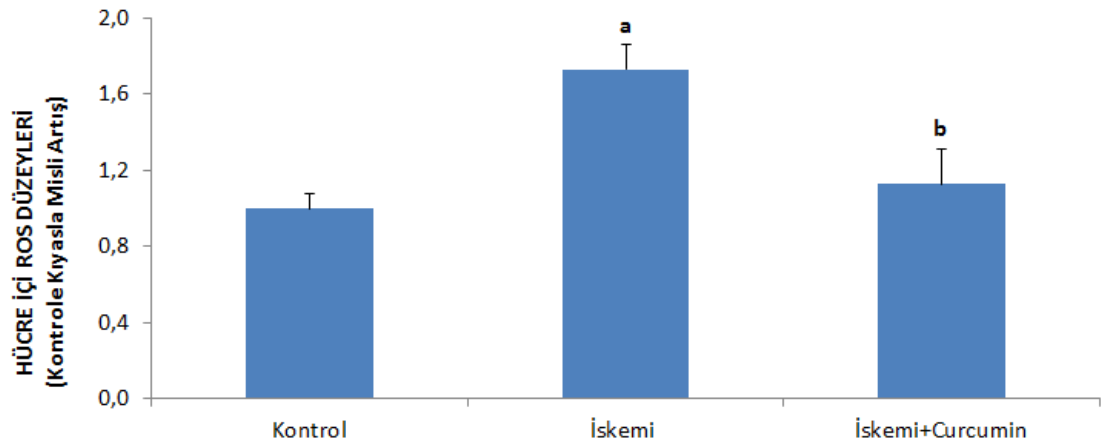
Kaspaz 3 aktivitesi iskemi+reperfüzyon grubuna göre iskemi+reperfüzyon + curcumin grubunda daha düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) ve kontrol grubuyla kıyaslandığında iskemi+reperfüzyon grunda oldukça yüksek iken, iskemi+reperfüzyon+ curcumin grubunda kontrol grubundaki seviyelere yakın değerler elde edilmiştir. Dolayısı ile, curcuminin kaspaz 3 aktiviteleri üzerinde koruyucu rolü gözlenmiştir.



şekil 15. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus kaspaz 9 aktivitesi üzerinde curcuminin etkileri. ^a $p < 0.05$ ve kontrol grubuna kıyasla.

Kaspaz 9 aktivitesinin iskemi+ reperfüzyon grubuna göre iskemi+ reperfüzyon+ curcumin grubunda daha düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) ancak bu oran kasaz 3 düzeylerindeki azalma kadar belirgin değildir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında iskemi+ reperfüzyon grunda kaspaz 3 seviyesi yüksek iken, iskemi+reperfüzyon+curcumin grubunda kontrol grubundaki seviyelere yakın değerler elde edilmiştir ($p<0.05$). Dolayısı ile, curcuminin kaspaz 9 aktiviteleri üzerinde koruyucu rolü olduğu gözlenmiştir.

4.4. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus hücre içi ROS üretimi üzerinde curcuminin etkileri.



Şekil 16. Serebral iskemi oluşturulan sıçan hipokampus ROS düzeyleri üzerinde curcuminin etkileri. ap<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla. bp<0.05 ve İskemi grubuna kıyasla.

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda beyin dokusunda ROS ürünlerinin seviyesinde iskemi + reperfüzyon uygulanan rat grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). ROS düzeylerinde; iskemi+reperfüzyon+curcumin grubunda iskemi+ reperfüzyon grubuna göre belirgin bir azalma gözlenmiştir ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Akut inme, tedavideki gelişmelere rağmen halen önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Gelişmiş ülkelerde sakatlıkların önde gelen nedenleri arasında birinci sırayı almaktadır. Kan akımının kesilmesinden saniyeler-dakikalar sonra infarktın kor bölgesinde, membran hasarı ve nöronal ölümle sonuçlanan iskemik kaskad başlar (130). İskemi ve arkasından oluşan reperfüzyon sonucunda mitokondride aşırı miktarda serbest oksijen radikali oluşur ve oksidatif stres gelişir (130, 131). Antioksidan sistemin yetersiz kalmasıyla oksidatif hasar giderek artar (132). Nöronların diğer organ ve dokulara göre rölatif olarak daha az endojen antioksidanlara sahip olmaları nedeniyle oksidatif strese daha duyarlıdırlar (133). İskemi sonrasında reperfüzyon hasarını önlemek için pek çok ajan kullanılmış olmakla birlikte nöron hasarını azaltmak için kullanılan ajanların hiçbirisi ümit verici değildir. 1000 den fazla ajan deneysel hayvan çalışmalarında etkin bulunmakla birlikte bu ajanların klinik çalışmalarda insanlar üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır (134).

Reperfüzyon esnasında serbest oksijen molekülünün, peroksinitrit ve serbest oksijen radikallerine indirgenmesi kolaylaşmaktadır. Çalışmalarda SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin varlığında ratların iskemi-reperfüzyon hasarına dirençli oldukları, bu enzimlerin yokluğunda ise inmenin daha çok hasara yol açtığı gösterilmiştir. Buna dayanarak antioksidan ajanlar, geçici iskemik atak sonucu oluşan nörodejenerasyonu önlemede değerli bir azaltıcı olabilirler (115).

Curcuma Longa bitkisinin asıl etken maddesi olan ve bu bitkiye karakteristik sarı- turuncu rengini veren curcuminin, yapılan bir çok çalışmada antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (135). Ghonheim ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada, fokal serebral iskemi oluşturulan ratlara iskemiden 30 dakika sonra 200 mg/kg curcumin tek doz ve intraperitoneal yol ile uygulanmış, ve curcuminin, oksidatif stresi anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir (136). Nirmala ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı miyokardiyal iskemi çalışması ile Jones ve arkadaşlarının renal iskemi çalışmasında curcuminin oksidatif stresi azaltarak protektif etkileri olduğu gösterilmiştir (137,138). Seong-Su ve arkadaşları tarafından

2002 yılında yapılan diğer bir çalışmada, curcuminin oksidatif stresle indüklenen NF-kB, AP1 (apoptotik nöronal hücre kaybının ürünü) aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak AP1 aktivitesini inhibe ettiği dozlarda NF-kB üzerine herhangi bir etkisi olmadığı da gösterilmiştir (139). Huang ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları çalışmada curcuminin, PKC, JNK, iNOS ve COX-2 yi inhibe ederek antioksidan etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır (140).

Thiyagarajan ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada curcumin 30, 100 ve 300 mg/kg dozunda, fokal serebral iskemiden 30 dakika sonra verilmiş ve curcuminin antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonunda curcuminin, serebral iske-mi-reperfüzyon hasarı neticesinde azalan antioksidan enzimlerin düzeylerini artırırken serbest oksijen radikallerinin düzeylerini doz bağımlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (141).

