

**ASTROSİT HÜCRELERİNDE ALÜMİNYUMA BAĞLI
OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNDE KURKUMİN VE
PİPERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CURCUMIN AND
PIPERINE ON ALUMINUM- INDUCED DAMAGE IN THE
ASTROCYTES CELLS**

ŞEBNEM ERFEN

DR. ÖĞR. ÜYESİ ESİN AKBAY ÇETİN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

Biricik Anneciğime...

ÖZET

ASTROSİT HÜCRELERİNDE ALÜMİNYUMA BAĞLI OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNDE KURKUMİN VE PİPERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Şebnem ERFEN

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Esin AKBAY ÇETİN

Haziran 2022, 113 sayfa

Tez çalışması kapsamında, alüminyum ile reaktif hale getirilen primer kortikal astrosit hücreleri üzerinde kurkumin ile piperinin terapötik ve protektif etkileri ve kurkumin ile piperinin birlikte kullanımı (sinerjik etki) ile kurkuminin biyoyararlanımının değişimi ve piperinin biyogüçlendirici karakteri tartışılmıştır. Astrosit hücreleri primer olarak sıçan yavrularından elde edilmiş ve *in vitro* model bu hücreler ile oluşturulmuştur. Elde edilen primer hücreleri üzerinde *terapötik* etkinin belirlenebilmesi için; alüminyum uygulamasını takiben, kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonları uygulanmıştır. *Protektif* etkinin belirlenebilmesi için ise; kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonlarının hücrelere uygulanmasını takiben 24. saatte alüminyum uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Kurulan deney grupları üzerinde, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide analizi ile hücre canlılığı, Akridin turuncusu/ Propidium iyodür ikili boyama yöntemi ile apoptotik ve nekrotik süreçler incelenmiştir. Apoptosis ayrıca TUNEL boyama yöntemi ile incelenmiştir. Protaktif etki deney gruplarında elde edilen süpernantlarda sitokin analizleri ile alüminyumun, kurkuminin, piperinin ve kurkumin ile piperinin sinerjik etkilerinin astrosit hücrelerinden salgılanan İnterlökin 6 ve Transforme Edici Büyüme Faktörü- beta 1 sitokin seviyelerini ne yönde değiştirdiği araştırılmıştır. Sonuç olarak elde edilen veriler, kurkumin ve piperinin astrosit hücrelerinde alüminyuma bağlı olarak gelişen hasar üzerinde hücre canlılık yüzdelerinin hem protaktif hem de terapötik etki gruplarında kontrole göre daha çok olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda kurkumin ile piperinin birlikte kullanımının, kurkuminin biyoyararlanımını, yüksek hücre canlılığı, apoptotik ve nekrotik hücre sayısında azalma ve sitokin miktarlarında azalmaya neden olarak, destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar piperinin kurkumin üzerinde biyogüçlendirici etkisinin astrosit hücrelerinde de var olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak astrosit hücrelerinde alüminyuma bağlı olarak gelişen hasarın moleküler düzeyde de kurkumin ile piperinin sinerjik etkileşimleri doğrultusunda hangi yolakları nasıl değiştirdiği daha ileri çalışmalar ile ortaya konması bu alanda yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Primer Kortikal Astrosit, Alüminyum, Kurkumin, Piperin, Sinerjik Etki

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CURCUMIN AND PIPERINE ON ALUMINUM- INDUCED DAMAGE IN THE ASTROCYTES CELLS

Şebnem ERFEN

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Esin AKBAY ÇETİN

June 2022, 113 pages

Within the scope of the thesis, the therapeutic and protective effects of curcumin and piperine on primary cortical astrocyte cells reactive with aluminum, and the change in bioavailability of curcumin and the bioenhancing characteristic of piperine with the use of curcumin and piperine together (synergistic effect) were investigated. Astrocyte cells were obtained primarily from rat pups and an *in vitro* model was created with these cells. To determine the *therapeutic* effect on the obtained primary astrocytes cells; afterwards aluminum applied, concentrations of curcumin, piperine and synergistic effect were tested. In order to find the *protective* effect; aluminum application was carried out at the 24th hour following the application of curcumin, piperine and synergistic effect concentrations to the cells. Cell viability was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide analysis, and apoptotic/ necrotic processes were investigated by Acridine orange/ Propidium iodide dual staining method on the established experimental groups. Apoptosis was also investigated by TUNEL staining method. With cytokine analyzes in the supernants obtained from the protective effect experimental groups, it was investigated how the synergistic effects of aluminum, curcumin, piperine, and curcumin with piperine changed the levels of Interleukin 6 and Transforming Growth Factor-beta 1 cytokine secreted from astrocyte cells. As a result, the obtained data showed that the cell viability percentages of curcumin and piperine on aluminum-induced damage in astrocyte cells were higher in both the protective and therapeutic effect groups compared to the control. At the same time, the use of curcumin and piperine together increases the bioavailability of curcumin by causing high cell viability, a decrease in the number of apoptotic and necrotic cells, and a decrease in the amount of cytokines. The results showed that piperine has a bioenhancing effect on curcumin in astrocyte cells as well. Based on these results, further studies will shed light on other studies to be conducted in this field, as further studies will reveal how the damage due to aluminum in astrocyte cells changes at the molecular level in line with the synergistic interactions of curcumin and piperine.

Keywords: Primary Cortical Astrocyte, Aluminium, Curcumin, Piperine, Synergistic Effect

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman bana destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle beni her daim aydınlatan, bana güvenip inanarak bir şeyler öğrenebilmem konusunda beni teşvik eden çok sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Esin AKBAY ÇETİN'e,

Bilim insanı olma yolundaki ilk adımlarımı atarken yolumu aydınlatıp bana yeni ufuklar kazandıran çok değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR'a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince aktarmış olduğu bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan güler yüzlü ve anlayışlı hocam Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM AKAN'a,

Her zaman desteklerini yanımda hissettiğim Doç. Dr. Aylin GÜRPINAR, Uzm. Remma Pamir Gülsoy, Arş. Gör. Dr. Güler Hanife TANIR DÖNMEZ'e,

Her türlü destekleri ile her zaman yanımda olan, laboratuvarında geçirdiğimiz süreyi anlamlı ve eğlenceli kılan ekip arkadaşlarım; Alp Yiğit ÖZDEMİR, İlgin ÖZDEMİR, Elif Hatice BABAYİĞİT, İbrahim KAMACI ve aynı laboratuvarı paylaştığım tüm arkadaşlarıma,

Heyecanlarımı, umutlarımı, hayallerimi usanmadan dinleyip bana destek olan çok sevgili dostlarım; Sena BABADAĞ, Burcu KAYGUSUZ ve Eda LİMAN'a,

Hayallerimin peşinden koşarken bana inanan, destek olan, uzak olsak bile varlıklarını her daim yanımda hissettiğim Canım Aileme,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Merkezi Sinir Sistemi Fizyolojisi.....	4
2.1.1 Astrositlerin Yapısı ve Özellikleri.....	5
2.2. Alüminyum.....	8
2.2.1. Alüminyumun Merkezi Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri.....	9
2.1.2. Alüminyumun Astrosit Hücreleri Üzerindeki Etkileri.....	10
2.1.3. MSS Patolojilerinde İn Vitro Model Yaklaşımları.....	11
2.3. Kurkumin.....	12
2.3.1. Kurkuminin Kimyasal Yapısı.....	12
2.3.2. Kurkuminin Merkezi Sinir Sistemindeki Etkileri.....	14
2.3.2.1. Metal Şelatlama ve Anti-Amiloid Etkileri.....	15
2.3.2.2. Antioksidan Etkileri.....	15
2.3.2.3. Antienflamatuar Etkileri.....	16
2.4.Piperin.....	16
2.4.1. Piperinin Kimyasal Yapısı.....	17

2.4.3. Biyogüçlendirici Etkileri.....	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	19
3.1. Kimyasal Maddeler.....	20
3.2. Deney Hayvanları.....	20
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Cerrahi İşlemler.....	20
3.2.2. Primer Astrosit Hücrelerinin İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması.....	21
3.2.2.1. Transfer Solüsyonunun Hazırlanması.....	21
3.2.2.2. Tripsin ve Kollajenaz Enzimlerinin Hazırlanması.....	21
3.2.2.3. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	21
3.2.3. Petrilerin Poly- D- Lizin ile Kaplanması.....	22
3.3. Karışık Glial Kültür İzolasyonu ve Kültürasyonu.....	22
3.3.1. Primer Karışık Glial Hücre İzolasyonu.....	22
3.3.2. Primer Astrosit Hücrelerinin Kültürasyonu ve Zenginleştirme İşlemi.....	24
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	26
3.3.4. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Çözdürülmesi.....	27
3.4. Primer Astrosit Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	27
3.5. Kimyasalların Hazırlanması.....	28
3.5.1. $AlCl_3$ Stok ve Uygulama Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	28
3.5.2. Kurkumin Stok ve Uygulama Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	28
3.5.3. Piperin Stok ve Uygulama Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	29
3.6. Deney Gruplarında Kullanılacak Olan Konsantrasyonların Tayini.....	29
3.6.1. Alüminyum Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi.....	30
3.6.2. Kurkumin Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi.....	31
3.6.3 Piperin Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi.....	31
3.6.4. Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi.....	31
3.7. Deney Gruplarının Kurulması.....	32

3.8. Deney Gruplarında Yapılan Analizler.....	34
3.8.1. Primer Astrosit Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi.....	34
3.8.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	35
3.8.3. Akridin Turuncusu/ Propidium İyodür Boyaması.....	36
3.8.4. TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini.....	36
3.8.5. Sitokin Analizi.....	37
3.9. İstatistiksel Analiz	38
4. SONUÇLAR	39
4.1. Primer Kortikal Astrosit İzolasyonu ve Kültürü.....	39
4.2. Primer Astrosit Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	40
4.3. Al, Kurkumin, Piperin ve Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Tayini.....	41
4.3.1. Alüminyum Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	41
4.3.2. Kurkumin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	43
4.3.3. Piperin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	45
4.3.4. Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	47
4.4. Primer Astrosit Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi.....	48
4.5. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	49
4.5.1. Kurkumin, Piperin ve Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Al Hasarına Karşı Terapötik Etkinliği.....	49
4.5.1.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	49
4.5.1.2. Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Belirlenmesi.....	51
4.5.1.3. TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini.....	52
4.5.2. Kurkumin, Piperin ve Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Al Hasarına Karşı Protpektif Etkinliği.....	54
4.5.2.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	54
4.5.2.2. Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Belirlenmesi.....	55

4.5.2.3. TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini.....	56
4.5.2.4. Sitokin Miktarlarının Belirlenmesi.....	58
5. TARTIŞMA	60
6. KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	80
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	80
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nörovasküler ünite elemanları ve astrosit hücrelerinin ünite konumları [35].....	6
Şekil 2.2. Astrositler ile nöronlar arasındaki üçlü sinaptik bağlantılarda astrositlerin su, potasyum ve glutamat homeostazisinin sağlanması [37].....	7
Şekil 2.3. Zerdeçalın aktif kurkuminoid formları.....	13
Şekil 2.4. Kurkuminin iki yaygın formu olan enol ve keto formları. A; Diketon motifi, B; Yedi karbonlu α , β - doyamamış β - diketon bağlayıcısı, C; O- metoksi-fenolik grup, D; Fenol halkası.....	14
Şekil 2.5. Kurkuminin keto formu. A; Metal bağlayıcı bölge, B; Hidrofobik bölge, C; Antikanser aktivitesi, D; Antioksidan Etkisi.....	14
Şekil 2.6. Karabiberin izomerik formları.....	17
Şekil 3.1. Deney akış şeması.....	19
Şekil 3.2. Primer Astrosit İzolasyon Aşamaları. A; 3 günlük neonatal sıçan yavruları, B; dekapitasyonu takiben beyin dokusunun izolasyonu, C; Korteks dışındaki alanlarından ve menenj tabakasından arındırılmış korteks dokusu, D; beyin dokusunun mekanik olarak küçük parçalara ayrılması.....	24
Şekil 3.3. İzolasyon sonrası ekimi sağlanan hücre kültür kaplarının çalkalayıcı üzerinde tutularak “astrosit zenginleştirme işleminin” gerçekleştirilmesi.....	26
Şekil 3.4. Dama tahtası sinerji testi. Kurkumin ve piperin konsantrasyonları için ok yönünde artan şekilde uygulama yapılmıştır.....	32
Şekil 4.1. Primer kortikal astrosit hücreleri. A: Astrosit zenginleştirme işlemi öncesi karışık gliyal hücre kültürü (izolasyonu takiben 7. gün) (Görüntü 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir), B: Astrosit zenginleştirme sonrası pasaj 2'deki astrosit hücreleri (Görüntü 4X büyütme kullanılarak çekilmiştir).	40
Şekil 4.2. Primer kortikal astrosit hücrelerinin Anti-GFAP antikoru ile işaretlenerek karakterize edilmesi. Kırmızı; 1:200 Anti-GFAP, 1:200 TR (545- 580 nm), Mavi: DAPI. Görüntü 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir.....	41

Şekil 4.3. L929 ve astrosit hücreleri üzerinde 24 saat Al uygulaması sonrası % hücre canlılığı grafikleri. Al uygulaması ile L929 hücre hattında 2000, 4000, 8000, ve 1000 µM ve astrosit hücrelerinde 4000, 6000, 8000 ve 10000 µM Al ile muamele edilmesi sonucunda hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azalmıştır. (İstatistiksel olarak anlamlılık, *; $p \leq 0,05$, ***; $p \leq 0,001$).....	42
Şekil 4.4. Kurkumin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, ***; $p \leq 0,001$).....	44
Şekil 4.5. Kurkumin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$).....	44
Şekil 4.6. Kurkumin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, ***; $p \leq 0,001$).....	45
Şekil 4.7. Piperin konsantrasyonlarının belirlenmesi.	46
Şekil 4.8. Piperin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$)	46
Şekil 4.9. Piperin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, ***; $p \leq 0,001$).....	47
Şekil 4.10. Kurkumin ile piperinin sinerjik etki konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	48
Şekil 4.11. Primer kortikal astrosit hücre büyüme eğrisi.....	49
Şekil 4.12. Astrosit hücrelerinde $AlCl_3$ hasarına karşı kurkumin, piperin ve sinerjik etki gruplarının terapötik etkilerinin belirlenmesi. 24 saat $AlCl_3$ uygulanmış astrosit hücrelerine 24 saat kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonları uygulanmıştır. (Sinerji 1: 25 µM kurkumin+ 1 µM piperin; Sinerji 2: 25µM kurkumin+ 2.5 µM piperin; Sinerji 3: 50 µM kurkumin+ 25 µM piperin; Sinerji 4: 5 µM kurkumin+ 10 µM piperin). Kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; *, $p \leq 0,05$, ***, $p \leq 0,001$. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +; $p \leq 0,05$, ++; $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$. Piperin konsantrasyonları arasındaki istatistiksel anlamda farklılık; #; $p \leq 0,05$	51
Şekil 4.13. Terapötik etki gruplarında apoptoz ve nekroz oranlarının belirlenmesi.....	52

Şekil 4.14. TUNEL yöntemi ile apoptozun gösterilmesi. A) Kontrol grubu; B) Negatif kontrol grubu; C) Kurkumin 1 µM; D) Kurkumin 5 µM; E) Kurkumin 10 µM; F) Kurkumin 25 µM; G) Kurkumin 50 µM; H) Piperin 1 µM; I) Piperin 2.5 µM; J) Piperin 10 µM; K) Piperin 25 µM; L) Sinerji 1 (25 µM kurkumin+ 1 µM piperin); M) Sinerji 2 (25µM kurkumin+2.5 µM piperin); N) Sinerji 3 (50 µM kurkumin+ 25 µM piperin); O) Sinerji 4 (5 µM kurkumin+ 10 µM piperin) Görüntüler 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir.....53

Şekil 4.15. Astrosit hücrelerinde AlCl₃ hasarına karşı kurkumin, piperin ve sinerjik etkinin protektif etkilerinin belirlenmesi. 24 saat kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonlarının uygulanmış astrosit hücrelerine 24 saat süre ile AlCl₃ uygulaması yapılmıştır. (Sinerji 1: 25 µM kurkumin+ 1 µM piperin; Sinerji 2: 25 µM kurkumin+2.5 µM piperin; Sinerji 3: 50 µM kurkumin+ 25 µM piperin; Sinerji 4: 5 µM kurkumin+ 10 µM piperin). Kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; *, p≤ 0,05, **, p≤ 0,01, ***, p≤ 0,001. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +, p≤ 0.05, ++, p≤ 0.01, +++, p≤ 0.001.....55