Bizim çalışmamızda da, yapılan çalışmalara benzer olarak kontrol grubuna oranla iske-mi+reperfüzyon oluşturulan ratlarda hücre içi ROS üretimi oldukça yüksek düzeylerde saptanırken antioksidan enzim düzeyleri kullanılmaya bağılı olarak düşük seviyelerde bulundu. Ancak iske-mi+reperfüzyon+curcumin verilen grupta serbest oksijen radikali seviyesinin anlamlı olarak azaldığı ve antioksidan enzim düzeylerinin belirgin olarak yüksek seviyelerde olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, bize curcuminin serebral iske-mi+reperfüzyon modelinde antioksidan özelliğe sahip olduğunu ve bu özelliğinden dolayı serebral iske-mi tedavisinde nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Apoptozis, serebral iske-mi sonrasında hücre ölümünden sorumlu temel mekanizmalardan bir tanesidir. Kaspaz 3 aktivitesindeki artış apoptozisin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (142). Curcumin ile yapılan, curcuminin doz ve teröpotik zaman aralığını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada, curcumin 300 mg/kg dozunda verildiğinde en etkin olduğunu, nöroprotektif etkiler ile infarkt volümünü azaltmada ilk 72 saatlik sürede daha etkin olduğu ortaya konulmuştur. Yine aynı çalışmada curcuminin apoptozisi önleyen mitokondriyal bcl-2 ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu, kaspaz 3 ve sitokrom c oksidaz aktivitesini azaltarak apoptozisi engellediği gösterilmiştir (143). Deneysel otoimmun ensefalomyelit oluşturularak gerçekleştirilen bir multipl sklerozis çalışmasında oligodentosit ve

nöronal apoptozisin ilk üç günde başladığı, curcumin verilen grupta belirgin olarak nöronal ve oligodentriyosit ölümünün erken dönemlerde (3 ve 16. günler) azaldığı, curcuminin mitokondriyal hasarı ve aynı zamanda aktive kaspaz 3, kaspaz 9, sitokrom c oksidaz düzeylerini anlamlı oranda azalttığı saptanmıştır (144). Deneysel olarak oluşturulan osteosarkom modelinde curcumin verilen grupta apoptozisin engellendiği; kaspaz 3, kaspaz 9, sitokrom c aktivitelerini düzenlediği ve aynı zamanda DNA fragmentasyonu üzerine olumlu etkileri olduğu bulunmuştur (145). Peroksinitrit ile oluşturulan rat spinal gangliyon nöron hasarında, hasar öncesi verilen curcuminin kaspaz 3, kaspaz 9, sitokrom c düzeylerinde azalmaya neden olurken daha önceki çalışmalardakine benzer olarak mitokondriyal bcl-2 ekspresyonunda artış saptanmıştır (146). Çinde yapılan başka bir çalışmada global serebral iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan hayvanların hipokampusleri incelenmiş ve iskemi reperfüzyon sonrasında hipokampusun CA1 bölgesinde c-jun ile c-fos ekspresyonunda belirgin bir artış olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada curcumin verilen grupta ise apoptozisin belirgin olarak azaldığı tespit edilmekle birlikte curcuminin antiapoptotik etkisini c-jun ve c-fos üretimini engelleyerek gösterdiği düşünülmüştür (147). Curcuminin apoptozis üzerine olan etkileri sepsis oluşturulan sıçanlarda hepatositlerde incelenen ve Bcl-2 /Bax oranına bakılan başka bir çalışmada, bu oran curcumin verilmeyen grupta en yüksek bulunurken curcumin verilen grupta en düşük düzeyde bulunmuştur (148).

Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer olarak curcuminin, kaspaz 3-9 seviyelerini anlamlı bir şekilde azalttığı ve apoptozisi önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir.

Serebral iskemi sonrasında oluşan hasarın temel mekanizmalarının başında hücre içi kalsiyumun aşırı artışı gelmektedir (149.150.151). Bu durum çoğunlukla kalsiyumun hücre içindeki artışına bağlı iken az miktarda da hücre içi depolardan kalsiyum serbestleşmesi buna katkı sağlar. Kalsiyum hücre içine başlıca iki yol ile girer; dentritik hücre üzerinde yer alan voltaja duyarlı kalsiyum kanalı ve özellikle N-methyl D- aspartat (NMDA) reseptörü agonisti kalsiyum kanalı. Hücre içinde artan kalsiyum; fosfolipazların, endonükleazların ve proteazların aktive olmasına neden olarak serbest oksijen radikallerinin üretilmesine neden olan bir dizi olayı

başlatır. Sonuç olarak hücre membranı parçalanır, hücre iskelet ve kromatin yapısı yıkılarak hücre ölür. Bu kısır döngünün sonucunda iskemi sonrasında yapısal bütünlüğünü sağlayan, iskemik dokuya komşu penumbardaki hücrelerin de hasarlanmasına ve ölmesine neden olur (149,152,153). Ayrıca kalsiyum mitokondri membranının yapısını da bozarak enerji üretiminde azalmaya ve oksidatif stresin daha da derinleşmesine neden olur. Literatürde curcuminin intrasellüler kalsiyum üzerine olan etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte; 2008 yılında. fokal serebral iskemi oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, curcumin iskemiden 5 gün önce 100 mg/kg oral gavaj ile verilmeye başlanmış ve iskemiden sonraki 3 gün boyunca curcumin verilmeye devam edilmiştir. İskemi sonrasında intrasellüler kalsiyum düzeylerine bakılmış ve iskemi oluşturulan grupta anlamlı derecede yüksek saptanmışken, curcumin verilen grupta intrasellüler kalsiyum düzeylerinin belirgin olarak düşük olduğu bulunmuştur (154). Yine 2011 yılında tavşanlarda yapılan in vitro ve invivo bir çalışmada, curcumin nano partiküller halinde verilmiş ve intrasellüler kalsiyum düzeylerinde azalma saptanmıştır. Aynı çalışmada curcuminin intrasellüler kalsiyum düzeylerini azaltmada, inme patogenizde önemli rol oynayan ve intrasellüler kalsiyum düzeylerinin artmasına aracılık eden fosfatidil inositol 3 kinaz ve kalsiyum kalmudilin bağımlı kinazlar aracılığı ile etkili olduğu gösterilmiştir (155).

Bizim çalışmamızda da önceki çalışmalara benzer olarak intrasellüler kalsiyum düzeyleri, kontrol grubuyla kıyaslandığında iskemi- reperfüzyon grubunda belirgin derecede yüksekti. Ancak iskemi+reperfüzyon+curcumin grubunda ise neredeyse kontrol grubuna benzer oranlar elde edildi.

Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1), ilk olarak 1997 yılında keşfedilmiştir ve somatik ve visseral noziseptif nöral uyarıların saptanmasında ve iletiminde önemli rol oynar. Düşük pH, sıcaklık gibi zararlı uyarılar, anandamid gibi endojen lipid ürünleri, kapsaisin gibi ekzojenler tarafından stimule edilir (156). Kapsaisin, bir TRPV1 agonisti olup membran depolarizasyonuna neden olarak aksiyon potansiyelleri oluşmasına neden olur (154) ve sonuç olarak ağrı duyusu oluşur (157). Ancak cilt üzerine yüksek dozlarda kapsaisin uygulandığında kronik ağrılarda hafiflemeye neden olur (158). Kapsaisinin bu şekilde davranmasının bir kaç

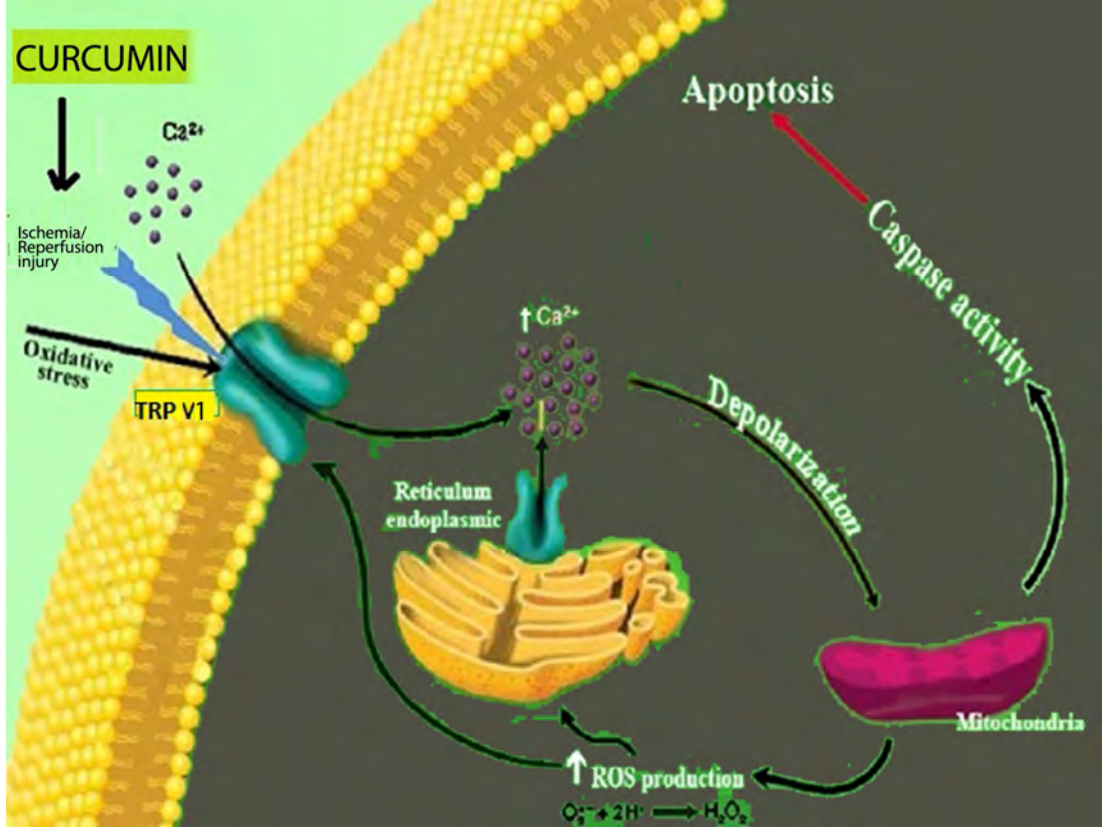
nedeni olabilir; birincisi, TRPV1 aktivasyonu sonucunda artan intrasellüler kalsiyum, kalsinörin yada kalmudilin enzimlerini defosforilasyon ile aktive ederek TRPV1 in desensitizasyonuna neden olur (159), ikincisi TRPV1 aktivasyonu nosiseptif sinir liflerinde dejenerasyon ile sonuçlanabilir (160) veya substans P düzeylerinde azalma ile sonuçlanabilir (161).

Curcumin molekülü bir TRPV1 agonisti olan kapsaisinin moleküler yapısındaki vaniloid halkası ile aynı halkaya sahiptir. Bu vanilil halkasının TRPV1 aktivasyonu için önemli olduğu düşünülmektedir (162). Zhi ve arkadaşları tarafından 2013 yılında inflamatuvar barsak hastalıklarında curcuminin TRPV1 kanalları üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, kolorektal distansiyon (CRD) oluşturularak visseromotor yanıt (VMR) bakılmıştır. 10 dakikalık CRD uygulanmış ve curcumin intravenöz olarak 3 dakika süreyle infüzyon şeklinde 0.4 mg/kg/dk ve 1 mg/kg/dk olacak şekilde verilmiş, ancak bu dozlarda VMR üzerine herhangi bir etki görülmemekle birlikte, curcumin 4 mg/kg/dk dozunda ve 3 dakikalık süre boyunca verildiğinde VMR ta belirgin bir azalmaya neden olduğu ve bu etkinin curcuminin kesilmesinden sonra hemen geri döndüğü saptanmıştır. Bu çalışmada curcuminin doz bağımlı olarak TRPV1 kanallarını antagonize ettiği, bu sayede intrasellüler kalsiyum girişini engellediği gösterilmekle birlikte bu etkisinin doz bağımlı olduğu gösterilmiştir. Curcuminin, sıçan ve farelerin dorsal kök gangliyonlarındaki nöronlarda, TRPV1 agonisti olan kapsaisinin hücre içi kalsiyum artırıcı etkisi üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak curcuminin kapsaisinin TRPV1 kanalları üzerine olan etkilerini kompetitif olarak inhibe ettiğini ve bu sayede intrasellüler kalsiyum düzeylerini azalttığı gösterilmiştir ve curcuminin geri dönüşümlü bir TRPV1 antagonisti olduğu gösterilmiştir (163).

Lee Ming-Tatt ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan, sentetik bir curcumin analogu olan 2,6-bis-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden) sikloheksanano (BHMC) verilen bir çalışmada, curcuminin antinosiseptif etkilerinin değerlendirilmiştir. Farelere kapsaisin verilerek TRPV1 kanallarının aktivasyonu sonucunda ağrının oluşturulduğu bu çalışmada, BHMC 0,03-1 mg/kg dozunda verilmiştir ve sonuç olarak curcuminin doz bağımlı olarak kapsaisinin indüklediği TRPV1 kanallarını inaktive ederek antinosiseptif etki gösterdiği saptanmıştır (164).

Maritelli ve arkadaşları tarafından 2007 yılında dinitrobenzen sülfonik asit (DNBS) ile indüklenen kolit modeli oluşturulan farelerde ve hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada curcuminin TRPV1 üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, curcumin kolit modelinden iki gün önce ve kolit oluşturulduktan 5 gün sonrasına kadar 45 mg/kg/gün dozunda oral olarak verilmiş, curcuminin TRPV1 üzerine olan etkilerini değerlendirenilmek amacıyla curcumin verilen farelere kapsazepine verilmiş ve sonuç olarak kapsazepinin curcuminin kolit üzerine olan bütün düzeltici etkilerini ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada in vivo olarak kapsaisinin antinosiseptig etkileri ancak çok yüksek dozlarda kapsazepin eklendiğinde ortadan kaldırılabilirdiği de tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada curcuminin in vitro koşullarda TRPV1 agonisti gibi davranabileceği gösterilmekle birlikte TRPV1 in in vivo ve in vitro koşullarda farklı etkilere sahip olduğu sonucunda varılmıştır (165).

Yeon ve arkadaşları tarafından termal hiperaljezi uygulanan ratlarda curcumin ve curcumin derivelerinin antinosiseptif etki mekanizmaları araştırılmıştır. Bu çalışmada curcumin (5, 25, 50 mg/ml/kg) ve curcumin deriveleri intraperitoneal olarak, orofasyaş bölgeye kapsaisin (0.1, 1, 5 mikrog/ml/kg) verilmeden 20 dakika önce verilmiştir. Curcuminin doz bağımlı olarak kapsaisinin indüklediği termal ağrıyı engellediği gösterilmiş ve oluşan bu etkinin TRPV1 kanallarının ekspresyonunu önleyerek gösterdiği saptanmıştır. Ancak curcumin 50 yada 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verilse bile kapsaisin verilmeyen sıçanlarda verildiğinde akut termal stimulus yanıtlarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada curcuminin kendisinin TRPV1 üzerine bir etkisinin olmadığı ancak kapsaisin ile indüklenen hiperaljezide TRPV1 antagonisti etki gösterdiği ortaya konulmuştur (166). Yeon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki sonuçlara benzer olarak başka bir çalışmada, curcumin derivesi olan ve curcumine oranla daha potent bir ajan olan KMS4034 ün TRPV1 kanalları üzerinden etki ederek nöropatik ve inflamatuvar özellikteki ağrıları önlediği gösterilmiştir (167).



Şekil 17. Hücre içi Ca^{+2} girişi ve endoplazmik retikulum aracılı apoptozis (63)

Çalışmamızda, mitokondriyal depolarizasyon, hücre içi ROS üretimi, apoptoz, kaspaz-3, kaspaz-9 değerlerinin serebral iskemi uygulanmış rat hipokampuslerinde artmıştır. Bununla birlikte curcumin tedavisi sonrasında azalmıştır. Oksidatif stres, apoptoz ve TRPV1 kanallarından Ca^{+2} girişiyle serebral iskeminin olası moleküler yolları aktifleşmiştir. Serebral iskemi oluşturulmuş ratların hipokampusünde TRPV1 ilişkili Ca^{+2} girişiyle ROS birikimine ve mitokondriyal disfonksiyon gelişmesine neden olarak mitokondial zar deliklerinin açılmasına, mitokondiri dış zarının şişmesine ve patlaması sonrasında apoptoz uyarıcı kaspaz-3, -9 gibi maddelerin salınmasına neden olmaktadır. Curcumin hipokampal sinir hücrelerinde Ca^{+2} girişi ve TRPV1 kanallarını düzenleyerek apoptoz ve oksidatif stres değerlerini düşürmektedir (161).

Daha önce yapılan çalışmalar curcuminin antiapoptotik, antiinflamatuvar özellikte olması nedeniyle nöroprotektif bir ajan olduğunu ortaya koymuştur. Curcuminin hangi patolojik süreçleri etkilediği ile ilgili çok az bilgi mevcut olmakla

birlikte curcuminin, serebral iskemi- reperfüzyon hasarında TRPV1 kanalları üzerine olan etkisi ile ilgili şimdiye kadar literatürde yayınlanmış herhangi bir bilimsel çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamız bu nedenden dolayı bu alanda ilk olma özelliğindedir. Burada sunulan sonuçlar, curcuminin TRPV1 akımlarının düzenlenmesinde önemli fizyolojik bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle, serebral iskemiye maruz kalmış hipokampal sinirlerinin hücre içi Ca^{+2} homeostazında curcumin anlamlı koruyucu etkisi gözlenmiştir. Apoptoz ve oksidatif stres seviyelerinin artması, kalsiyum düzensizliklerine neden olarak TRPV1'nin tonik frenleyici etkisini azaltır.

Bu çalışma sonuçlarına göre, curcumin tedavisinin, serebral iskemi nedeniyle oluşan nöronal hasarın TRPV1 kanallarını aktive ederek, potansiyel bir tedavi edici yaklaşım olacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

Inme, tüm dünyada önde gelen ölüm ve sakatlık nedenlerindendir. İskemik beyin hasarının çok değişik mekanizmaları vardır. Yapılan çalışmalar, iskemi reperfüzyon sonrasında gelişen nöron hasarının oksidatif stres ve/ veya mitokondriyal hasarlanma ve apoptozisin aktivasyonu sonucunda ortaya çıkabildiğini göstermiştir. Curcuma longa bitkisine esas rengini veren curcumin, anti oksidan, anti inflamatuvar ve antikanser gibi birçok tedavi edici özelliğe sahiptir. Yapılan bir çalışma, serebral iskemi- reperfüzyon hasarında curcuminin serbest oksijen radikallerinin neden olduğu kan beyin bariyeri zedelenmesini düzelttiğini göstermiştir. Ancak curcuminin etki mekanizmasıyla ilgili çok az bilgi mevcuttur. Biz, serebral iskemi oluşturulan sıçanların hipokampuslerinde curcuminin, oksidatif stress, kalsiyum girişi ve apoptosis üzerine olan koruyucu etkilerini belirlemeyi amaçladık.

Sunulan çalışmada, Sprague- Dawley cinsi 32 adet erkek sıçan kullanıldı ve hayvanlar 3 gruba ayrıldı: (1) kontrol grubu (n=8), (2) serebral iskemi+ reperfüzyon (n=12), (3) serebral iskemi+ reperfüzyon+ curcumin verilen grup (n=12). Ratlara reperfüzyondan hemen ve 24 saat sonra olmak üzere curcumin verildi. Curcumin 10 mg/kg, intraperitoneal yol ile ve tek doz olarak uygulandı. Reperfüzyondan 48 saat sonra ratlar öldürüldü ve beyinleri çıkarıldı.

Kaspaz-3, kaspaz- 9, apoptozis, intrasellüler SOR ürünleri ve serbest Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) değerleri serebral iskemi+ reperfüzyon grubunda yüksek olmasına karşın, serebral iskemi+ reperfüzyon+ curcumin grubunda düşük olarak saptandı. $[Ca^{2+}]$ konsantrasyonu 2- APB ile inkübe edilen 3 grupta azalmıştı. Serebral iskemi reperfüzyon gruplarında TRPV1 agonisti olan kapsaisinin indüklediği kalsiyum konsantrasyonları artmış bulunmasına karşın, TRPV1 antagonisti olan kapsazepin verilen grupta kalsiyum konsantrasyonu düşük düzeylerde bulundu.

Sonuç olarak, deneysel serebral iskemi modelimizde, curcuminin tedavi edici özelliğini, kalsiyum kanallarının aktivasyonuna ve kalsiyumun indüklediği nöronal ölüme neden olan TRPV1 kanallarının negatif modülasyonu sonucunda

gerçekleşebilir ve curcumin oksidatif stress, apoptozis ve kalsiyum girişine karşı olan nöroprtektif etkilerini TRPV1 kanalları üzerinden gösterebilir.

ABSTRACT

Ischemic cerebral stroke is one of the leading causes of human death and disability across the world. A variety of mechanisms are involved in ischemic brain injury. Recent studies show damage to neurons after ischemia–reperfusion may occur through oxidative stress and /or mitochondrial impairment and culminate in the activation of an apoptotic stage. Curcumin the principle colouring agent present of *Curcuma longa*, possesses many therapeutic properties including anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities. A recent study shows curcumin may ameliorate cerebral ischemia/reperfusion injury by preventing ROS-mediated blood-brain barrier damage. However, little is known about its mechanism. We aimed to investigate protective role of curcumin on oxidative stress, apoptosis and Ca^{2+} entry in hippocampus of rats with cerebral ischemia.