Şekil 4.16. Protektif etki apoptoz ve nekroz oranlarının belirlenmesi.....56

Şekil 4.17. TUNEL yöntemi ile apoptozun gösterilmesi. B'de görülen oklar apoptotik boyanmaları ifade etmektedir. A) Kontrol grubu; B) Negatif kontrol grubu; C) Kurkumin 1 µM; D) Kurkumin 5 µM; E) Kurkumin 10 µM; F) Kurkumin 25 µM; G) Kurkumin 50 µM; H) Piperin 1 µM; I) Piperin 2.5 µM; J) Piperin 10 µM; K) Piperin 25 µM; L) Sinerji 1 (25 µM kurkumin+ 1 µM piperin); M) Sinerji 2 (25µM kurkumin+2.5 µM piperin); N) Sinerji 3 (50 µM kurkumin+ 25 µM piperin); O) Sinerji 4 (5 µM kurkumin+ 10 µM piperin) Görüntüler 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir.....57

Şekil 4.18. IL- 6 sitokin salınımının belirlenmesi. (KUR: kurkumin, PİP: piperin, SİN: sinerji).....58

Şekil 4.19. TGF- β sitokin salınımının belirlenmesi. (KUR: kurkumin, PİP: piperin, SİN: sinerji).....59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Primer kortikal astrosit hücreleri ile kurulan in vitro deney gruplarının özetini.....	33
--	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
ml	Mililitre
$^{\circ}$	Santigrat
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa

Kısaltmalar

AH	(Alzheimer Hastalığı)
Al	Alüminyum
AlCl_3	Alüminyum klorür
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AO/PI	Akridin turuncusu/ Propidyum iyodür
Apo E	Apolipoprotein E
ATP	Adenozin Trifosfat
$\text{A}\beta$	Amiloid Beta
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etildiaminotetraasetik Asit
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizi

FBS	Fetal Bovine Serum
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
IC50	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
IgG	İmmüoglobülin G
IL- 10	İnterlökin 10
IL- 1 β	İnterlökin- 1 beta
IL- 6	İnterlökin- 6
KBB	Kan Beyin bariyeri
mg	miligram
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
P/S	Penisilin/ Streptomisin
PBS	Phosphate buffered saline
PDT	Population Doubling Time
pH	Potansiyel hidrojen
RCF	Göreceli Santrifüj Kuvveti
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPM	Dakikadaki Dönme Sayısı
TGF- β 1	Transforme Edici Büyüme Faktörü- beta 1
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- alfa
TR	Teksas Red

1. GİRİŞ

Alüminyum (Al), yeryüzünde doğal olarak karşılaşılabilen ve yer kabuğunda en fazla bulunan üçüncü elementtir [1]. Çeşitli doğa olayları ile fiziksel ve kimyasal bozunmalara uğramaktadır. Bunun sonucunda doğal süreçlerdeki döngülere katılarak su, toprak ve bu kaynaklardan elde edilen ürünlerin kontaminasyonuna sebep olmaktadır [2]. Al fizikokimyasal özellikleri sebebi ile endüstride sıklıkla işlenerek kullanılmaktadır. Bunun sonucunda da yiyecek ve içeceklerin kontaminasyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Bebek mamaları da dahil olmak üzere pek çok yiyecek ve içekte, çeşitli kişisel bakım-kozmetik ürünlerinde ve farmasötik ajanlarda karşımıza çıkmaktadır [3]. Al'un insan vücuduna alınımı genel olarak sindirim, solunum sistemleri ve deri yoluyla gerçekleşmektedir [1,4]. Bunun yanı sıra alüminyumun çeşitli elementlerle bileşik oluşturma potansiyeline sahip olması, vücutta çeşitli dokularda emilim kapasitesinin artmasına neden olmaktadır [2].

Al'un birikim gösterdiği dokuların başında **merkezi sinir sistemi (MSS)** gelmektedir. Etkilerinin belirlenebilmesi için günümüzde pek çok *in vivo* ve *in vitro* araştırmanın yapıldığı görülmektedir. Al'un MSS üzerindeki nörotoksik etkileri; kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenlik değişimleri, enflamasyonel yanıtlar, oksidatif stres ve başta tau ve amiloid beta (A β) proteinleri olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda gözlemlenen proteinlerin birikimi şeklinde gelişen sekonder etkilerdir [1,5–7]. Beyinde en fazla birikim görülen alanlar; frontal korteks, hipokampus ve korpus striatumdur [1,4]

MSS birbirleriyle yakın ilişkili, farklı görevler üstlenen çeşitli hücrelerden meydana gelmektedir. MSS hücrelerinden biri olan **astrositler**, memelilerde en yaygın hücre popülasyonunu oluşturmaktadır [8]. Belirgin morfolojik ve işlevsel özelliklere sahip olan bu hücreler MSS'nde birçok biyolojik süreçte rol almaktadır. Özellikle nöronal çevrenin sağlanması ve korunmasında önemli roller üstlenmesi sebebi ile, nörodejeneratif süreçlerin araştırılması ve anlaşılabilmesinde önem

kazanmaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda genellikle primer olarak izole edilen hücrelerin kullanıldığı görülmektedir.

Nörodejeneratif hasarların tedavi yaklaşımlarında tercih edilen **terapötik ajanların**, özellikle antienflamatuvar ve antioksidan özellikleri taşımaları sebebi ile tedaviyi olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir [3,4,9,10]. Son yıllarda yapılan nöroterapötik ajan çalışmalarında bitkilerden elde edilen etken maddeler ön plana çıkmıştır. Yapılan çalışmalarla zerdeçalın etken maddesi olan **kurkumin** de bu alanda önemi anlaşılan ürünlerden biri haline gelmiştir. Kurkumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione), *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen, baharat ve renklendirici olarak kullanılan lipofilik, polifenol karakterli bir maddedir [11]. Özellikle antioksidan, antienflamatuvar, antiapoptotik, nöroprotektif ve terapötik etkileri sıklıkla literatürde tartışılmış, ayrıca Al kaynaklı farklı doku hasarlarında da koruyucu etkileri ortaya konmuştur [12]. Suda az çözünür yapıda olması ve vücutta hızlı bir şekilde bozunması kurkuminin biyoyararlanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle biyoyararlanımı arttırmak için çeşitli ajanlar ile birlikte kullanımları literatürde görülmektedir [9,11,13]. Yapılan çalışmalarda kurkuminin özellikle “piperin” ile birlikte kullanılmasının biyoyararlanım açısından daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir [9,14,15]. Literatürde “biyogüçlendirici” olarak anılan **piperin** ((2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-one); *Piper nigrum* ve *Piper longum* türlerinin içermiş olduğu bir alkaloiddir. Literatürde piperin ile yapılan çalışmalarda, bu alkaloidin antienflamatuvar, analjezik, antibakteriyal, antioksidan, antikanser, antiviral ve nöroprotektif özellikleri tanımlanmıştır [16,17].

Yürütülen tez çalışması kapsamında sıçan kortikal astrosit hücreleri primer olarak izole edilmiş ve Al ile muamele edilmiştir. Literatürde Al ile oluşturulmuş astrosit hasarı üzerindeki protektif ve terapötik etkinliği ile ilgili yeterli bilgi bulunmayan piperinin etkinliği tartışılmıştır. Aynı zamanda piperinin kurkumin ile birlikte kullanılarak, kurkuminin biyoyararlanımı artırıcı özelliği incelenmiştir. *Al ile oluşturulan astrosit hücre hasarı üzerinde kurkumin ve piperinin ayrı ayrı etkinlikleri ile iki maddenin sinerjik olarak etkinliğinin tartışılması tezin özgün değerini oluşturmaktadır*. Elde edilen veriler doğrultusunda ilk kez piperinin farklı dozlarda etkinliği Al kaynaklı astrosit hücre hasarında incelenmiştir. Kurkumin ile

piperinin Al kaynaklı astrosit hasarında; hücre canlılığı, apoptotik ve nekrotik hücre sayısı açısından terapötik karakterleri ortaya konarken, protektif karakterleri açısından sitokin analizleri de yapılmıştır. Piperinin kurkumini destekleyecek şekilde biyogüçlendirici olarak kullanımının nörodejeneratif hastalıklarda tercih edilebilecek protektif ve terapötik bir ajan olduğunu göstermiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi Fizyolojisi

Sinir sistemi; parankimal doku hücreleri olan nöronlar ve nöronlara destek sağlayan yardımcı hücreler olan nöroglia hücrelerinden oluşan, embriyonik olarak ektodermden köken alan bir sistemdir. Çevresel uyarılara göre bilgi akışı sağlama ve almış olduğu bilgiye göre yanıt oluşturmak en temel görevlerinden biridir. Çevreden gelen uyarıları alan ve merkezden aldığı yanıtları hedef bölgelere ileten sinir sistemi kısmına “çevresel sinir sistemi” adı verilmektedir. Aynı şekilde çevreden aldığı uyarılara uygun şekilde yanıtlar oluşturan ve diğer sistemlerle birlikte vücut aktivasyonunun kontrolünü sağlayan kısmına ise “merkezi sinir sistemi” (MSS) adı verilmektedir [18].

MSS birbirinden farklı görevlere sahip pek çok hücreden meydana gelmektedir. Nöronları destekleyen ve işlevlerini yerine getirebilmesinde destek olan hücreler; astrositler, oligodendrositler, mikroglialar, perisitler, mikrovasküler endotel hücreleri ve ependim hücreleridir. En fazla bulunan hücre grubunu ise “astrositler” oluşturmaktadır [19–21]. *Astrositler* MSS’nin diğer hücreleri ile kurmuş olduğu yakın bağlantılar sayesinde nöronlara yapısal, trofik ve kimyasal destek sağlamaktadırlar [22]. *Mikroglialar* MSS’nin immün hücreleri olarak bilinmektedir [18]. *Perisitler* kan akışının kontrolünün sağlanmasında endotel hücrelerine destek sağlamaktadırlar [23]. *Oligodendrositler* nöronlara yapısal destek ve yalıtım sağlayan miyelin kılıfın oluşturulmasından sorumlu olan hücrelerdir [24]. *Ependim hücreleri* ise beyin omurilik sıvısı oluşumuna katkı sağlayan silli nöroepitel hücreleridir [25].

Uygun nöronal çevrenin sağlanması ve korunması MSS işlevlerinin doğru bir şekilde yerine getirilmesinde oldukça önemlidir. Nöronal çevrenin korunmasında en önemli göreve sahip olan kan beyin bariyeri (KBB); mikrovasküler endotel hücreleri, astrositler ve perisitlerin birbirleri ile yakın ilişkileri sonucu oluşan bir yapıdır. KBB’nin en önemli görevi MSS’de madde giriş ve çıkışlarının oldukça sıkı bir şekilde denetlenmesini sağlamaktır[26]. Özellikle nörodejeneratif

süreçlerde KBB'nin etkilenecek nöronal çevrenin homeostazisinin bozulduğu ve nöronların patojenlere karşı açık bir hale geldiği bilinmektedir.

Astrositler, nöronal çevrenin homeostazisinde önemli bir role sahiptirler ve KBB' de nöronlar ile kurduğu yakın ilişkiler sayesinde bir yandan madde giriş çıkışlarının denetlenmesine katkı sağlarken, diğer yandan nöronlarda meydana gelen biyolojik işlevlerin gerçekleştirilmesi ve düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedirler. Yapısal olarak barındırdığı pek çok uzantı ile KBB ve nöronlar arasında ağısı bir yapı oluşturarak mekanik destek sağlamaktadırlar [20]. Nöronların aksine uyarılabilme potansiyeli taşımamalarına rağmen sinaptik aktivitenin oluşumu ve devamlılığının sağlanmasında nöronlara destek sağlarlar[19]. Nöronların sinaps yaptığı bölgelerde görev alması ile birlikte oluşan yapıya "üçlü sinaptik model" adı verilmiştir [27]. Aynı zamanda bu süreçte astrositlerden salınan gliotransmitter maddeler, MSS işlevselliği için önemli bir yere sahip olan glutamin- glutamat döngüsünü sağlamaktadır. Yapısında bulundurduğu Kir4.1 ve Aquaporin-4 kanalları ile birlikte K⁺ iyonlarının ve su dengesinin sağlanmasından sorumludur [28,29]. MSS'nde gerçekleşen patolojik koşullarda çoğalarak işlevselliğini yitirmiş olan nöronların yerlerini doldurarak hem mekanik hem kimyasal destek görevini üstlenirler [30].

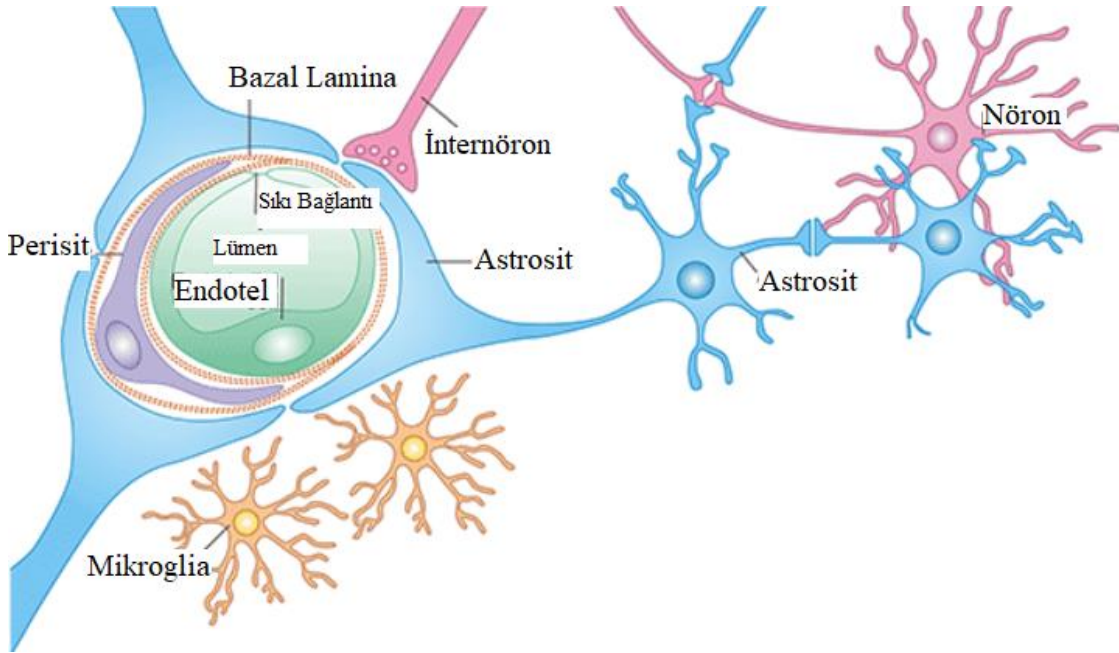
2.1.1.1. Astrositlerin Yapısı ve Özellikleri

Astrositler beyin ve omurilikte bulunan, hücre gövdesinden uzanan çıkıntılara sahip yıldız şekilli glial hücrelerdir. Adını yıldız şeklinde olmasından almaktadır; yunanca kökenli olan "astron" yıldız; "kitos" kelimesi ise hücre anlamına gelmektedir. Yapısında bulunan çıkıntılara "uç ayak" ya da "filopod" adı verilmektedir [20]. Camillo Golgi tarafından 1871 yılında gümüş kromat boyama tekniği ile astrositlerin morfolojileri görselleştirilmiştir [31]. Yapılan bu çalışmalar ile glial hücrelerinin beyinde bir yapılandırıcı gibi davrandığı fikri öne sürülmüştür.

Astrositler MSS'nin farklı bölgelerinde bulunmakta olup, MSS işlevinin düzenlemesi ve homeostazisinin sağlanmasında pek çok anahtar rol oynamaktadır. KBB'ne destek sağlaması ile fiziksel bariyer; özel enzim sistemleri ile metabolik bariyer ve taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunu sağlaması ile taşıma bariyeri görevini üstlenirler [32]. MSS'ne madde giriş çıkışlarının sıkı bir şekilde

kontrolünü sağlayan ve nöronlar için sağlıklı bir mikroçevre sağlanmasında görevli olan KBB'nin oluşumunda endotel hücreleriyle ve nöronlarla uç ayak yapıları aracılığıyla bağlantı kurarak MSS'de yapı iskelesi görevi üstlenirler [32]. Sahip oldukları Kir4.1 potasyum ve Aquaporin-4 protein kanalları ile iyon ve su dengesinin kontrolünü de sağlamaktadırlar [33].

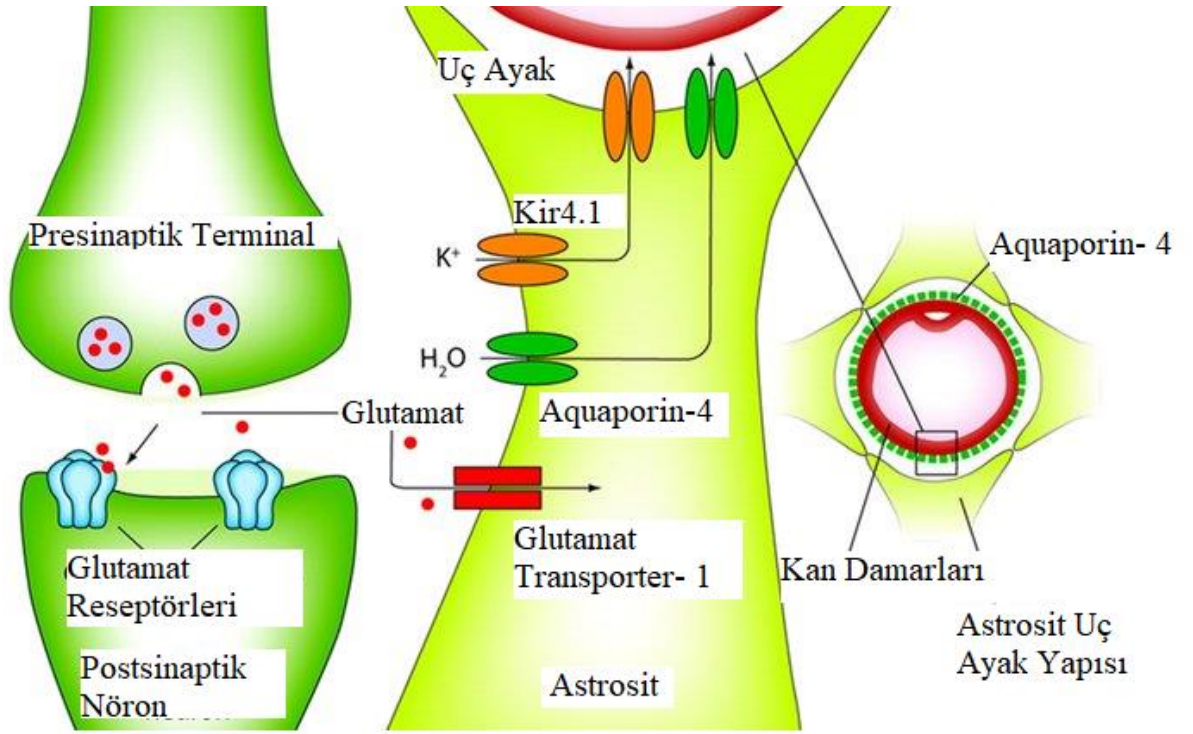
MSS'de; parankimal ve mikrovasküler endotel hücreleri ile perisitler ve astrositlerin oluşturmuş olduğu KBB'ni de kapsayan birim "nörovasküler ünite" şeklinde tanımlanmaktadır (**Şekil 2.1**). Astrositlerin bu ünite içerisindeki görevi; MSS düzenlenmesi ve beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde ifade edilen hücre içi adezyon molekülü-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü-1'in astrosit hücrelerinden salgılanan kemokin ve sitokinler yoluyla kontrol edilmesidir [34]. Bu yol ile astrositlerin MSS'ne lökosit infiltrasyonunu da etkileyebildiği hakkında görüşler ileri sürülmektedir [19].



Şekil 2.1. Nörovasküler ünite elemanları ve astrosit hücrelerinin ünite konumları [35]

Kompleks yapıları sayesinde nöronlar arasında dallanmalar göstererek nöronlara trofik, yapısal ve metabolik destek sağlarlar. Nöronlarla kurmuş olduğu bu

bağlantılarla, iyon dengesinin sağlanması, CO₂ konsantrasyonunun modülasyonu, hücre dışı pH'nın kontrolünün sağlanması gibi önemli roller üstlenirler. Elektriksel olarak uyarılmayan hücreler olmalarına rağmen nöronlar tarafından salgılanan nörotransmitterlere oldukça duyarlı hücrelerdir [36]. Sinaptik aktivitenin algılanarak, yanıt verilmesini sağlayan çok çeşitli nörotransmitter taşıyıcıları ve reseptörlerini ifade etmektedirler. Postsinaptik ve presinaptik bağlantıların olduğu bölgelerde astrositlerin kurmuş olduğu üçlü sinaps yapısı ile birlikte nöronların sinyal alışverişine yardımcı olurlar (**Şekil 2.2**).



Şekil 2.2. Astrositler ile nöronlar arasındaki üçlü sinaptik bağlantılarda astrositlerin su, potasyum ve glutamat homeostazisinin sağlanması [37].

Astrositler aynı zamanda nörogenezde, hücre göçü ve farklılaşmasında, sinaptogenez ve sinaptik plastisite için gerekli olan büyüme ve nörotrofik faktörlerin salınımından sorumludur [38–40]. Nörotrofik faktörler, nöronlar ve astrositlerce salgılanan; büyüme, farklılaşma, hayatta kalma ve sinaptik plastisitenin sağlanması gibi önemli görevleri yerine getiren moleküllerdir [8].

Astroditler kolesterol, apolipoprotein E (apo E) ve özel yağ asitlerinin seviyelerini düzenleyerek, lipit metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Apo E beyinde kolesterol ve fosfolipit taşıyıcısı olarak işlev görmektedir. Apo E'nin yanlış düzenlenmesi, lipit regülasyonunda bozulmaya ve A β birikimine neden olmaktadır. Alzheimer hastalığının temel patolojik bulgusu olan A β birikimi ile ilgili yapılan hayvan modellerinde, A β birikiminin ilk önce mikrovasküler endotel hücrelerinin çevresinde görüldüğü ve büyük nöronal kayıplardan önce mikrovasküler endotel hücrelerinde ve astrositlerde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [41].

Astroditler nörodejeneratif süreçlerde de etkin bir şekilde rol oynamaktadır. MSS için oldukça önemli olan, İnterlökin-1 beta (IL-1 β), Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF- α), İnterlökin- 6 (IL-6), İnterlökin- 10 (IL-10) ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β 1) sitokinlerinin düzenlenmesinden sorumludurlar. Nörodejeneratif süreçlerde astrositlerin aktivasyonu ve proliferasyonu ile birlikte IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, IL-6 gibi sitokinlerin miktarında artma; bazı sitokinlerin (IL-10) seviyesinde ise azalma görüldüğü gösterilmiştir [42,43].

2.2. Alüminyum

Alüminyum, yer kabuğunda en fazla bulunan üçüncü elementtir ve yer kabuğunun yaklaşık olarak %8'ini oluşturmaktadır [1]. Çeşitli doğa olayları nedeni ile yer kabuğundaki kayalarda meydana gelen fiziksel ve kimyasal bozunmalar sonucunda, kayalarda bulunan Al, su ve toprak kontaminasyonuna sebep olmaktadır. Aynı zamanda bu kaynaklardan elde edilen yan ürünlerin de kontaminasyonuna sebep olmaktadır [2]. Al'un kolay işlenebilmesi ve maliyetinin düşük olması gibi fizikokimyasal özellikleri sebebi ile endüstride sıklıkla işlenerek kullanılması, yiyecek ve içeceklerin kontaminasyonunda bir diğer sebeptir [2]. Aynı zamanda bebek mamaları da dahil olmak üzere pek çok yiyecek ve içekte, çeşitli kişisel bakım-kozmetik ürünlerinde ve farmasötik ajanlarda karşımıza çıkmaktadırlar[3]. Al'un insan vücuduna alınımı genel olarak sindirim ve solunum sistemi ile olmakla birlikte, aynı zamanda deri yoluyla da gerçekleşmektedir. Sindirim sistemi ve deri yoluyla vücuda alınımında hızlı bir şekilde dolaşım sistemine katılan Al'un çok büyük bir çoğunluğu böbrekler aracılığı ile vücuttan

uzaklaştırılmaktadır. Kan dolaşımına katılan Al ise; kan plazmasında demir taşınımına hizmet eden bir glikoprotein olan transferrine bağlanarak dokulara taşınır. Al'un bu özelliklerinden dolayı maruziyetine en duyarlı kişilerin böbrek fonksiyonları zayıflamış bireyler, bir yaşının altındaki bebekler ve yaşlılar olduğu gözlenmiştir [44]. Bunun yanı sıra Al'un çeşitli elementlerle bileşik oluşturma potansiyeline sahip olması, vücutta çeşitli dokularda emilim ve birikim kapasitesinin artmasına neden olmaktadır [2]. Al'un birikim gösterdiği dokuların başında MSS gelmektedir.

2.2.1. Alüminyumun Merkezi Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri

Al'un MSS'ne girişi, KBB'nden taşıyıcı protein aracılıklı bir taşıma yolu olan transferrin aracılıklı endositoz yolu ile gerçekleşmektedir. MSS'nde Al maruziyetinin ve birikiminin ilişkilendirildiği nörodejeneratif hastalıklar; Alzheimer hastalığı (AD; Alzheimer's Disease), Parkinson hastalığı (PH), ensefalopati, epilepsi, Amyotrofik lateral skleroz ve demans olarak sıralanabilir [45]. Al'un MSS üzerindeki nörotoksik etkileri; KBB geçirgenlik değişimleri, enflamasyonel yanıtlar, oksidatif stres ve başta tau ve A β proteinleri olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda gözlemlenen proteinlerin birikimi ve bu etkilere bağlı olarak gelişen sekonder etkilerdir [1,5,6]. Al'un MSS'nde göstermiş olduğu bu ciddi etkilerin sebebi ise diğer organlarla karşılaştırıldığında Al'un beyinden çok daha yavaş uzaklaştırılabilmesi ve Al'un MSS'nde pek çok biyolojik reaksiyonu etkileyerek MSS üzerinde olumsuz etkilere sebep olmasıdır[46–50]. Etkilemiş olduğu biyolojik reaksiyonlar, aksonal taşınım ve sinaptik iletim, nörotransmitter sentezi, proteinlerin fosforilasyonu ve defosforilasyonu, proteinlerin yıkımı, çeşitli kanal proteinlerinin aktivasyonlarındaki değişimler, enerji metabolizmasındaki bozulmalar, enflamatuvar yanıtlar gibi MSS için hayati olan fonksiyonlar da dahil olmak üzere 200'den fazla biyolojik reaksiyonu içermektedir[46–50]. Al⁺³, negatif yüklü olan ligandlar için proton vericisi olarak davranarak DNA ve RNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanır ve beyin fonksiyonları için gerekli olan genlerin ifadelerini etkiler. Aynı zamanda ATP gibi hücre için enerji sağlayan bileşiklerin fosfat gruplarına bağlanarak enerji metabolizmasını da etkilemektedir. Frontal korteks, hipokampus ve korpus striatum beyinde Al birikiminin en fazla görüldüğü alanlardır [1,4]. Etkilemiş olduğu bu bölgelerden dolayı Al'un, uzamsal hafıza

eksikliği, duygusal süreçlerin etkilenmesi ile öğrenme ve hafıza ile ilgili fonksiyonları doğrudan etkilediği söylenebilir [47–49].

2.1.2. Alüminyumun Astrosit Hücreleri Üzerindeki Etkileri

Yapılan çalışmalarda Al maruziyeti sonucu MSS'nde fizyolojik süreçlerin işleyişini bozarak çeşitli hastalıklara sebep olduğu gösterilmiştir[51]. Astrositlerin bu süreçlerin devamlılığının ve uygun nöronal çevrenin sağlanıp korunmasında oldukça etkin bir şekilde rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle Al maruziyetinin astrositler üzerindeki etkilerinin araştırılması ve nörodejeneratif süreçlerde bu hücrelerin görevlerinin tartışılması önemli bir konu haline gelmiştir.

Al'un baskın formu Al^{+3} formudur. Al'un bu formu vücutta reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna sebep olan Fe^{+3} molekülleri ile yer değiştirmektedir. Bu özelliği ile Al'un astrositler üzerinde ROT gibi davrandığı düşünülmektedir [52].

Al'un astrositler üzerindeki etkilerinden bir diğeri, enerji metabolizmasında meydana getirdiği işlev bozukluklarıdır. Enerji metabolizmasının bozulması ise elektron transfer sisteminin aşağı doğru regülasyonu ile karakterize edildiği gibi, trikarboksilik asit döngüsü aktivitesinin önemli bir belirteci olan nikotinamid adenin dinükleotid-izositrat dehidrogenazın aşağı doğru regülasyonu yoluyla da ATP üretiminin azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir [53]. Alüminyuma bağlı bu tür mitokondriyal işlev bozukluklarının bir sonucu olarak astrositlerin dendrosit uzantılarında eksprese edilen aktin iskeletinin yeterli bir şekilde polimerize edilemediği ve bu sebeple Al'a maruz kalmış olan astrositlerin daha küresel bir hal aldığı bildirilmiştir [54,55]. Aynı zamanda alüminyum kaynaklı mitokondriyal enzimlerin işlevlerinin bozulması ile birlikte, yağ asitlerinin β -oksidasyonunda azalma ve lipit üretiminde artma gözlemlendiği bildirilmiştir [56].

Al aynı zamanda lipit çift tabakasını bozarak etki göstermektedir. Buradaki etkisini, fosfolipitlerin oksijence zengin olan hidrofilik kısımlarına bağlanarak göstermektedir. Bunun sonucu olarak hücre içinde kalan hidrofobik kısımlar ROT'ne maruz kalır. Bunun sonucunda AD ve PD patolojilerinin gözlemlendiği bildirilmiştir [57].

2.1.3. MSS Patolojilerinde *in vitro* Model Yaklaşımları

1907 yılında Ross Harrison tarafından sinir liflerinin kökenini anlamak amacıyla yapılan çalışmalarda MSS hasarlarının incelenmesi için ilk kez *in vitro* hücre kültürü modeli geliştirilmiştir. Bu çalışmalar *in vitro* ortam içerisinde fizyolojik koşulların taklit edilmesi ile biyolojik süreçlerin temsil edilmesini amaçlamıştır.

Çalışılan hücrelerin düz bir yüzeye tutunarak çoğalması temeline dayanan hücre kültürü iki boyutlu hücre kültürü olarak adlandırılmaktadır. İki boyutlu hücre kültürlerinin avantajı düşük maliyetli olmaları ve kültür koşullarının nispeten kolay olmasıdır.

Hücre kültürü çalışmalarında biyolojik süreçlerin temsil edilmesinde genellikle sınırsız bölünebilme yeteneğine sahip olan “hücre hatları” kullanılmaktadır. Hücre hatlarının en büyük avantajı herhangi bir genotipik ve fenotipik değişime uğramadan sınırsız bir şekilde çoğalabilmeleridir. Tercih edilen başka bir kültür yöntemi de primer izolasyon ile elde edilmiş hücrelerdir. Bu hücreler istenilen dokunun mekanik ve enzimatik olarak yıkımını içeren bir dizi işlemin ardından elde edilebilmektedir. Primer kültürün araştırmacılara sağladığı avantaj, istenilen her çeşit dokudan uygun işlemler ile hücrelerin izole edilebilmesidir. Bu kültür yöntemi ile saf bir şekilde istenilen hücrenin izole edilebilmesindeki yaşanan zorluk ve hücrelerin ömürlerinin sınırlı olması ise araştırmacıların önündeki en büyük engeldir. Primer hücrelerin belirli pasaj aralıklarında kullanılabilmesinin sebebi hücrelerin proliferasyon sürecinde geçirmiş olduğu genotipik ve fenotipik farklılaşmalardır. Bu sebeple primer hücreler belirli pasaj aralıklarında kullanılabilirler.

Tez çalışması kapsamında izolasyonu laboratuvarımızda optimize edilmiş olan primer sıçan kortikal astrosit hücreleri kullanılmıştır. İzole edilen astrosit hücreleri deneylerde kullanılmak üzere uygun sayıya ulaşabilmesi için çoğaltılmıştır. Hücrelerin çoğaltılması sürecinde bir kısmı -80 °C’de dondurularak saklanmıştır. Deneylerde pasaj iki ile dokuz arasındaki hücreler kullanılmıştır.