In the current study 32 Sprague- Dawley type male rats was used and the animals were divided into the 3 groups: (1) control (n=8), (2) cerebral ischemia-reperfusion (n=12), (3) cerebral ischemia- reperfusion+curcumin given groups (n=12). Rats were treated with curcumin after yet and 24 hours later from the reperfusion Curcumin was given 100mg/kg intraperitoneally and single dose. Rats were killed and the brains were isolated after 48 h of reperfusion.

Caspase-3, caspase-9, apoptosis, intracellular ROS production and intracellular free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) values were high in the cerebral ischemia-reperfusion group, although the Caspase-3, caspase-9, intracellular ROS production and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ values values were low in cerebral ischemia- reperfusion+Curcumin. In The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration was also decreased in the four groups by 2-APB incubations. TRPV channel agonist capsaicin induced increase on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration in cerebral ischemia- reperfusion groups although its concentration were decreased by TRPV1 channel antagonist, capsazepine.

In conclusion, in our cerebral iskemi experimental model, TRPV1 channels are involved in the Ca^{2+} entry-induced neuronal death and negative modulation of

this channel activity by curcumin pretreatment may account for their neuroprotective activity against oxidative stress, apoptosis and Ca^{2+} entry via TRPV1 channels.

Keywords: Apoptosis; Ca^{2+} entry; TRPV1 channels; Curcumin; Cerebral ischemia; Oxidative stress.

KAYNAKLAR

- 1- Demirci İ, Delibaşı T, Kayahan İK, Demirci EBS. Akut iskemik serebrovasküler olayda reperfüzyon hasarı engellenebilir mi? Moleküler mekanizmalara yönelik yeni gelişmeler. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2004; 2(3): 53–56.
- 2- Thiyagarajan, S.S. Sharma , *Life Sciences* 74 (2004) 969–985.
- 3- Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 111(6): 483–495.
- 4- Kavaklı A, Cet A, Parlakpınar H, Akpolat N, Şahna E. Ratlarda beyin iskemi reperfüzyon hasarı sonucu oluşan morfolojik değişikliklere melatonin ve pinealektominin etkisi. *F Ü Sağ Bil Derg* 2007; 21(2): 63-66.
- 5- Acworth IN, Bailey B. *Reactive Oxygen Species. In: The Handbook of Oxidative Metabolism. Massachusetts: ESA Inc., 1997, p. 1-1 to 4-4.*
- 6- Imaizumi, S., Kayama, T., Suzuki, J., Chemiluminescence in hypoxic brain-the first report. Correlation between energy metabolism and free radical reaction. *Stroke* 1984; 15: (6) 1061–1065.
- 7- Mattson MP, Duan W, Pedersen WA., Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 2001; (6) 69–81.
- 8- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE., Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; (495): 12–15
- 9- Kroemer G (2003) Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 304:433–435.
- 10- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17(1): 24-38.
- 11- Rathore P, Dohare P, Varma S et al., Curcuma oil: reduces early accumulation of oxidative product and is anti-apoptogenic in transient focal ischemia in rat brain. *Neurochem Res* 2007;33:1672–1682.
- 12- Dutta S, Padhye S, Priyadarsini KI et al., Antioxidant and antiproliferative activity of curcumin semicarbazone. *Bioorg MedChem Lett* 2005; 15:2738–2744.
- 13- Lim CS, Jin DQ, Mok H et al., Antioxidant and anti-inflammatory activities of

- xanthorrhizol in hippocampal neurons and primary cultured microglia. *J Neurosci Res* 2005; 82:831–838.
- 14- Singh S, Khar A., Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2006; 6:259–270.
 - 15- Shukla PK, Khanna VK, Ali MM et al., Anti-ischemic effect of curcumin in rat brain. *Neurochem Res* 2008; 33:1036–1043.
 - 16- *Cerebrovascular Disorders*. A clinical and research classification. *WHO Offset Publ. No:43* Ceneva, 1978.
 - 17- Malgrem R, et al. Geographical and secular trends in stroke incidence *Lancet* 1987;2: 1196-1201.
 - 18- Bonitta R: Epidemiology of stroke. *Lancet* 1992; 339:342-344.
 - 19- Araka H, Hayashi M, Date C et al. Epidemiologic studies of stroke in Slubata, a Japanese provincial city preliminary report on risk factors for cerebral infarction. *Stroke* 1985;16:773-780.
 - 20- Nencini P, Intizari D, Baruffi MC et al, Incidence of stroke in young adults in Florence, Italy. *Stroke*.1988; 19 :977-981.
 - 21- Zuber M, Mass JL: Epidemiologie des accidents vasculaires cerebraux. *Rev Neurol*.1992;148 :245-255.
 - 22- Kumral E , Kumral K : İnme risk faktörleri. *Nöropsikiyatri Arşivi*. 1991;28:55-58.
 - 23- Taraka H, et al. Epidemiologic studies of stroke in Slubata a Japanase provicil city Preliminary report on risk factor for cerebral infarction, *Stroke* 1985; 16: 773 – 780.
 - 24- Ashok P, Radhakrishnan K, et al. Incidence and pattern of cerebrovascular disease in benghazi, Libya *J Neurology, Neurosurgery psychiatry* 1986;49: 519 – 523.
 - 25- Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F: The Lausanne Stroke Registry: Analysis of 1000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*.1998;19 :1083-1092.
 - 26- Balkan S. Serebrovasküler Hastalıklar 2. Baskı. 2005 Güneş Kitapevi Ankara
 - 27- Demirci S. Serebrovasküler hastalıklarda risk faktörleri. 1995 (Tez)

- 28- Kumral E. Serebrovasküler Hastalıkların Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*. 2004; 2(1): 15–21.
- 29- Wentworth DA, Atkinson P. Implementation of an acute stroke program decreases hospitalization costs and length of stay. *Stroke* 1996; 27: 1040-1043.
- 30- Köseoğlu A, Köseoğlu Z, Satar D. Serebral iskemi. *Arşiv* 2006; 15–61.
- 31- Utku U. İnme Tanımı, Etiyolojisi, Sınıflandırma ve Risk Faktörleri. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2007; 53(1): 1–3.
- 32- Bıçakcı Ş, Özeren A, Bıçakcı K, Peköz MT, Karayalçın C. İntraserebral Kanamalarda Risk Faktörleri Profili Ve MR-Anjiyografi Bulguları. *Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi* 2007; 13(3): 87–90.
- 33- Yıldız N, Şanal E, Sarsan A, Topuz OI, Ardıç F. İnme hastalarının özellikleri ve fonksiyonel sonuçlarını etkileyen faktörler. *FTR Bil Der - J PMR Sci* 2009;12: 59–66.
- 34- Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, Baybaş S. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam* 2005 18(3):129–135.
- 35- Sarkar PK, Lambert LA. Etiology and treatment of hyperhomocysteinemia causing ischemic stroke. *Int J. Clin. Pract.* 2001;55(4) :262-8.
- 36- Sanossian N, Ovbiagele B. Prevention and management of stroke in very elderly patients. *Lancet Neurol* 2009; 8(11): 1031–1041.
- 37- Kagan A, Popper J, Reed DM, MacLean CJ, Grove JS. Trends in stroke incidence and mortality in Hawaiian Japanese men. *Stroke* 1994; 25(6): 1170–1175.
- 38- UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *UKPDS 38. BMJ* 1998; 317: 703–713.
- 39- Telman G, Sprecher E, Namestnikov O, Kouperberg E. Comparison of risk factors and work-up in young and middle-aged patients with TIA and ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 2010; 17(4): 567–571.
- 40- Özdemir Ö. Patent Foramen Ovale ve İskemik Strok: PFO - İskemik Strok İlişkisi, Klinik Ve Laboratuvar Tanı. *Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi* 2008; 14(1): 9–13.