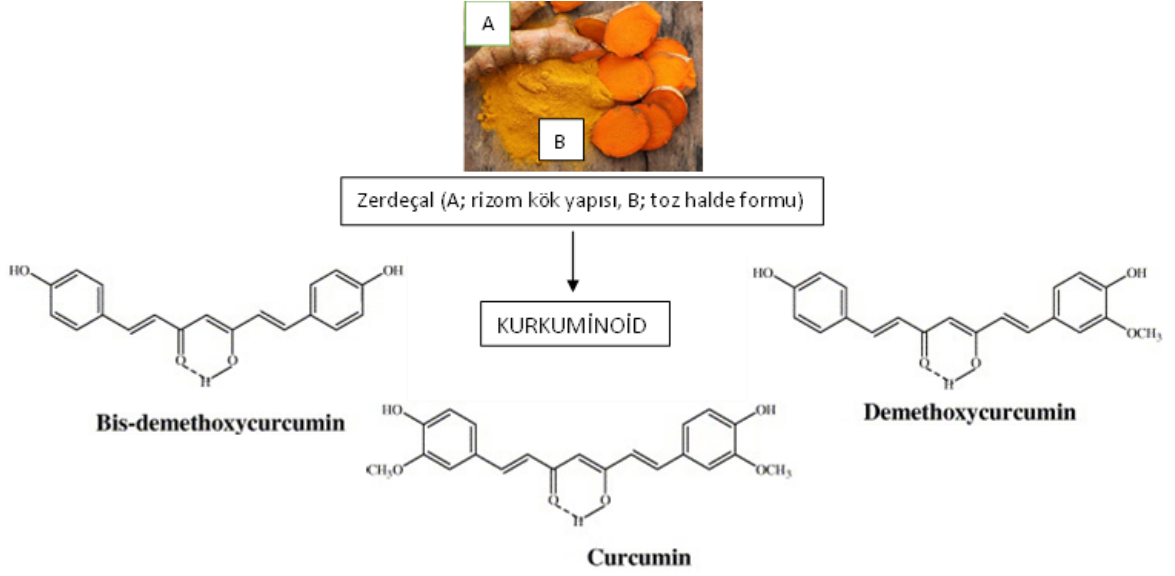
2.3. Kurkumin

Kurkumin, rizom gövde metamorfozuna sahip *Curcuma longa* (Familya: *Zingiberaceae*) bitkisinden elde edilen, yaygın olarak gıda endüstrisinde kullanılan zerdeçalın başlıca kurkuminoid içeriklerinden biridir [11]. Aynı zamanda geleneksel tıpta çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antimikrobiyal, antioksidan, antiamiloid, nöroprotektif ve serebral dolaşımı düzenleyici, antiapoptotik, immünmodülatör, yara iyileştirici, antidiyabetik, nöroprotektif, metal şelatlayıcı etkileri ortaya konulmuştur [11,58–61]. Ayrıca kullanımının güvenli, düşük maliyetli ve kolay ulaşılabilir olması terapötik ajan olarak tercih edilmesi konusunda oldukça umut vadetmektedir. Literatürde özellikle kanserli hücre hatları üzerinde oldukça yoğun çalışmalar yapılmış olup, nöroprotektif ve nöroterapötik etkilerinin de incelendiği görülmüştür. Ayrıca AD, PH, Huntington, Multiple Skleroz ve prion hastalıklarında nöroterapötik etkisi çalışmalarla gösterilmiştir [9,62–65].

Kurkuminin hidrofobik karakterli olması nedeniyle vücut sıvılarındaki çözünürlüğü oldukça düşüktür ve vücutta hızlı bir şekilde bozunmaya uğramaktadır. Bu özelliği terapötik ajan olarak kullanımının karşısındaki en büyük engeldir. Kurkuminin çeşitli şekillerde biyolojik yönden desteklenerek kullanılması hem bu engeli kaldırmakta hem de kurkuminin biyoyararlanımını arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda kurkuminin özellikle “piperin” ile birlikte kullanılmasının biyoyararlanım açısından daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir [9,15,62].

2.3.1. Kurkuminin Kimyasal Yapısı

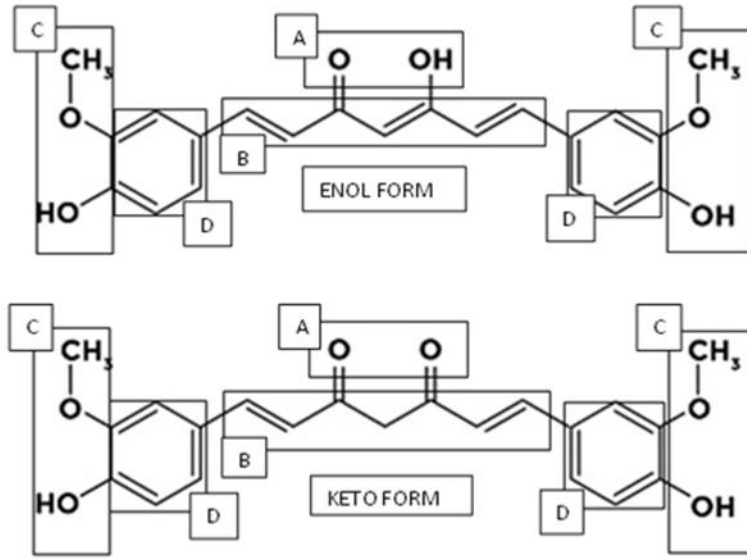
Zerdeçal, yaklaşık olarak %60-70 oranında kurkumin, %20-27 oranında demetoksikurkumin ve %10-15 oranında bisdemetoksikurkumin olarak üç temel aktif kurkuminoid bileşene sahiptir (**Şekil 2.3**). Kurkuminoid bileşenlerin kimyasal yapısındaki modifikasyonel değişimler ve içerdiği farklı fonksiyonel gruplar nedeniyle kurkuminin fizikokimyasal ve biyoaktif olarak etkinliğinin daha iyi olduğu gösterilmiştir [11].



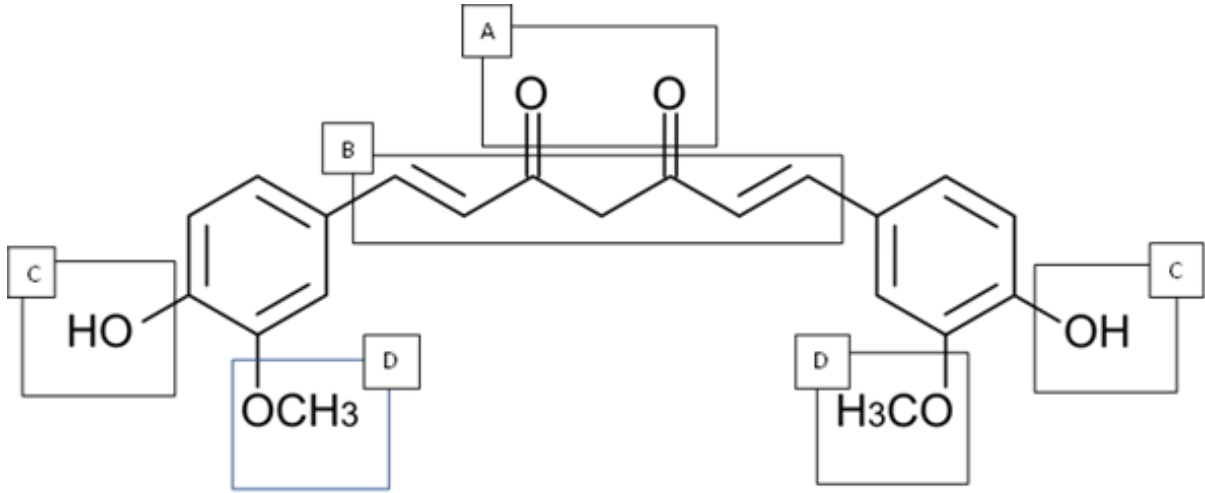
Şekil 2.3. Zerdeçalın aktif kurkuminoid formları

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry: IUPAC) adlandırma sistemine göre; 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione olarak adlandırılan kurkumin molekülü, yapısal olarak yedi karbonlu bağlayıcı bir zincir ve bu zincire bağlı olan üç ana fonksiyonel gruptan oluşmaktadır. Bu fonksiyonel gruplar; diketon motifi, yedi karbonlu bağlayıcı zincir ve zincire bağlı olarak bulunan fenol halkalarıdır (**Şekil 2.4**). Yapılan araştırmalarda fonksiyonel grupların, farklı biyolojik görevler üstlenen aktif bölgeler oldukları bildirilmiştir. Yedi karbonlu bağlayıcı zincir kurkuminin hidrofobik özelliğini sağlarken; antioksidan ve antikanser kapasitesi aromatik fenol halkaları ile ilişkilendirilmektedir (**Şekil 2.5**). Diketon motifi ise metaller ile bağlantı sağladığı gösterilmiştir [66].

Kurkumin molekülü farklı tautomerik formlarda bulunabilmektedir. Yapısında bulunan aromatik fenol halkaları, birbirine göre orto konumundaki metoksi ve hidroksi grupları ile işlevselleştirilebilir. Aromatik fenol halkaları, iki α , β -doymamış karbonil grubu içeren yedi karbonlu bir bağlayıcı ile birbirine bağlanır. Ortaya çıkan bu yapı ile birlikte bir β -diketon ve enol ile keto formu olmak üzere farklı tautomerik formlar oluşur [67].



Şekil 2.4. Kurkuminin iki yaygın formu olan enol ve keto formları. A; Diketon motifi, B; Yedi karbonlu α , β - doyamamış β - diketon bağlayıcısı, C; O- metoksi-fenolik grup, D; Fenol halkası



Şekil 2.5. Kurkuminin keto formu. A; Metal bağlayıcı bölge, B; Hidrofobik bölge, C; Antikanser aktivitesi, D; Antioksidan Etkisi

2.3.2. Kurkuminin Merkezi Sinir Sistemindeki Etkileri

MSS'de akson ve nöron kaybı ile sonuçlanan koşullar sonucunda nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Proteinlerin hatalı katlanması sonucu oluşan agregatlar nörodejeneratif hastalıkların en büyük sebeplerinden biridir. Kurkumin,

son yıllarda yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıkların tedavisi ve önlenmesi konusunda özellikle güçlü bir antioksidan ve antienflamatuar olması sebebiyle dikkat çekmektedir. Nörogenez aktivitesini artırarak, sinaptogenezi desteklediği bildirilmiştir [58].

Nörodejeneratif süreçlerde potansiyel risk oluşturduğu bilinen Al^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , As^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarına bağlanarak bileşik oluşturma kapasitesi ile metal şelasyonuna katkı sağlar [68]. Aynı zamanda metallerle bağ kurabilme kapasitesi nedeniyle A β ve tau gibi nörodejeneratif süreçlerde etkin olan protein agregatlarının da şelasyonuna katkı sağladığı bilinmektedir. Bakır ve mangan gibi bazı iyonlar ile kurmuş olduğu bağlar ise antioksidan etki göstermektedir [69].

Yuan ve ark. tarafından yapılan çalışmada kurkuminin, KBB'nde madde giriş çıkışlarından sorumlu olan sıkı bağlantı protein ifadelerini artırarak KBB düzenlenmesine katkı sağladığı belirtilmiştir [70].

2.3.2.1. Metal Şelatlama ve Anti-Amiloid Etkileri

Kurkuminin nörodejeneratif süreçlerde umut vadeci özelliklerinden biri antiamiloid etkisidir. Kimyasal yapısındaki β -diketon grubu, metaller ile ilişki kurmasını sağlayan kısımdır [69]. Kurkumin- metal kompleksinin kurulması hem kurkuminin biyostabilitesini artırır hem de metal iyonlarının biyolojik reaktivitelerini etkileyerek metallerin toksik etkilerini azaltır [71]. Bu bilgiler doğrultusunda kurkuminin özellikle AD patolojilerinde gözlemlenen A β ve tau proteinlerinin birikiminde etkili olarak, nörodejenerasyon sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir [72–77]. Bunun yanında, PH patolojilerinde görülen α -sinüklein, huntington hastalığı patolojilerinde görülen Huntingtin ve prion hastalıklarında prion proteinlerine bağlanarak toksik etkilerin azaltılmasında da etkindir [11,73].

2.3.2.2. Antioksidan Etkileri

MSS, diğer fizyolojik sistemlere kıyasla oksidatif strese karşı daha duyarlıdır. Bu durum MSS'nin yüksek metabolik hızının bir sonucu olarak daha fazla oksijene ihtiyaç duyması, daha düşük antioksidan ve membran fosfolipitleri ile çoklu doymamış yağ asitlerinin azlığı ile açıklanabilir [78]. Bu faktörler ise enflamasyon,

mitokondriyal disfonksiyon ve ROT ile peroksinitrit seviyelerinin artmasıyla sonuçlanmaktadır. MSS'de görülen yanlış katlanmış protein agregasyonlarının da kronik oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir [79].

Kurkumin, oksidatif olan süperoksit anyonlarının ve hidroksil radikallerinin seviyesinin düşmesini sağlayarak, glutatyon, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S- transferaz aktivasyonlarının düzenlenmesi ile birlikte beyin antioksidan enzim sistemlerinin stabilizasyonunu sağlamaktadır [80,81]. Aynı zamanda bu etkileri ile hücreleri lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein oksidasyonu ile protein karbonilasyonundan koruduğu da bildirilmiştir [82].

2.3.2.3. Antienflamatuar Etkileri

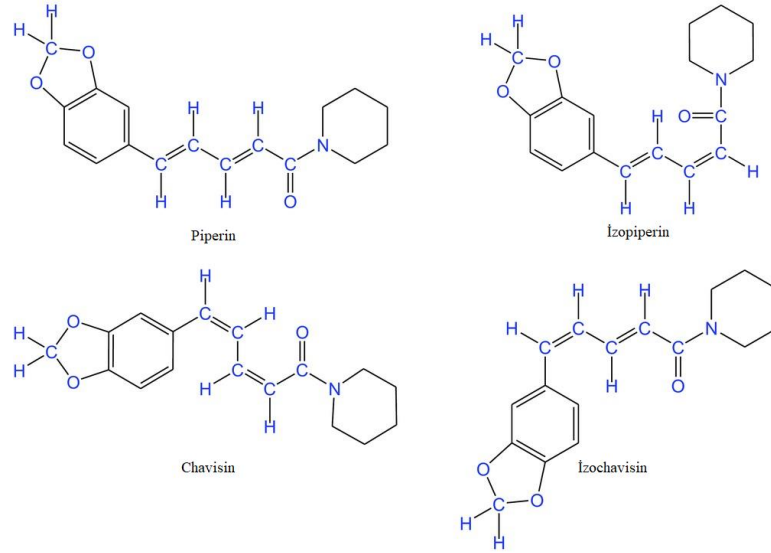
Kurkuminin MSS üzerindeki nörodejeneratif süreçlerde bir diğer önemli etkisi antienflamatuar kapasitesidir. Bu etkisini çeşitli sitokin, kemokin, bunlarla ilişkili olan sinyal yollarının modülasyonu, enflamatuar transkripsiyon faktörleri, enflamatuar enzimleri ve proteazlarının modülasyonu ile sağlamaktadır [61,83]. Enflamatik süreçlerde sıklıkla görülen IL-6, TNF- α ve IL-1 β gibi çeşitli proenflamatuar sitokinlerin düzeyini azaltırlar [84]. Biswas ve ark. tarafından yapılan çalışmada, kurkuminin nöroenflamatuar bir protein olan nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) proteininin düzeyini azaltarak güçlü bir antioksidan özelliği gösterdiği bildirilmiştir [85]. Aynı zamanda kurkuminin, proenflamatuar yolları engelleyebildiği bilinen peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama (PPAR γ) agonisti olduğu bildirilmiştir [86].

2.4.Piperin

Piperin, *Piper nigrum* ve *Piper longum* (Familya: *Piperaceae*) türlerinden elde edilen, yaygınlıkla gıda endüstrisinde kullanılan karabiberin başlıca etken maddelerinden biridir. Aynı zamanda Çin ve Hint geleneksel tıbbında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Alkaloid kökenli olması nedeniyle karabiberin keskin tadını sağlamaktadır [16]. Yapılan çalışmalarda antienflamatuar, antikanser, antiviral, antiamiloid, antidepresan, antiapoptotik, immünomodülatör, nöroprotektif gibi önemli etkilerinin yanı sıra "biyogüçlendirici" karakterli bir bileşik olduğu gösterilmiştir [16,17,87].

2.4.1. Piperinin Kimyasal Yapısı

Piperaceae türlerinin içermiş olduğu piperin miktarı değişken olmakla birlikte içeriğinin yaklaşık %4-9 oranında olduğu bilinmektedir [88]. Bu oranların iklim, kurutma koşulları ışığa maruz kalma süresi ve yoğunluğu gibi fiziksel faktörlerden etkilenebileceği bildirilmiştir [89]. Karabiberin dört izomerik formu bulunmaktadır; piperin, izopiperin, chavisin, izochavisin (**Şekil 2.6**). Ancak bu izomerik formların farmokinetik olarak aktif içerikler olmadığı gösterilmiştir. Işığa maruz kalma yoğunluğu ve zamanı arttıkça, bu farklı izomerik formların izomerizasyonunun arttığı bildirilmiştir [17].



Şekil 2.6. Karabiberin izomerik formları

IUPAC adlandırma sistemine göre; (2E, 4E)-5-(benzo[d] [1,3] dioxol-5-yl)1-(piperidin-1-yl) penta-2,4-dien-1-one olarak adlandırılan piperin molekülü, kimyasal olarak üç ana fonksiyonel birimden oluşmaktadır. Bu ana fonksiyonel birimler; amid işlevi gören α , β - doymamış karbonil motifi, piperonal çekirdek olarak da adlandırılan 1,3-benzodioksol grubu ve tüm fonksiyonel grupları birbirine bağlayan bütadien zincirinden oluşmaktadır [16,90].

2.4.3. Biyogüçlendirici Etkileri

Bir maddenin biyogüçlendirici karakterli olması, birlikte kullanıldığı biyolojik ajanların suda çözünürlüğünü, doku içerisindeki dağılım ve emilimini arttırmaya yönelik işlevselliği ile ilgilidir. Aynı zamanda biyolojik ajanlarının daha az miktarlarda kullanılmasına olanak sağlayarak, biyolojik ajanların toksik etkilerini azaltabilirler [91].

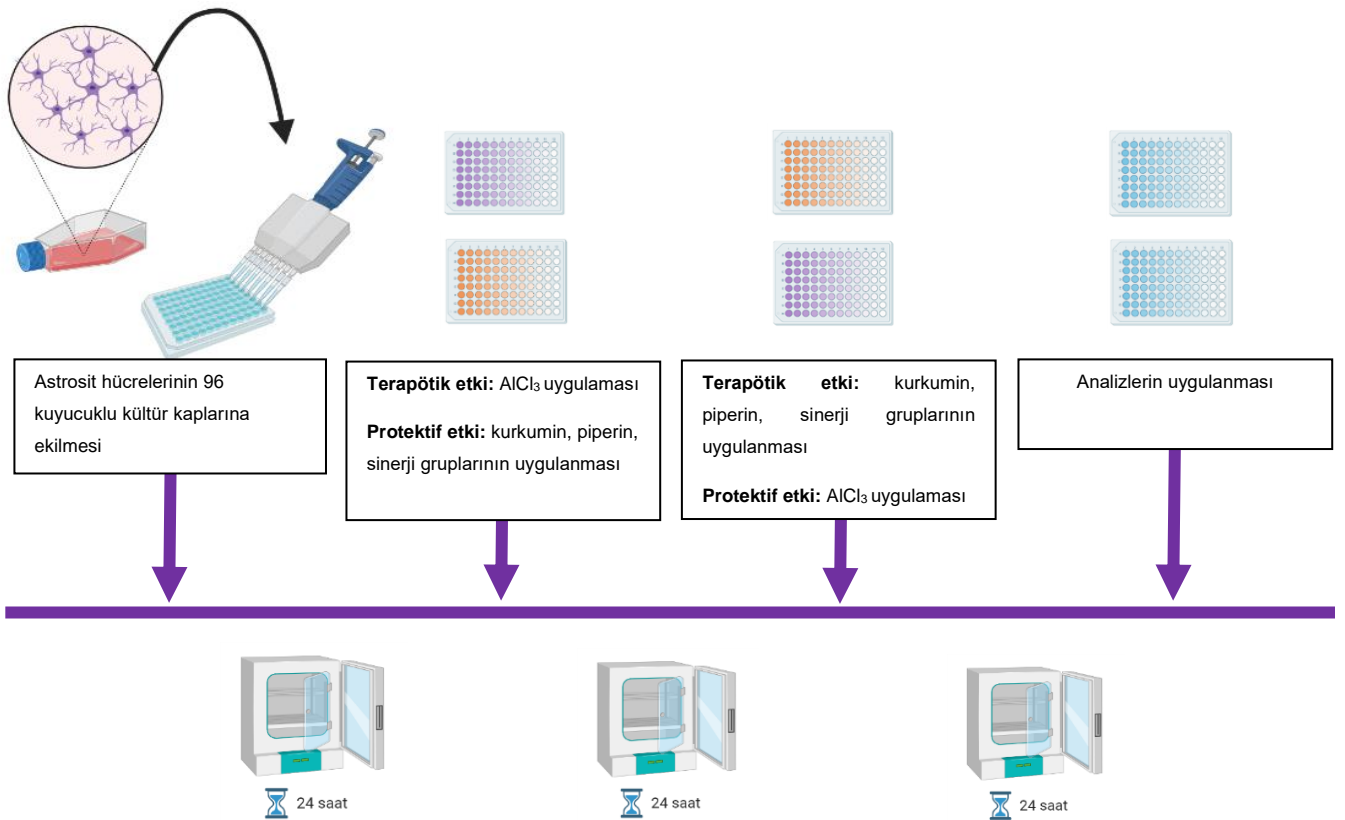
Piperinin ilk kez biyolojik olarak biyogüçlendirici karakterdeki davranışı 1929 yılında Bose tarafından gösterilmiştir. Bose, *Adhatoda vasica*'nın *Piper longum* ile birlikte kullanımının, astım tedavisindeki etkilerini arttırdığını belirtmiştir [91]. Artan çalışmalarla birlikte piperinin ksenobiyotik ajanlarla birlikte kullanımının biyoyararlanımı arttırdığına yönelik birçok kanıt elde edilmiştir [89].

Literatürde kurkumin ile piperinin sinerjik olarak kullanılmasının, kurkuminin biyoyararlanımını arttırdığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Ancak Al ile muamele edilmiş astrosit hücreleri üzerinde kurkumin-piperin etkileşimi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunamamıştır.

Bu bilgiler ışığında yapılan tez çalışması kapsamında primer olarak izole edilen astrosit hücrelerinde kurkumin ve piperinin Al hasarına karşı protektif ve terapötik etkileri, kurkumin ile piperinin birlikte kullanımının, kurkuminin biyoyararlanımını arttırıp arttırmadığı ve piperinin biyogüçlendirici etkileri tartışılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel aşamalar ile ilgili bilgilere yer verilmiştir. Çalışmada öncelikle primer kortikal astrosit hücrelerinden önce fibroblast hücreleri üzerinde alüminyumun etkisi ve bu etki üzerinde koruyucu ve terapötik etkileri tartışılan kurkumin ve piperinin uygun konsantrasyonların saptanmıştır. *Koruyucu (protektif) etkinin* tartışılabilmesi için kurkumin ve piperin ile 24 saat süre ile muamele edilmiş olan astrosit hücrelerine $AlCl_3$ ve *terapötik etkinin* tartışılabilmesi için 24 saat süre ile $AlCl_3$ ile muamele edilmiş olan astrosit hücrelerine kurkumin ve piperin uygulamaları yapılmıştır. Aynı zamanda literatürde “biyogüçlendirici” olarak anılmakta olan piperinin Al hasarında astrositler üzerinde kurkuminin biyoyararlanımını destekleyip desteklemediği tartışılmıştır. Primer kortikal astrosit hücrelerinde Al maruziyeti terapötik etki bakımından; hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz belirlenmesi ve protektif etki bakımından bu analizlere ek olarak IL- 6 ve TGF- β sitokin analizleri çerçevesinde değerlendirilmiştir (**Şekil 3.1.**).



Şekil 3.1. Deney akış şeması

3.1. Kimyasal Maddeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler: *Metilen mavisi* (CAS Number: 28983-56-4, SigmaAldrich, Almanya), *Fosfat tampon çözeltisi* (Phosphate Buffered Saline: PBS) (P4417- 50TAB, SigmaAldrich, Almanya), *Penisilin/ Streptomisin (P/S)* (CAS Number: 3810-74-0 SigmaAldrich, Almanya), *Kollajenaz* (Cat Number: CI-28 Biochrom AG, Almanya), *Fetal Sığır Serumumu (FBS)* (Cat Number S1810- 500, Biowest ABD), *Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM- F12)* (Cat Number:L0092-500, Biowest,ABD), *Poly-D-Lizin (PDL)* (Cat Number: A3890401, Thermo Fisher Scientific, ABD), *%0.25 Tripsin-EDTA* (CAS Number: 9002-07-7, SigmaAldrich, Almanya), *Dimetil sülfoksit (DMSO)* (CAS Number: D2650, SigmaAldrich, Almanya), *Anti-GFAP antikoru* (sc- 33673, Santa-cruz, ABD), *Triton-X-100* (CAS Number: 9002-93-1i SigmaAldrich, Almanya), *Goat Anti-Mouse IgG Teksas Red* (IgG-TR, sc-2781, Santa Cruz, ABD), *4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)* (CAS Number: D9564, SigmaAldrich, Almanya), *AlCl₃* (CAS Number: 7446-70-0), *Kurkumin* (CAS Number: 458-37-7, SigmaAldrich, Almanya), *Piperin* (CAS Number: 94-62-2, Across Organics, ABD), *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)* (CAS Number: 298-93-1, SigmaAldrich, Almanya), *izopropil alkol* (CAS Number: 109634, Merck Milipore), *Akridin orange (AO)* (CAS Number: 65-61-2, SigmaAldrich, Almanya), *Propidyum iyodür (PI)* (CAS Number: 25535-16-4, SigmaAldrich, Almanya), *metanol* (CAS Number: 67561, Merck Milipore), *paraformaldehit* (CAS Number: 30525-89-4, Merck Milipore), *tripan mavisi* (Cat Number: L 6323, Biochrom AG, Almanya).

3.2. Deney Hayvanları

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Cerrahi İşlemler

Tez çalışması kapsamında uygulanan tüm cerrahi prosedürler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun aldığı 2020/10-04 sayılı kararı ile gerçekleştirilmiştir. İlgili etik kurul kararı **EK-1**'de sunulmuştur.

Etik kurul kararı ile *Rattus norvegicus* türü Wistar albino ırkına ait dört adet sıçanın (üç adet dişi, bir adet erkek) çiftleşmesinden elde edilen, dokuz adet neonatal üç günlük yavru çalışma kapsamında kullanılmıştır.

Çiftleştirme kafesi bir erkek ve üç dişi sıçandan oluşturulmuş ve bir hafta süre ile takip edilmiştir. Gebelik zamanının tayini için vajinal plak ve vajinal yayma preparatı ile sperm takibi yapılmıştır. Vajinal yayma preparatı, sürüntü örneklerinin metilen mavisi ile boyanmasının ardından mikroskop ile incelenmiştir. Vajinal plağın ilk görüldüğü ve yayma preparatta spermin ilk gözlemlendiğı gün gebeliğın 0. günü olarak kabul edilmiştir. Gebe sıçanların günlük olarak takip ve bakımları sağlanmış olup, *ad-libitum* olarak beslenmeleri sağlanmıştır.

3.2.2. Primer Astrosit Hücrelerinin İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

3.2.2.1. Transfer Solüsyonunun Hazırlanması

Primer kortikal astrosit izolasyonunun ilk basamağı olan beyin dokusunun izolasyonundan hücre kültürü aşamasına kadar geçen süreçlerde beyin dokusunun muhafaza edildiğı ve işlemlerin yapıldığı transfer solüsyonu olarak %4 P/S içeren PBS hazırlanmıştır.

3.2.2.2. Tripsin ve Kollajenaz Enzimlerinin Hazırlanması

Enzimatik reaksiyonun sağlanabilmesi için tripsin ve kollajenaz enzimleri kullanılmıştır.

- 10X tripsin stok solüsyonu, 1:10 oranında PBS ile seyreltilmiştir.
- Kollajenaz, konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözdürülmüştür.

Hazırlanan enzim solüsyonları kontaminasyon riskinin en aza indirilebilmesi amacıyla 0.22 µM filtre (ISOLAB, LB.IS.094.07.001) ile süzölmüştür.

3.2.2.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

Primer kortikal astrosit hücre izolasyonunu takiben ilk kullanılacak olan besiyeri, antibiyotik içeriğı yüksek olan besi ortamıdır (%10 FBS ve %2 P/S içeren DMEM-

F12). İlk besiyeri değişimi ile sonrasında hücrelerin takip edilmesi için %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM- F12 besiyeri kullanılmıştır.

3.2.3. Petrilerin Poly-D-Lizin ile Kaplanması

İzole edilen primer kortikal astrosit hücrelerinin hücre kültürü kaplarına tutunması ve morfolojik şekillerini alabilmesini kolaylaştırabilmek için kültür kaplarının yüzeyleri hücre dışı matriksi olan Poly-D-Lizin (PDL) solüsyonu ile kaplanmıştır. PDL stok solüsyonu, steril su içerisinde; 1 ml/ 50 µg olacak şekilde hazırlanmıştır.

PDL solüsyonu kaplama yapılmak istenilen kültür kaplarına, yüzeyi tamamen örtecek miktarda eklenerek bir saat süre ile çalışma kabini içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından PDL solüsyonu, kaplama yapılan yüzeylerden dikkatlice toplanmıştır. Yüzey üç kez distile su ile iyice yıkanmıştır. Distile su aspire edildikten sonra kaplama yapılan kültür kaplarının ağızları açık olacak şekilde, çalışma kabini içerisinde yaklaşık iki saat süre ile bırakılarak kuruması sağlanmıştır. Kuruması tamamlanan kültür kapları hücre ekimi için hazır hale gelmiştir.

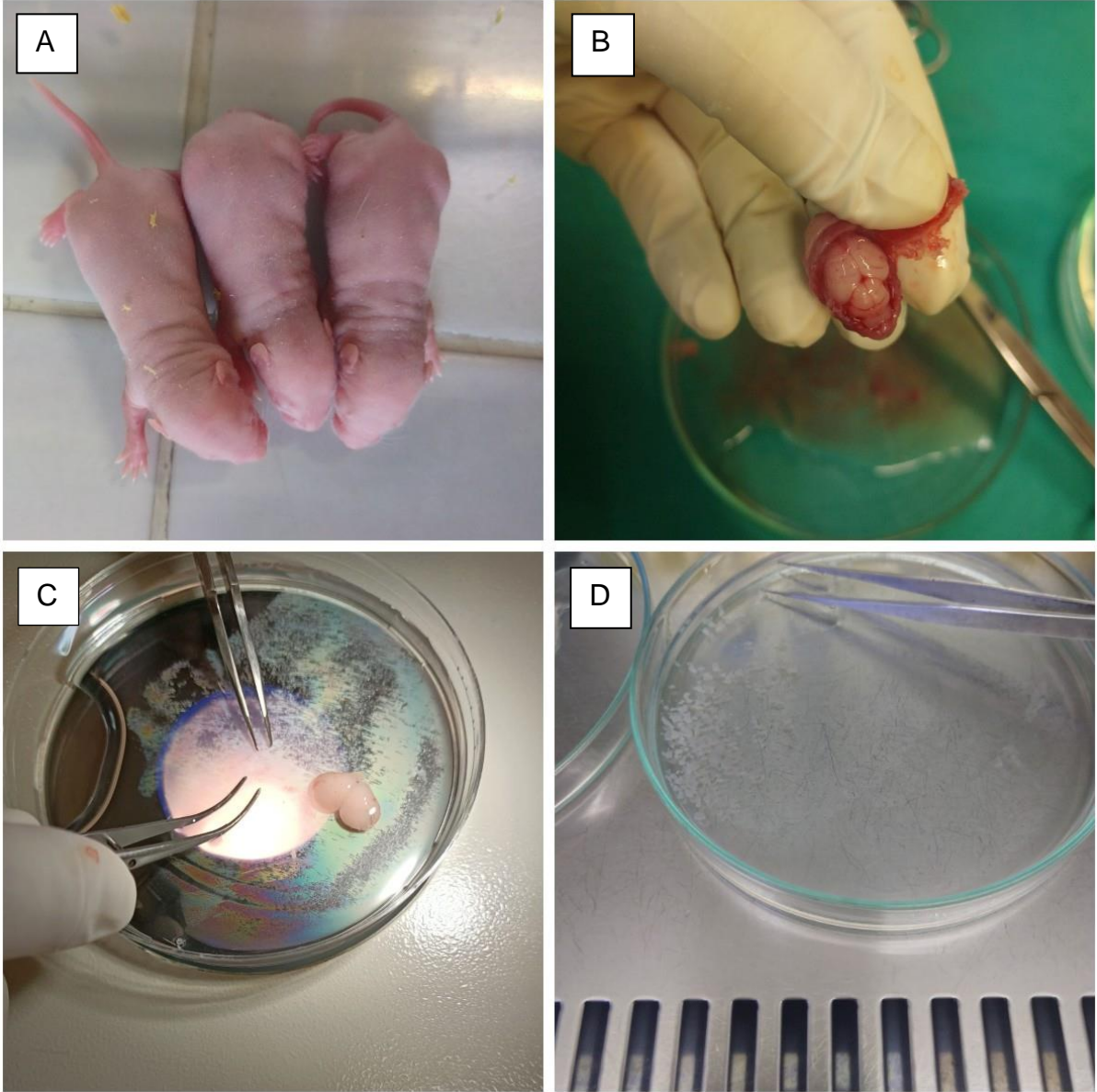
3.3. Karışık Glial Kültür İzolasyonu ve Kültürasyonu

3.3.1. Primer Karışık Glial Hücre İzolasyonu

İzolasyondan önce kullanılacak olan tüm malzemeler steril edilmiştir. Deneyleerin yürütüleceği laboratuvar temizlenerek ultraviyole ışığı ile bir saat steril edilmiştir.