- 41- Kıyan S, Özşaraç M, Ersel M, Aksay E, Yürüktümen A, Musalar E, Çevrim Ö. Acil servise başvuran akut iskemik inme 124 hastanın geriye yönelik bir yıllık incelenmesi. *Akademik Acil Tıp Dergisi* 2009; 8(3): 15-20.
- 42- Tokgözoğlu L. Ateroskleroz Patogenezi. Tokgözoğlu L (ed.) Hiperlipidemi ve Ateroskleroz
- 43- Amarenco P, Labreuche J. Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurol* 2009; 8(5): 453–463.
- 44- Demirci S, Yalçın BZ, Bakaç G, Dayan C, Aysal F. İnmelede Tekrarlayıcılığı Etkileyen
- 45- Abbott RD, Rodriguez BL, Burchfield CM, et al, physical activity in older middle aged men and reduced risk of stroke: The Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol*. 1994;139:881 – 893.
- 46- Petiti DB, Sidney S, Quesenberry CP Jr, et al. İskemik stroke and use of estrogen and estrogen / progestogen as hormon replacement the rapy. *Stroke*. 1998; 29: 23 – 28.
- 47- Sloan MA, Kittner SJ, et al. İlicit drug associated ischemic stroke in Baltimore – Washington *Young Stroke Study*. *Neurology* 1998;50:1688 – 1693.
- 48- Nolte CH, Jungehulsing GJ, Rossnagel K, Roll S, Haeusler KG, Reich A, Willich SN, Villringer A, Muller- Nordhorn J. Vascular risk factor awareness before and pharmacological treatment before and after stroke and TIA. *Eur J Neurol* 2009; 16(6): 678–683.
- 49- Kumral E. Merkezi sinir sistemi damarsal hastalıkları, Güneş tıp Kitabevi, 2011, Ankara
- 50- Baron JC, Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 1999;9:193-201.
- 51- Astrup J, Siesjö BK, Symon L Thresholds in cerebral ischemia the ischemic penumbra. *Stroke* 1981;12(6): 726-730.
- 52- Yemişçi M, Gürer G, Dalkara T. İskemik inmede gelişen Fizyopatolojik olaylar. *Türkiye Klinikleri Nöroloji* 2004; 2(1): 22–28.
- 53- Muir KW, Buchan A, Kummer RV, et al. Imaging of acute stroke. *Lancet Neural* 2006;5:755-768.

- 54- Bouma GJ, Muizelaar JP , Stringer W A, et al. Ultra early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J Neurosurg* 1992;77:360-368.
- 55- Siesjö BK Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: Part 1-pathophysiology. *J Neurosurg* 1992;77: 169-184.
- 56- Gorgulu A, Kırış T. Eksitator aminoasitler ve eksitotoksite. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2005; 15(1): 33–38
- 57- Kingham PJ, Pocock JM. Microglial secreted cathepsin B induces neuronal apoptosis. *J Neurochem* 2001;76: 1475-1484
- 58- Memişoğulları R. Diyabette serbest radikaller ve antioksidanlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30–39.
- 59- Rahman A, Üstünda B, Özercan İH, Burma O, Çekirdekçi A, Özveren MF, Uyar İS, Global serebral iskemi sonrası reperfüzyon hasarını azaltmada flavinoidlerin rolü. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1999; 7: 6, 430–434.
- 60- Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik gelişim* 2008: 5–13.
- 61- del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:1–9
- 62- Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 1997:1048-1056.
- 63- - Rodríguez-Yáñez M, Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol* 2008; 21(3): 353–357.
- 64- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007 ; 184(1-2): 53–68.
- 65- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1999: 1020-1028.
- 66- Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med* 2000;36:483-506.

- 67- Rahman A, Üstünda B, Özercan İH, Burma O, Çekirdekçi A, Özveren MF, Uyar İS, Global serebral iskemi sonrası reperfüzyon hasarını azaltmada flavinoidlerin rolü. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1999; 7: 6, 430–434
- 68- Huang D, Shenoy A, Cui], Huang W, Liu PK. In situ de- tection of AP sites and DNA strand breaks bearing 3'- phosphate termini in ischemic mouse brain. *FASEB J* 2000;14:407-417
- 69- Mobasheri A, Barrett-Jolley R. Transient receptor potential channels: emerging roles in health and disease. *Vet J. Feb*;187(2):145-6.
- 70- Naziroglu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res.* 2010;36(3):355- 66.
- 71- Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature.* 1969;18;224(5216):285-7.
- 72- Hardie RC. TRP channels in Drosophila photoreceptors: the lipid connection. *Cell Calcium.* 2003;33(5-6):385-93.
- 73- Heiner I, Eisfeld J, Luckhoff A. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium.* 2003;33(5-6):533-40.
- 74- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D.and Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389, 816-824.
- 75- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V.and Nilius, B., The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 2004;430, 748-754.
- 76- Matta, J.A.and Ahern, G.P., Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* 2007;585, 469-482.
- 77- Devane, W.A., Breuer, A., Sheskin, T., Jarbe, T.U., Eisen, M.S.and Mechoulam, R., A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 1992;35, 2065-2069.
- 78- Galve-Roperh, I., Sanchez, C., Cortes, M.L., Gomez del Pulgar, T., Izquierdo, M.and Guzman, M., Anti- tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal regulated kinase activation. *Nat Med* 2000;6: 313-319

- 79- Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G. and Ferrer-Montiel, A., Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 2004;24: 5307-5314.
- 80- Ramsey, I.S., Delling, M. and Clapham, D.E., An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 2006;68: 619- 647.
- 81- Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V. and Julius, D., Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 2001;411: 957-962.
- 82- Szallasi, A., Cruz, F. and Geppetti, P., TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol Med* 2006;12: 545-554.
- 83- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21:531–543.
- 84- Jara-Oseguera, A., Simon, S.A. and Rosenbaum, T. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1: 255-269.
- 85- Caterina, M.J. Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. *Pain* 2003;105: 5-9.
- 86- Gibson, H.E., Edwards, J.G., Page, R.S., Van Hook, M.J. and Kauer, J.A. TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 2008; 57: 746-759.
- 87- Mezey, E., Toth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M. and Szallasi, A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3655-3660.
- 88- Maritelli, S., Di Marzo, V., Berretta, N., Matias, I., Maccarrone, M., Bernardi, G. and Mercuri, N.B. Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci* 2003;23: 3136-3144.
- 89- Li, D.P., Chen, S.R. and Pan, H.L. VR1 receptor activation induces glutamate