Neonatal üç günlük sıçan yavrularının steril koşullarda dekapitasyonu sağlanmıştır. Beyin dokusu, dekapitasyonu takiben kafatası içinden dikkatlice çıkarılmıştır. İzole edilen beyinler, yüksek oranda antibiyotik içeren soğuk (0°C) transfer solüsyonu içine alınmıştır. Ardından dokular temiz transfer solüsyonu içeren petriye aktarılarak, diseksiyon mikroskobu altında serebellum, striatum ve oksipital lob bölgeleri uzaklaştırılmıştır. Elde edilen korteks dokuları menenj tabakasından arındırılarak transfer solüsyonu içeren başka bir petriye aktarılmıştır. Dokuların steril bistüri kullanılarak mekanik olarak parçalanmaları sağlanmıştır (**Şekil 3.2.**). Küçük parçalara ayrılan dokular, içinde 5 ml transfer solüsyonu bulunan 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Birkaç dakika dokuların dibe

ökmesi beklenmiştir. Dibe çöken dokuların üzerinde bulunan transfer solüsyonu dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Enzimatik reaksiyon için daha önceden 37°C'ye ısıtılmış olan 1X Trypsin ve kollejenaz solüsyonlarının her birinden 250'şer µL olacak şekilde tüplere eklenmiştir. Elde edilen doku-enzim süspansiyonu transfer solüsyonu ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Tüplerin ağızları parafilmlelenerek 37°C'de ve %5 CO₂-%95 O₂'de standart kültür koşullarını sağlayan etüvde enzimatik reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Böylelikle hücrelerin arasını dolduran ve doku bütünlüğünü sağlayan ekstraselüler matriks elemanlarının parçalanması sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından dokular 1200 RPM'de 5 dakika süre santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak dokuların üzerine 5 ml %10 FBS ve %2 P/S içeren DMEM- F12 besiyeri eklenmiştir. 10 ml'lik cam pipet ile pipetaj yapılarak dokuların mekanik olarak parçalanması sağlanmıştır. Ardından 1ml'lik cam pipet ile pipetaj yapılarak tüm dokuların parçalanması ve hücrelerin homojenizasyonu sağlanmıştır. Doku-besiyeri homojenatı 40 µM por boyutuna sahip olan filtreden (Lot Number: 3151582, BD Falcon, ABD) geçirilmiş ve PDL kaplama yapılmış olan kültür kaplarına ekimi sağlanmıştır. İlk besiyeri değişimi, ekimden sonraki 2. günde yapılmıştır.



Şekil 3.2. Primer Astrosit İzolasyon Aşamaları. A; 3 günlük neonatal sıçan yavruları, B; dekapitasyonu takiben beyin dokusunun izolasyonu, C; Korteks dışındaki alanlarından ve menenj tabakasından arındırılmış korteks dokusu, D; beyin dokusunun mekanik olarak küçük parçalara ayrılması

3.3.2. Primer Astrosit Hücrelerinin Kültürasyonu ve Zenginleştirme İşlemi

Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra kültürde astrosit hücreleri dışında bulunabilecek diğer hücrelerin (oligodendrositler ve mikroglialar) uzaklaştırılabilmesini sağlamak amacıyla “astrosit hücresi zenginleştirme işlemi” aşağıdaki protokole göre uygulanmıştır (**Şekil 3.3.**).

1. Kültür kaplarının ağızları parafilmlelenmiştir.
2. Kültür kapları masaüstü çalkalayıcıya (İsoLab, Mikroplak alkalayıcı) sabitlenerek 180 RPM'de 30 dakika süre ile tutulmuştur.
3. 30 dakikanın tamamlanmasının ardından kültür kapları çalışma kabini içine alınarak besiyeri değişimi sağlanmıştır.
4. Flaskların ağızları parafilmlelenerek masaüstü alkayıcıda 240 RPM'de 6 saat süre tutulmuştur.
5. Srenin dolmasının ardından kültür kapları çalışma kabini içine alınarak bir dakika boyunca yatay hareketlerle hızlıca çalkalanmıştır.
6. Besiyeri uzaklaştırılarak kültür kaplarının PBS ile yıkanması sağlanmıştır.
7. Hücrelerin bulunduğu yüzeylerden kaldırılabilmesi için kültür kaplarına %0.25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek beş dakika süre ile etüvde inkübasyonu sağlanmıştır.
8. İnkübasyon süresinin sonunda enzim inaktivasyonu FBS içeren besiyeri ortamı ile sağlanarak 180 G'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant uzaklaştırılmıştır.
10. Doku peleti 5 ml besiyeri ile süspanse edilerek kaplama yapılmamış kültür kaplarına ekimi sağlanmıştır.

Tüm bu işlemlerden sonra deneylerin tasarlanmasına kadar olan süreçte hücrelerin her iki günde bir besiyeri değişimi sağlanmıştır. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında, bir kısmı pasajlanmış; bir kısmı ise dondurularak saklanmıştır.



Şekil 3.3. İzolasyon sonrası ekimi sağlanan hücre kültür kaplarının çalkalayıcı üzerinde tutularak “astrosit zenginleştirme işleminin” gerçekleştirilmesi.

3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Primer kortikal astrosit hücreleri yüzeylere yapışarak yaşam döngülerini sağlayan hücrelerdir. Bu nedenle pasajlama ve dondurma işlemlerinin yapılabilmesi için öncelikle yapışık olarak buldukları yüzeylerden ve hücrelerin kendileri aralarında yapmış oldukları bağların ayrılması gerekmektedir. Bu işlem enzimatik reaksiyon ile sağlanmıştır.

Hücreler %80-85 yoğunluğa ulaştıklarında buldukları besiyeri ortamı aspire edilmiştir. Hücrelerin üzerine bir miktar PBS eklenerek ortamda yıkama işlemi sağlanmıştır. PBS solüsyonu aspire edilerek hücrelerin üzerine yeterli miktarda %0.25 tripsin- EDTA solüsyonu eklenmiştir. 5 dakika süre ile hücrelerin etüvde inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin buldukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskopta (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya) kontrol edilmiştir. Hücreler süspansiyon haline geldikten sonra enzimin inaktivasyonunun sağlanabilmesi için %10 FBS içeren besiyeri ortamı hücre süspansiyonu üzerine eklenerek 15 ml'lik tüplere toplanmıştır. Tüpler, 800 RPM'de santrifüj edilerek hücrelerin pelet oluşturmasını sağlanmıştır. Santrifüjün ardından oluşan süpernatant uzaklaştırılarak taze besiyeri ile hücreler süspansiyon

edilmiştir. Taze besiyeri ile süspansiyon edilen hücrelerin yoğunluğuna uygun şekilde yeni kültür kaplarına ekimi sağlanmıştır.

3.3.4. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Çözdürülmesi

Uygun yoğunluğa ulaşan hücrelerin dondurularak saklanabilmesi için **3.3.2.**' de anlatılan hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kaldırılması ve santrifüj sonrası hücre pelleti eldesi basamakları uygulanmıştır. Hücre pelleti literatürde en sık kullanılmakta olan %5 DMSO - %95 FBS oranına sahip hücre dondurma vasatı ile süspansiyon edilerek, kriyotüpe aktarılmıştır. Oluşturulan kriyotüpler kademeli dondurma kabı içine konularak, -80 °C'de saklanmıştır. Bir gün sonra sıvı azot (-196°C) tankına alınarak deneylerde kullanılana kadar saklanmıştır.

3.4. Primer Astrosit Hücrelerinin Karakterizasyonu

Primer olarak izole edilmiş olan kortikal astrosit hücrelerinin karakterizasyonu için Glial fibriller asidik proteinini (GFAP) hedefleyen Anti-GFAP antikorunu kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. GFAP; ara filament proteinlerinin tip 3 alt sınıfına ait bir ara filamenttir. Spesifik olarak astrositlerde ekspresyon edilmektedir. Karakterizasyon için pasaj ikideki hücrelerin üzerinden besiyeri toplanarak PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücrelerin fiksasyonu, -20°C soğuklukta metanol ile 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmesi ile sağlanmıştır. Metanol ortamdan havada kurutularak uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından %0.1 Triton-X-100 3 dakika süre ile hücrelere uygulanarak hücre membranlarının permeabilitesi artırılmıştır. Triton-X-100 ortamdan uzaklaştırılarak 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır. İmmünooglobülin G (IgG)'nin spesifik bağlantılarını engelleyebilmek amacıyla hücreler, 30 dakika süre ile %10 engelleyici/ sınırlandırıcı serum ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda serum ortamdan uzaklaştırılarak 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapılmıştır. Primer antikor, 1:200 oranında hücrelerin yüzeyini kaplayacak oranda ortama konularak gece boyu +4°C'de karanlık ortamda hücreler ile inkübasyonu sağlanmıştır. Bir sonraki gün primer antikor ortamdan uzaklaştırılarak, 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Sekonder antikor; Goat Anti- Mouse IgG Teksas Red olarak belirlenmiş ve 1:100 oranında

hazırlanmıştır. Yıkama işlemleri sonrasında, sekonder antikor bir saat boyunca karanlık ortamda ve oda sıcaklığında uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda, sekonder antikor ortamdan uzaklaştırılarak 3 kez 5'er dakika süre ile PBS yıkaması yapılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması DAPI kullanılarak yapılmıştır. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hücrelerin görüntülenmeleri inverted mikroskopta gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kimyasalların Hazırlanması

Deneylerde kullanılan kimyasal solüsyonlar, deneylerden hemen önce taze bir şekilde hazırlanarak kullanılmıştır. Tüm kimyasal solüsyonlar, kontaminasyon riskini en aza indirebilmek için hazırlandıktan sonra 0,22 µM filtreden süzülerek deneylerde kullanılmıştır.

3.5.1. AlCl₃ Stok ve Uygulama Konsantrasyonlarının Hazırlanması

AlCl₃ toz halde bulunan ve oda sıcaklığında saklanabilen bir maddedir. Deneylerde kullanılmak üzere aşağıda tarif edilen şekilde hazırlanmıştır:

0,02 g AlCl₃ hassas tartıda tartılarak 10 ml steril distile su içinde vortekslenerek çözdürülmüştür. Stok çözeltinin konsantrasyonu 15.000 µM olacak şekilde hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılan konsantrasyonlar hazırlanan stok çözeltiden %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM- F12 besiyeri ortamında seyreltilerek elde edilmiştir.

3.5.2. Kurkumin Stok ve Uygulama Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Kurkumin toz halde, sarı ile turuncu arasında bir pigmente sahip bir maddedir. Saklama koşulları -20°C'dir. Deneylerde kullanılmak üzere aşağıda tarif edilen şekilde hazırlanmıştır:

0.001 g kurkumin hassas tartıda tartıldıktan sonra DMSO içinde vortekslenerek çözdürülmüştür. Son hacim %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-F12 besiyeri ortamı ile 2 ml'ye tamamlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonu; 1357.30 µM'dür. Deneylerde kullanılacak olan konsantrasyonlar hazırlanan stok

çözeltiden besiyeri ortamı ile seyreltilerek elde edilmiştir. Deneyleerde kullanılan konsantrasyonlar için DMSO oranı 1:1000'den daha düşüktür.

3.5.3. Piperin Stok ve Uygulama Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Piperin toz halde bulunan bir madde olup oda sıcaklığında saklanabilmektedir. Deneyleerde kullanılmak üzere aşağıda tarif edilen şekilde hazırlanmıştır:

0,1 g piperin hassas tartıda tartıldıktan sonra 3 ml alkol içinde vortekslenerek çözdürülmüştür. Hazırlanan stok çözeltinin konsantrasyonu 117.000 μM 'dür. Deneyleerde kullanılacak olan konsantrasyonlar, hazırlanan stok çözeltiden %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM- F12 besiyeri ortamı ile seyreltilerek elde edilmiştir. Deneyleerde kullanılan konsantrasyonlar için alkol oranı 1:1000'den daha düşüktür.

3.6. Deney Gruplarında Kullanılacak Olan Konsantrasyonların Tayini

Deney gruplarının kurulmasında kullanılacak olan konsantrasyonların tayin edilebilmesi için literatürden elde edilen verilere göre belirlenen konsantrasyon aralıkları, L929 fare fibroblastik hücre hattı (ATCC) üzerinde uygulanmıştır. Bu basamakta L929 hücre hattının kullanılmasının nedeni; primer hücre kültürünün kısıtlı sayıda bölünebilme yeteneğine sahip olması nedeniyle sınırlı sayıda kullanıma olanak tanınmasıdır. Bir diğer neden ise primer hücre izolasyonu ve kültüre edilmesinde karşılaşılan zorluklardır. Bu sebeple primer hücre izolasyonu için hayvan kullanımının en aza indirilmesi amaçlanmış ve sınırsız bölünme yeteneğine sahip olan L929 hücre hattı kullanılmıştır. L929 hücre hattı ve primer astrositler için kullanılan besiyeri içeriği; %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-F12'dir.

Hücre canlılığının belirlenebilmesi için kullanılan yöntem; kolorimetrik bir yöntem olan MTT analiz yöntemidir. MTT yoğun sarı renkli formazan bir tuzdur. Hücrelerin çoğalması sırasında artan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi MTT'yi suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristal yapılar, polar çözücülerde çözünerek hücrelerde üretilmekte olan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi miktarına göre pembe-mor renklere bir çözelti

oluşturmaktadır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak analiz edilerek hücre canlılığı tayin edilmektedir. Güvenilir, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olması nedeniyle araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir.

Hücre canlılığı *kurkumin* ve *piperin* için 24, 48 ve 72. saatlerde L929 hücre hattı üzerinde MTT analizi yapılarak ölçülmüştür. *Al* için hücre canlılığı ise 24. saatte L929 ve primer astrosit hücreleri üzerinde MTT analizi yapılarak belirlenmiştir (*L929 hücre hattında tespit edilen IC50 değeri primer astrosit hücrelerinde etkisiz kalmıştır. Bu nedenle primer astrosit hücrelerinde tekrardan Al'un IC50 değeri tespit edilmiştir.*)

Belirlenen konsantrasyonların uygulanmasını takiben, 96 kuyucuklu kültür kapları içerisindeki besiyeri toplanarak hücrelerin üzerine %10 MTT-DMEM solüsyonu içeren serumsuz besiyeri eklenerek dört saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂-%95 O₂'de koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından MTT solüsyonu uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µL isopropanol alkol eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve oluşan formazan kristallerinin çözünür hale gelerek renkli bir solüsyon oluşturması sağlanmıştır. Örneklerin 570 nm'de ELISA okuyucu (µQuant™, BiotekW Instruments Inc, USA) cihazında absorbans değerleri okunmuştur. % hücre canlılık oranı, kontrol grubu (L929 hücre hattı üzerinde herhangi bir konsantrasyon denemesi yapılmayan grup) değerleriyle kıyaslanarak belirlenmiştir.

3.6.1. Alüminyum Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi

Al için belirlenmiş olan 200, 400, 800, 1000, 2000, 4000, 8000 ve 10000 µM konsantrasyonlarının uygulanabilmesi için, L929 hücre için 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucuk 1×10⁴ hücre ve astrosit hücreleri için her bir kuyucuk 5×10³ hücre içerecek şekilde ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri toplanmıştır. Her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde, besiyeri içinde hazırlanan konsantrasyonlar uygulanmıştır. Konsantrasyonların uygulanmasının ardından hücreler 24 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂-%95 O₂'de standart kültür koşullarını sağlayan etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda MTT analizi ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

MTT analizi sonucunda elde edilen veriler, istatistiksel bir yazılım olan GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) kullanılarak yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) değeri hesaplanmıştır.

3.6.2. Kurkumin Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi

Kurkumin için belirlenmiş olan 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonların uygulanabilmesi için, L929 hücre hattı 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucuk 1×10^4 hücre içerecek şekilde ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri toplanmıştır. Her bir kuyucuğa 100'er μL olacak şekilde, besiyeri içinde hazırlanan konsantrasyonlar uygulanmıştır. Konsantrasyonların uygulanmasının ardından hücreler uygun sürelerde 37°C 'de ve %5 CO_2 -%95 O_2 'de etüvde standart kültür koşullarını sağlayan inkübe edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda MTT analizi ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

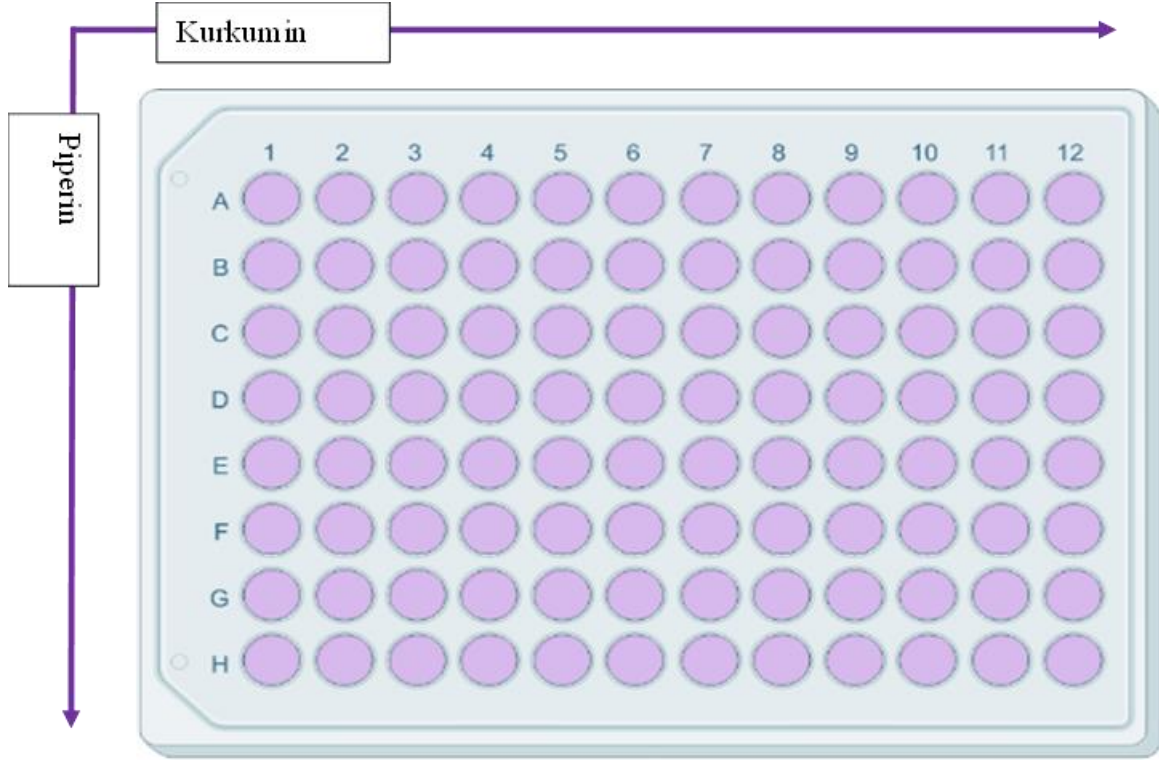
3.6.3. Piperin Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi

Piperin için belirlenmiş olan 1, 2,5, 5, 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonların uygulanabilmesi için, L929 hücre hattı 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucuk 1×10^4 hücre içerecek şekilde ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri toplanmıştır. Her bir kuyucuğa 100'er μL olacak şekilde, besiyeri içinde hazırlanan konsantrasyonlar uygulanmıştır. Konsantrasyonların uygulanmasının ardından hücreler uygun sürelerde 37°C 'de ve %5 CO_2 -%95 O_2 'de standart kültür koşullarını sağlayan etüvde inkübe edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda MTT analizi ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

3.6.4. Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Tayin Edilmesi

L929 hücre hattı üzerinde kurkumin için 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM ve piperin için 1, 2,5, 5, 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarının tamamının birbiri arasındaki etkileşimleri incelenmiştir. Kurkumin ile piperinin birbiri ile etkileşiminin incelenebilmesi için "dama tahtası sinerji testi" uygulanmıştır. Dama tahtası sinerji testine göre; tüm konsantrasyonlar 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına hücre ekimini takiben hücre kültür kabının solundan sağına doğru kurkuminin

artan dozları; yukarıdan aşağı doğru ise piperinin artan dozları uygulanarak tüm konsantrasyonların birbiri ile etkileşime geçmesi sağlanmıştır (**Şekil 3.4.**). Sinerjik etkinin belirlenebilmesi için kurkumin ve piperin uygulamasından 24 saat sonra MTT analizi ile hücre canlılığı belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Dama tahtası sinerji testi. Kurkumin ve piperin konsantrasyonları için ok yönünde artan şekilde uygulama yapılmıştır.

3.7. Deney Gruplarının Kurulması

Deneyler boyunca pasaj iki ile dokuz arasındaki hücreler kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında primer kortikal astrosit hücrelerinde piperin, kurkumin ve piperin ile kurkuminin sinerjik etki dozlarının Al hasarına karşı *protektif* ve *terapötik* etkileri tartışılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda kurulan deney grupları **Çizelge 3.1.**'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Primer kortikal astrosit hücreleri ile kurulan *in vitro* deney gruplarının özeti

Deney Grup Adı	Yapılan Uygulamalar	Zaman Çizelgesi	
		24. saat	48. saat
Grup 1	Kontrol Grubu	Besiyeri değişimi	Besiyeri değişimi
Grup 2	Negatif kontrol	AlCl ₃	-
Grup 3	1 µM Kurkumin + AlCl ₃	1 µM Kurkumin	AlCl ₃
Grup 4	5 µM Kurkumin + AlCl ₃	5 µM Kurkumin	AlCl ₃
Grup 5	10 µM Kurkumin + AlCl ₃	10 µM Kurkumin	AlCl ₃
Grup 6	25 µM Kurkumin + AlCl ₃	25 µM Kurkumin	AlCl ₃
Grup 7	50 µM Kurkumin + AlCl ₃	50 µM Kurkumin	AlCl ₃
Grup 8	1 µM Piperin + AlCl ₃	1 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 9	2,5 µM Piperin + AlCl ₃	2,5 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 10	10 µM Piperin + AlCl ₃	10 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 11	25 µM Piperin + AlCl ₃	25 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 12	25 µM Kurkumin ile 1 µM Piperin (sinerjik etki dozu) + AlCl ₃	25 µM Kurkumin / 1 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 13	25 µM Kurkumin ile 2,5 µM Piperin (sinerjik etki dozu) + AlCl ₃	25 µM Kurkumin / 2,5 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 14	50 µM Kurkumin ile 25 µM Piperin + AlCl ₃	50 µM Kurkumin / 25 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 15	5 µM Kurkumin ile 10 µM Piperin + AlCl ₃	5 µM Kurkumin / 10 µM Piperin	AlCl ₃
Grup 16	AlCl ₃ + 1 µM Kurkumin	AlCl ₃	1 µM Kurkumin
Grup 17	AlCl ₃ + 5 µM Kurkumin	AlCl ₃	5 µM Kurkumin
Grup 18	AlCl ₃ + 10 µM Kurkumin	AlCl ₃	10 µM Kurkumin
Grup 19	AlCl ₃ + 25 µM Kurkumin	AlCl ₃	25 µM Kurkumin
Grup 20	AlCl ₃ + 50 µM Kurkumin	AlCl ₃	50 µM Kurkumin
Grup 21	AlCl ₃ + 1 µM Piperin	AlCl ₃	1 µM Piperin
Grup 22	AlCl ₃ + 2,5 µM Piperin	AlCl ₃	2,5 µM Piperin

Grup 23	AlCl ₃ + 10 µM Piperin	AlCl ₃	10 µM Piperin
Grup 24	AlCl ₃ + 25 µM Piperin	AlCl ₃	25 µM Piperin
Grup 25	AlCl ₃ + 25 µM Kurkumin ile 1 µM Piperin (sinerjik etki dozu)	AlCl ₃	25 µM Kurkumin / 1 µM Piperin
Grup 26	AlCl ₃ + 25 µM Kurkumin ile 2,5 µM Piperin (sinerjik etki dozu)	AlCl ₃	25 µM Kurkumin / 2,5 µM Piperin
Grup 27	AlCl ₃ + 50 µM Kurkumin ile 25 µM Piperin (sinerjik etki dozu)	AlCl ₃	50 µM Kurkumin / 25 µM Piperin
Grup 28	AlCl ₃ + 5 µM Kurkumin ile 10 µM Piperin (sinerjik etki dozu)	AlCl ₃	5 µM Kurkumin / 10 µM Piperin

3.8. Deney Gruplarında Yapılan Analizler

3.8.1. Primer Astrosit Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Çalışmaların yürütüldüğü laboratuvar koşulları, kullanılan kimyasal maddelerdeki farklılıklar gibi değişkenler hücrelerin yaşam koşullarını etkilemektedir. *In vitro* çalışmalarda kullanılan hücrelerin ikilenme zamanlarının belirlenmesi, hücrelerin büyüme, gelişme ve üreme karakterizasyonunun belirlenmesi konusunda önem kazanmaktadır. İkilenme zamanı; hücrelerin bir hücre döngüsü geçirerek sayılarını iki katına çıkarması için geçen zamanı ifade etmektedir. İkilenme zamanı logaritmik bir grafik ile karakterize edilmektedir. Bir hücre popülasyonunun ikilenme zamanı (Population doubling time; PDT) aşağıda verilen formüle göre hesaplanmaktadır:

$$PDT = \frac{1}{\frac{3.32 \times (\log t_1 - \log t_0)}{24}}$$

Primer kortikal astrosit hücrelerinin büyüme eğrisinin çıkarılarak ikilenme zamanının belirlenebilmesi için, 96 kuyucuklu hücre kaplarına 5x10³ hücre ekilmiştir. İlk hücre sayımı hücre ekiminden dört saat sonra gerçekleştirilmiş olup t₀ olarak kabul edilmiş olup, 10 gün süre ile her 24 saatte bir hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Diğer hücreler sayılacakları güne kadar iki günde bir besiyeri değiştirilerek inkübe edilmiştir. Hücre sayımı için tripan mavisi ile boyama yöntemi

kullanılmıştır. Hücrelerin sayımdan önce tripsin ile muamele edilerek buldukları hücre kültür kabından kalkmaları sağlanmıştır. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra 1:1 oranında tripan mavisini ile süspansiyon edilerek Neubauer lamında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Her bir sayım üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş olup ortalamaları alınmıştır.

3.8.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Deney gruplarının kurulması takiben MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile her bir deney grubu için % hücre canlılığı değerleri hesaplanmıştır. Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilerek, deney gruplarının % hücre canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ hücre canlılığı} = \frac{\text{hücre canlılığı} \times \%100}{\text{kontrol grubu hücre canlılığı}}$$

3.8.3. Akridin Turuncusu (AO)/ Propidium İyodür (PI) Boyaması

AO ve PI boya floresan interkalasyon maddeleridir. AO, DNA'ya bağlandığında yeşil ve PI, DNA'ya bağlandığında turuncu renkte ışımaya yapmaktadır. AO boyasının moleküler ağırlığı 265,35 g/mol; PI boyasının moleküler ağırlığı ise 668,4 g/mol'dur. PI'nin moleküler ağırlığının yüksek olması nedeniyle, hücre zararının daha fazla hasar almış olduğu geç apoptotik ya da nekrotik hücrelerin zarlarından geçerek RNA ve DNA ile etkileşime girerek ışımaya yapmaktadırlar. AO'nun moleküler ağırlığının düşük olması sebebiyle ise hücre zararının çok fazla hasar almadığı canlı ya da erken apoptotik hücrelerin zarlarından geçerek ışımaya yapmaktadırlar.

Tez çalışması kapsamında 96 kuyucuklu kültür kaplarında, astrosit hücrelerinde Al kaynaklı hasar üzerinde kurkumin ile piperinin terapötik ve protektif etkilerinin belirlenebilmesi için **Çizelge 3.1.**'de verilen deney grupları oluşturulmuştur. Deney gruplarının oluşturulmasından sonra astrositler üzerinde bulunan besiyeri

uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile bir kez yıkanmıştır. 1:1 oranında hazırlanan AO/PI boyası hücrelere uygulanarak bir dakika süre ile karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon ardından AO/PI boya uzaklaştırılarak, hücreleri boya kalıntılarında arındırabilmek için bir kez PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine bir miktar PBS eklenerek inverted mikroskop ile 460- 490 nm dalga boyunda incelenerek fotoğraf çekilmiştir.

Çekilen fotoğraflarda Fiji-Image J (NIH, ABD) programı kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre zarı bütünlüğünün korunduğu ve tek tipte yeşil ışımaya yapan hücreler canlı hücre; çekirdeğinde parlak yeşil renkte kromatin yoğunlaşması bulunan hücreler *erken apoptotik hücre*; çekirdeğinde yoğun turuncu renkli kromatin yoğunlaşması görülen hücreler *geç apoptotik hücre* ve çekirdeği sağlam olarak turuncu ışımaya yapan hücreler *nekrotik hücre* olarak kabul edilmiştir. % Apoptotik ve % Nekrotik hücrelerin oranları aşağıda belirtilen formüller ile hesaplanmıştır:

$$\%Apoptotik\ Hücre = \frac{Toplam\ Apoptotik\ Hücre\ Sayısı\ (Erken + Geç)}{Toplam\ Hücre\ Sayısı} \times 100$$

$$\%Nekrotik\ Hücre = \frac{Toplam\ Nekrotik\ Hücre\ Sayısı}{Toplam\ Hücre\ Sayısı} \times 100$$

3.8.4. TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Apoptoz hücrelerde meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere bağlı olarak programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Geç apoptoz sürecinde görülen DNA fragmentlerinin ortaya çıkması hücrelerin nihai ölümünün ölçüsüdür.

Tez çalışması kapsamında “Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) dUTP Nick-End Labeling” (TUNEL) tanımlama kiti (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit, Sigma Aldrich) ile apoptoz tayini gerçekleştirilmiştir. Sekiz kuyucuklu hücre kültür kaplarına deney gruplarının kurulmasının ardından

besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin fiksasyonu beş dakika süre ile %1 paraformaldehitin hücrelere uygulanması ile sağlanmıştır. Paraformaldehit ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır. 2:1 oranında hazırlanan etanol-asetik asit solüsyonu hücrelere uygulanarak beş dakika süre ile post fiksasyon sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda PBS ile yıkama yapılmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için %3 hidrojen peroksidaz uygulaması 5 dakika süre yapılmıştır. İnkübasyonun ardından PBS ile yıkama yapılmıştır. Kit içeriğinde bulunan Equilibration tamponu 10 saniye süre ile hücrelere uygulanmıştır. Süre sonunda tampon ortamdan uzaklaştırılarak DNA fragmentlerine bağlanan TdT, 37°C'de nemli ortamda bir saat süre uygulanmıştır. Uygulamanın ardından reaksiyonun durdurulması için kit içerisinde bulunan sonlandırma tamponu 10 dakika süre ile uygulanmış ve süre sonunda ortamdan uzaklaştırılarak PBS ile yıkama yapılmıştır. Anti-dioksigenin uygulaması oda sıcaklığında nemli ortamda gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon ardından PBS yıkaması sağlanmıştır. Kromojen bir ajan olan 3,3' Diaminobenzidine (DAB) uygulaması yapılarak altı dakika süre ile inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda PBS ile yıkama yapılmıştır. Ortama bir miktar PBS eklenerek inverted mikroskopta hücreler incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.8.5. Sitokin Analizi

Enzime bağlı immünosorban testi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA) yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanması ve bu enzim substratlarının renkli ürünlere dönüştürülerek kolorimetrik olarak incelenmesi esasına dayanan immünokimyasal bir yöntemdir. Uygulaması kolay, güvenilirliği yüksek ve hızlı sonuç alınabilen testler olması sebebiyle araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir.