- release and postsynaptic firing in the paraventricular nucleus. *J Neurophysiol* 2004;92: 1807-1816.
- 90- Yang, K., Kumamoto, E., Furue, H. and Yoshimura, M. Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1998; 255: 135-138.
 - 91- Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kossel, M., Holsboer, F., Zieglgansberger, W., Landgraf, R., Lutz, B. and Wotjak, C.T. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 2008; 27: 832-839.
 - 92- Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N.H., Chan, C.L., Knowles, C., Williams, N.S. and Anand, P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* 2001; 357: 1338-1339.
 - 93- Goadsby, P.J. Emerging therapies for migraine. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3: 610-619.
 - 94- Razavi, R., Chan, Y., Afifyan, F.N., Liu, X.J., Wan, X., Yantha, J., Tsui, H., Tang, L., Tsai, S., Santamaria, P. TRPV1⁺ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* 2006; 127: 1123-1135.
 - 95- Zhang, L.L., Yan Liu, D., Ma, L.Q., Luo, Z.D., Cao, T.B., Zhong, J., Yan, Z.C., Wang, L.J., Zhao, Z.G., Zhu, S.J. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res* 2007; 100: 1063-1070.
 - 96- Amaya F., Shimosato, G., Nagano, M., Ueda, M., Hashimoto, S., Tanaka, Y., Suzuki, H. and Tanaka, M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 2303- 10.
 - 97- Barr ML, Klerman, J.A. The Human Nervous System. 5 ed. Philadelphia: JB Lippincott Comp; 1988. p. 266.
 - 98- Cizkova D, Vanicky I, Gottlieb M, Marsala J. Ischemic damage in the hippocampus: a silver impregnation and immunocytochemical study in the rat. *Arch Ital Biol.* 1996;134(4):279-90.
 - 99- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during

- apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999 Nov;6(11):1028-42.
- 100- Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 1991;7:663-98.
- 101- Nelson DL, Michael MC. Three--dimensional structure of proteins Lehninger Principles of Biochemistry. 2005; 116--156 W.H Freeman and Company New York.
- 102- Ulusu NN, *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]* 2009;; 34 (1) 51–52.
- 103- Uniacke J, Zerges W. (2008) Stress induces the assembly of RNA granules in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* *J Cell Biol.* 182(4):641–6.
- 104- Bond U. (2006) Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS Yeast Res.* 6(2):160–70.
- 105- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. RNA-- binding Proteins TIA–1 and TIAR Link the Phosphorylation of eIF–2 to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *J Cell Biol,* 199; 147:1431–1442.
- 106- Anderson P, Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33(3):141–50.
- 107- Tanyel FC, Ulusu NN, Tezcan EF, Büyükpamukçu N. Less calcium in cremaster muscles of boys with undescended testis supports a deficiency in sympathetic innervation. *Uro Int.* 2002; 69(2):111--5.
- 108- Tanyel FC, Ulusu NN, Tezcan EF, Büyükpamukçu N. Total calcium content of sacs associated with inguinal hernia, hydrocele or undescended testis reflects differences dictated by programmed cell death. *Urol Int.* 2003; 70(3):211--5.
- 109- Tandogan B, Ulusu NN. Importance of calcium. *Turk J Med Sci* 2005; 35: 197--201
- 110- Ulusu NN, Tandoğan B, Tanyel FC. Sarco(endo)plasmic reticulum and plasmalemmal Ca(2+)--ATPase activities in cremaster muscles and sacs differ according to the associated inguinal pathology. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 515–519.
- 111- Liebeskind DS. Reperfusion for acute ischemic stroke: arterial revascularization and collateral therapeutics. *Curr Opin Neurol* 2010; 23(1): 36–45.

- 112- Donnan GA, Baron JC, Ma H, Davis SM. Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. *Lancet Neurol* 2009; 8(3): 261–269.
- 113- Kıyan S, Özsera M, Ersel M, Aksay E, Yürüktümen A, Musalar E, evrim Ö. Acil Servise Başvuran Akut İskemik İnme 124 Hastanın Geriye Yönelik Bir Yıllık İncelenmesi. *Akademik Acil Tıp Dergisi* 2009; 8(3): 15-20.
- 114- Marder VJ, Jahan R, Gruber T, Goyal A, Arora V. Thrombolysis with plasmin: implications for stroke treatment. *Stroke* 2010; 41: 45–49.
- 115- Green AR. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 325–338.
- 116- Traystman RJ. Neuroprotection: introduction. *Stroke* 2010; 41: 63.
- 117- Aggarwal B, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur SK et al Curcumin Biological and Medicinal Properties. 7034_book.fm 2006: p. 297 367.
- 118- Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11 (6): 535-540.
- 119- Natarajan C, Bright JJ, curcumin inhibits experimental allergencephalomyelitis by blocking IL- 12 signalling through janus- kinase stat pathway in T- lymphocytes, *The Journal of Immunology* 2002; 169: 6506-6513.
- 120- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41 (13): 1955-1968.
- 121- Rahman I, Antioxidant therapies in COPD, *International Journal of COPD* 2006;1(1) 15–29
- 122- Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999; 27 (4): 486-494.
- 123- Dohare P, Garg P, Jain V, Nath C, Ray M Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of curcumin in thromboembolic model of rat. / *Behavioural Brain Research* 2008; 193: 289–297
- 124- Yang C, Zhang X, Fan H, Liu Y., Curcumin upregulates transcription factor

- Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia, *Brain Research*, 2009-07-28, Volume
- 125- J. Jingtao, S. Sato, N. Yamanaka, Changes in cerebral blood flow and blood brain barrier in the gerbil hippocampal CA1 region following repeated brief cerebral ischemia, *Med. Electron. Microsc.* 1999; 32: 175–183.
 - 126- Gryniewicz C., Poenie M., Tsien RY., A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.
 - 127- Ghazizadeh V, Nazıroğlu M. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis.* 2014;29(3):787-99
 - 128- Yürekli VA, Gürler S, Nazıroğlu M, Uğuz AC, Koyuncuoğlu HR. Zonisamide attenuates MPP⁺-induced oxidative toxicity through modulation of Ca²⁺ signaling and caspase-3 activity in neuronal PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33(2):205-212.
 - 129- Akpınar A, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Agomelatine and duloxetine synergistically modulates apoptotic pathway by inhibiting oxidative stress triggered intracellular calcium entry in neuronal PC12 cells: role of TRPM2 and voltage-gated calcium channels. *J Membr Biol.* 2014;247(5):451-459.
 - 130- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke:therapeutic Approaches. *Journal of Translational Medicine* 2009; 7 (97): 1-11.
 - 131- Nakamura T, Tanaka S, Hirooka K, Toyoshima T, Kawai N, Tamiya T, Shiraga F, Tokuda M, Keep R. F, Itano T, Miyamoto O, Anti-oxidative effects of d-allose, a rare sugar,on ischemiareperfusion damage following focal cerebral ischemia in rat. *Neurosci Lett* 2010; 1-4.
 - 132- Jung J E, Kim GS, Chen H, et al.. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke:frombasic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2010; 41:172–179
 - 133- Kıyıcı A, Yücel D, Antiepileptik ilaç kullanımı ve oksidatif stres. *Tıp*

- Araştırmaları Dergisi* 2007; 5(2):57-62.
- 134- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55: 310-318.
 - 135- Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L, Sakariah KK. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem* 2006; 98:720–724.
 - 136- Ghoneim, A.I., Abdel-Naim, A.B., Khalifa, A.E., El-Denshary, E.S., Protective effects of curcumin against ischaemia/ reperfusion insult in rat forebrain. *Pharmacol. Res.* 2002; 46: 273–279
 - 137- Nirmala, C., Puvanakrishnan, R., Effect of curcumin on certain lysosomal hydrolases in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Biochemical Pharmacology* 1996;51 (1): 47–51.
 - 138- Jones EA, Shoskes DA, The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair, *Journal of Urology* 2000; 163(3): 999- 1004
 - 139- Seong-Su Han, Young-Sam Keum, Hyo-Joung Seo and Young-Joon Surh, Curcumin Suppresses Activation of NF- κ B and AP-1 Induced by Phorbol Ester in Cultured Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002; 35(3): 337-342
 - 140- Huang, M.T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D., Conney, A.H., Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Research* 1991;51 (3): 813–819.
 - 141- Thiagarajan, Meenakshisundaram; Sharma, Shyam S., Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats, *Life Sciences*. 2004;74(8):969-985,
 - 142- Niwa M, Hara A, Iwai T, Wang S, Hotta K, Mori H, Uematsu T., Apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 2001; 300: 103–106.
 - 143- Jing Zhao, Shanshan Yu, Weiping Zheng Gang Feng, Guobiao Luo, Linli Wang, Yong Zhao, Curcumin Improves Outcomes and Attenuates Focal

- Cerebral Ischemic Injury via Antiapoptotic Mechanisms in Rats, *Neurochem Res.* 2010 ;35(3):374-9.
- 144- Jinzhou Feng, Tao Tao, Weiping Yan, Cindy Si Chen, and Xinyue Qin, "Curcumin Inhibits Mitochondrial Injury and Apoptosis from the Early Stage in EAE Mice," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, 10 pages
 - 145- Peng, Lee, Hour, Tsai, Kuo, Chen, Shieh, and Jai-Sing Yang. "Curcumin-loaded nanoparticles enhance apoptotic cell death of U2OS human osteosarcoma cells through the Akt-Bad signaling pathway. *International Journal of Oncology* 2014; 44(1) : 238-246.
 - 146- Wenwen Liu, Zhaomin Fan, Yuechen Han, Sumei Lu, Daogong Zhang, Xiaohui Bai, Wei Xu, Jianfeng Li, Haibo Wang, Curcumin attenuates peroxynitrite-induced neurotoxicity in spiral ganglion neurons. *NeuroToxicology*, 2011; 32 (1):150-157.
 - 147- Ye KP, Chen CR, Zheng JW, Cao H, Ji B, Zhou R, Meng ZY, Li J, Lian QQ, Effects of curcumin on the nuclear pathway of JNK during Hippocampal ischemia /reperfusion injury in SHR, *Zhonghua Ying Yong Sheng Xue Za Zhi* 2010; 26 (4): 416-20
 - 148- Tao P, Yin H, Ma Y., Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. Study of the mechanisms of curcumin on mitochondrial permeability transition of hepatocytes in rats with sepsis, *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2014; 26(9):666-70
 - 149- Choi DW: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role ischemic damage. *TINS* 1998; 11: 465-469.
 - 150- Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1: 623-634.
 - 151- Lazarewicz JW: Calcium transients in brain ischemia]: role in neuronal injury. *Acta Neurobiol Exp* 1996; 56: 299-311.
 - 152- Siesjö BK: Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 1984; 60: 883-908.
 - 153- Siesjö BK: Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 30 (suppl 1990; 2): 3-9.

- 154- Shukla, Pradeep K. 1,2; Khanna, Vinay K. 1; Ali, Mohd. M. 1; Khan, Mohd. Y. 3; Srimal, Rikhab C. *Neurochemical Research*. 2008; 33(6):1036-1043.
- 155- Lapchak PA, Schubert DR, Maher PA. Delayed treatment with a novel neurotrophic compound reduces behavioral deficits in rabbit ischemic stroke. *J Neurochem*. 2011; 116:122–131.
- 156- Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 487–517.
- 157- T. Kohno, “A role of spinal inhibition in neuropathic pain”, in Cellular and Molecular Mechanisms for the Modulation of Nociceptive Transmission in the Peripheral and Central Nervous Systems, E. Kumamoto, Ed. Trivandrum, India: *Research Signpost*, 2007, pp. 131-145.
- 158- Malmberg AB, Mizisin AP, Calcutt NA, von Stein T, Robbins WR, Bley KR. Reduced heat sensitivity and epidermal nerve fiber immunostaining following single applications of a high-concentration capsaicin patch. *Pain* 2004;111:360–7.
- 159- Numazaki M, Tominaga T, Takecuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M, Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin, *Pract Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8002- 6.
- 160- Yang BH, Piao ZG, Kim Y-B, Lee C-H, Lee JK, Park K, et al. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res* 2003;82:781–5.
- 161- Kashiba H, Ueda Y, Senba E. Systemic capsaicin in the adult rat differentially affects gene expression for neuropeptides and neurotrophin receptors in primary sensory neurons. *Neuroscience* 1997;76:299–312.
- 162- Heil N Jr. Mechanisms of vanilloid-induced apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 251–62.
- 163- Zhi L, Dong D, Kong B, Sun O, Sun D, Grundy G, Zhang & W. Rong, Curcumin acts via transient receptor potential vanilloid-1 receptors to inhibit gut nociception and reverses visceral hyperalgesia, *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: e429–e440
- 164- Lee Ming-Tatt, Shaik Ibrahim Khalivulla, Muhammad Nadeem Akhtar, Azam Shah Mohamad, Enoch Kumar Perimal, Mohamed Hanief Khalid, Ahmad Akira, Nordin Lajis, Daud Ahmad Israfa and Mohd Roslan Sulaiman,

- Antinociceptive Activity of a Synthetic Curcuminoid Analogue, 2,6-bis-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)cyclohexanone, on Nociception-induced Models in Mice, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2012, 110, 275–282.
- 165- Martelli, L, Bagazzi E, Mario F, Martelli M, Castagliuolo I, Dal Maschio M, Palu G, Maschietto M, Vassanelli S, Brun P., A potential role for the vanilloid receptor TRPV1 in the therapeutic effect of curcumin in dinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice. *Neurogastroenterology & Motility*. 2007; 19(8):668-674
- 166- Yeon KY, Kim SA, Kim YH, et al. Curcumin produces an antihyperalgesic effect via antagonism of TRPV1. *J Dent Res* 2010; 89: 170–4
- 167- J. Y. Lee, T. J. Shin, J. M. Choi, K. S. Seo, H. J. Kim, T. G. Yoon, Y. S. Lee, H. Han, H. J. Chun, Y. Oh, S. J. Jung and K. J. Shin Antinociceptive curcuminoid, KMS4034, effects on inflammatory and neuropathic pain likely via modulating TRPV1 in mice, *Br J Anaesth*. 2013;111(4):667-72.