Tez çalışması kapsamında proenflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve TGF- β ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla her bir sitokin için ayrı Elisa kit (Rat IL-6 Clia Kit ve TGF- β 1 Elisa Kit, Elabscience) kullanılarak kit protokolüne uygun şekilde ölçümler yapılmıştır. Kısaca uygulama aşağıdaki gibidir:

-80°C'de saklanan süpernatant örnekleri 4°C'de 1000 RPM'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar toplanmış IL-6 için direk kullanılmıştır. TGF- β için aktiveleştirme işlemi uygulanmıştır. Standart solüsyonlarından kit protokollerine uygun şekilde seri sulandırma ile konsantrasyonları hazırlanmıştır. Kit içerisinde çıkan kültür kabının kuyucuklarına hazırlanan standart solüsyon konsantrasyonları ve örnekler yüklenerek 37°C'de 90 dakika inkübasyon sağlanmıştır. Inkübasyon sonunda solüsyonlar ortamdaki uzaklaştırılarak ortama biyotinlenmiş saptama antikorları eklenmiş ve 37°C'de 60 dakika boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Inkübasyon sonunda solüsyon ortamdaki uzaklaştırılarak, yıkama solüsyonu ile birer dakika üç kez olacak şekilde yıkama yapılmıştır. Bu işlemden sonra ortama horseradish peroksidaz konjuge solüsyonu eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika süre ile inkübasyonu sağlanmıştır. Inkübasyon sonunda solüsyon ortamdaki uzaklaştırılarak beş kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından substrat solüsyonu ortama eklenmiştir. Kültür plakaları karanlıkta olacak şekilde etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için ortama durdurucu solüsyon eklenmiştir. 450 nm'de ELISA okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçüm sağlanmıştır. Elde edilen veriler standart verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.9. İstatiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında yürütülen deneysel çalışmalardan elde edilen tüm veriler istatistiksel bir yazılım olan GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Farklı gruplar arasındaki anlamlılık düzeyleri Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile belirlenmiş olup p değerleri 0,05'ten daha az olan durumlar için istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

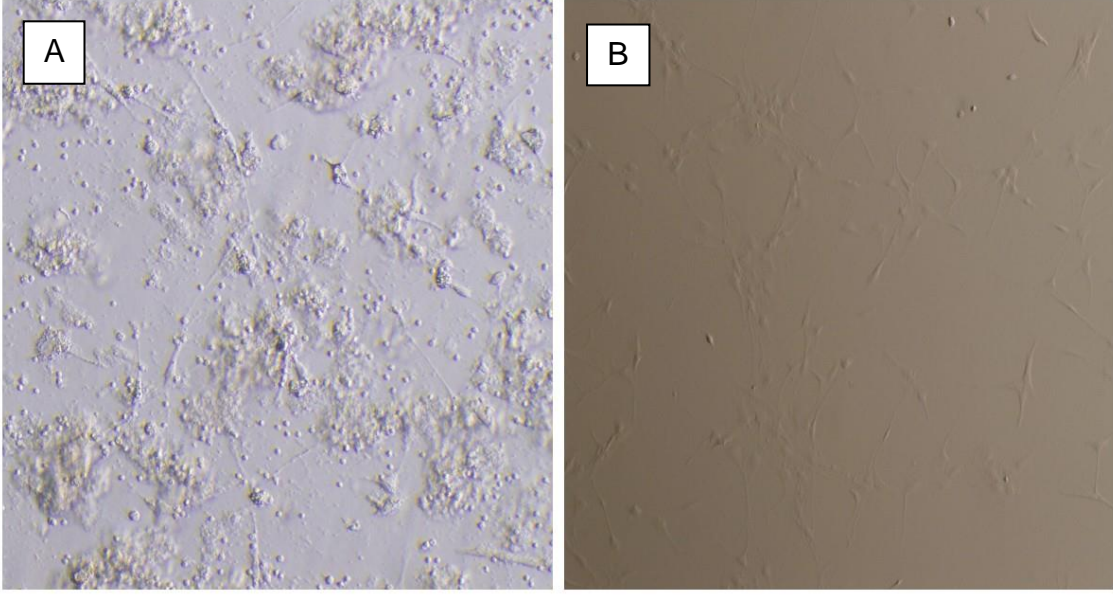
Bu kısımda tez çalışması kapsamında yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları verilmiştir.

Deneysel kullanılmak üzere izole edilen primer kortikal astrosit hücreleri, üç günlük neonatal sıçan yavrularından elde edilmiş ve astrosit hücreleri zenginleştirme işleminin ardından karakterize edilmiştir. Elde edilen hücreler deneylerde kullanılmak üzere uygun sayıya ulaştıktan sonra deney grupları kurulmuştur.

Kurkumin ve piperinin Al maruziyetine karşı protektif ve terapötik etkileri; MTT testi ile hücre canlılık oranlarının belirlenmesi, AO/PI ve TUNEL boyama yöntemleri ile apoptoz tayini ve ELİSA yöntemi kullanılarak sitokin analizleri bakımından değerlendirilmiştir. Aynı zamanda kurkumin ve piperinin sinerjik olarak kullanılmasının Al maruziyetindeki etkileri de bu yöntemler ile belirlenerek piperinin biyogüçlendirici özelliği tartışılmıştır.

4.1. Primer Kortikal Astrosit İzolasyonu ve Kültürü

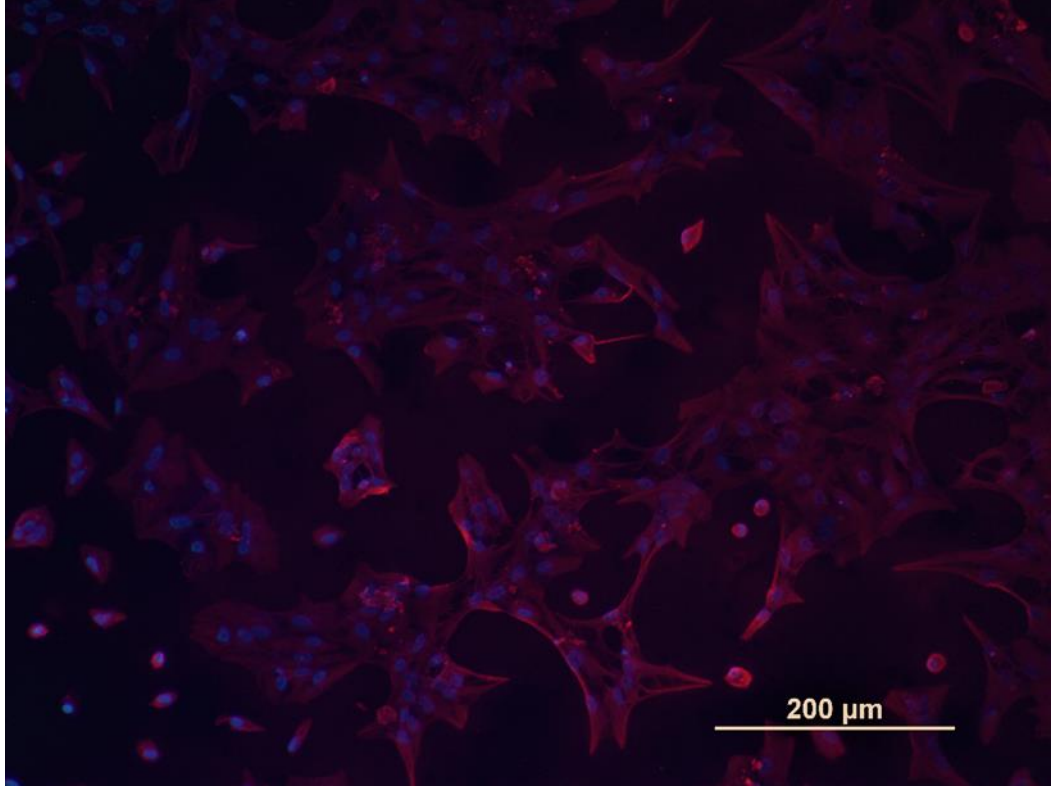
Neonatal üç günlük sıçan yavrularından steril koşullarda izole edilen astrositler uygun besiyeri ortamında kültüre edilmiş ve %80-90 yoğunluğa ulaştığında astrosit zenginleştirme işlemi yapılmıştır (**Şekil 4.1.**). Zenginleştirme işleminden sonra, tez deneyleri kapsamında kullanılmak üzere yeterli sayıya ulaşabilmeleri için pasajlanmıştır.



Şekil 4.1. Primer kortikal astrosit hücreleri. A: Astrosit zenginleştirme işlemi öncesi karışık gliyal hücre kültürü (izolasyonu takiben 7. gün) (Görüntü 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir), B: Astrosit zenginleştirme sonrası pasaj 2'deki astrosit hücreleri (Görüntü 4X büyütme kullanılarak çekilmiştir).

4.2. Primer Astrosit Hücrelerinin Karakterizasyonu

Primer olarak elde edilen astrositlerde, zenginleştirme işleminin ardından deneylerde kullanılmadan önce karakterizasyon için GFAP molekülü ile işaretlenerek boyanmıştır. Hücreler 545-580 nm dalga boyunda inverted mikroskop ile görüntülenmiştir. Yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda primer olarak elde edilen kortikal astrosit kültürünün, zenginleştirme işleminden sonra saf bir şekilde astrosit hücrelerinden oluştuğu güçlü GFAP boyanması ile gösterilmiştir (**Şekil 4.2.**).



Şekil 4.2. Primer kortikal astrosit hücrelerinin Anti-GFAP antikoru ile işaretlenerek karakterize edilmesi. Kırmızı; 1:200 Anti-GFAP, 1:200 TR (545- 580 nm), Mavi: DAPI. Görüntü 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir.

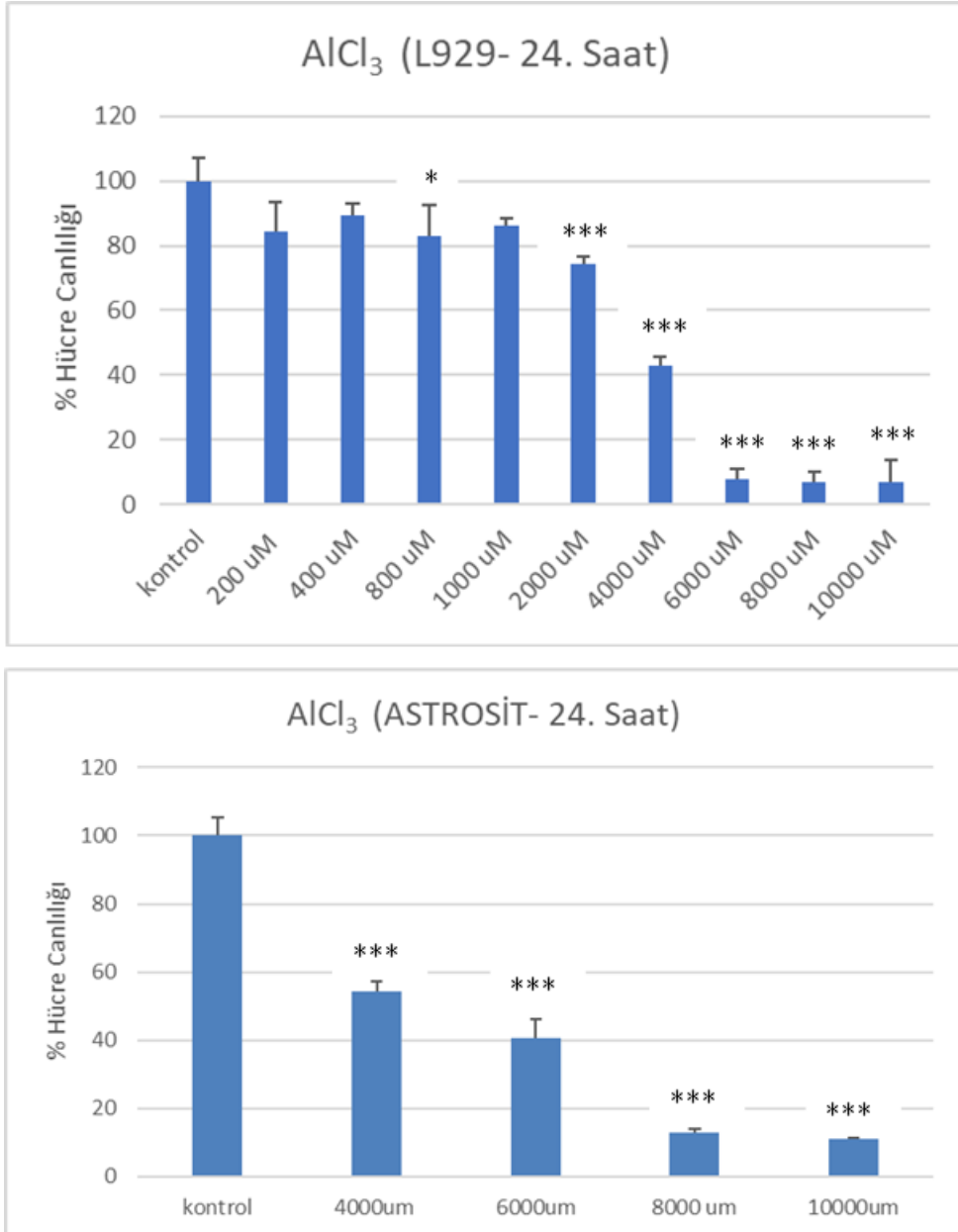
4.3. Al, Kurkumin, Piperin ve Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Tayini

Tez çalışması kapsamında **Çizelge 3.1.**'de tarif edilen şekilde deney gruplarına uygulama yapılabilmesi için Al, kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonları belirlenmiştir. % hücre canlılıkları "**3.6.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi**" başlığında verilen formüle göre hesaplanmıştır.

4.3.1. Alüminyum Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Al konsantrasyonlarından IC50 değerinin belirlenmesi için L929 hücre hattı ve primer astrosit kültürü kullanılmıştır. MTT analizi ile elde edilen hücre canlılığı verileri ile yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) değeri hesaplanmıştır. L929 hücreleri ile yapılan denemede elde edilen IC50 değeri 3763 μ M'dir. Bu değer astrosit hücreleri üzerinde uygulandığı zaman L929 hücre hattında görülen hasar oranının astrosit hücrelerinde görülmediği sonucuna varılmıştır. Astrosit

hücrelerinin patolojik koşullarda aktive olması ve MSS de koruyucu bir göreve sahip olması nedeni ile L929 hücre hattında elde edilen IC50 değeri ve daha yüksek konsantrasyonlar astrosit hücrelerinde uygulanarak yeni IC50 değeri belirlenmiştir (**Şekil 4.3.**). L929 ve astrosit hücreleri için hesaplanan IC50 değerleri karşılaştırıldığında astrosit hücrelerinin AlCl₃ maruziyetine karşı daha dayanıklı hücreler olduğu gözlenmiştir. *Deney gruplarının kurulmasında, astrosit hücrelerinden elde edilen IC50 değeri kullanılmıştır.*



Şekil 4.3. L929 ve astrosit hücreleri üzerinde 24 saat Al uygulaması sonrası % hücre canlılığı grafikleri. Al uygulaması ile L929 hücre hattında 2000, 4000, 8000, ve 10000 µM ve astrosit hücrelerinde 4000, 6000, 8000 ve 10000 µM Al ile

muamele edilmesi sonucunda hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azalmıştır. (İstatistiksel olarak anlamlılık, *; $p \leq 0,05$, ***; $p \leq 0,001$)

4.3.2. Kurkumin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

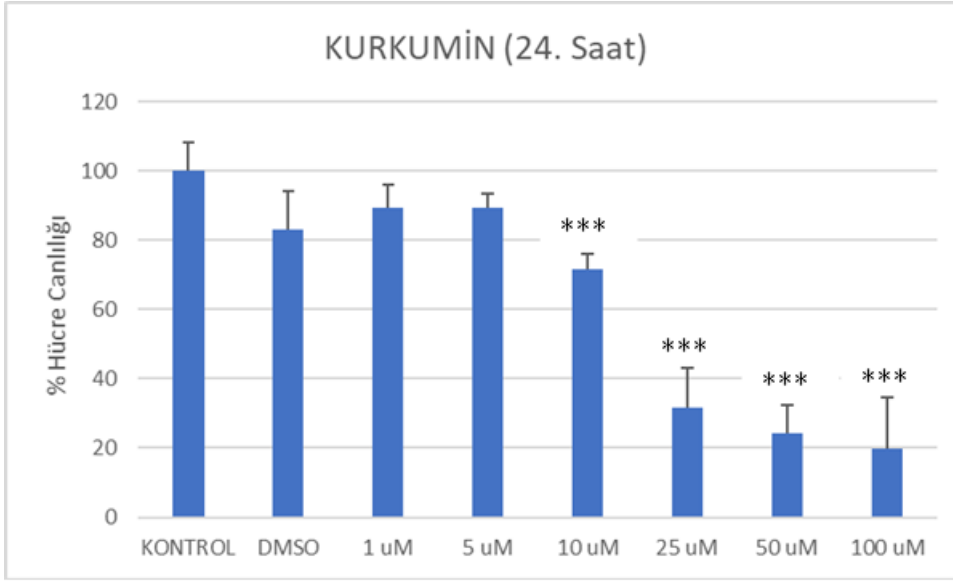
Kurkuminin, literatürden yola çıkarak belirlenen konsantrasyonları L929 hücre hattı ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyon sonlarında MTT analizi yapılmıştır. Yapılan MTT analizinden elde edilen veriler ile % hücre canlılık değerleri hesaplanarak her bir grup kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.

L929 hücre hattına kurkumin uygulamasını takip eden 24 saatte 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığı bakımından kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur ($p \leq 0,001$). Kurkuminin artan konsantrasyonlarında hücre canlılığının kademeli olarak azaldığı gözlenmiştir (**Şekil 4.4.**).

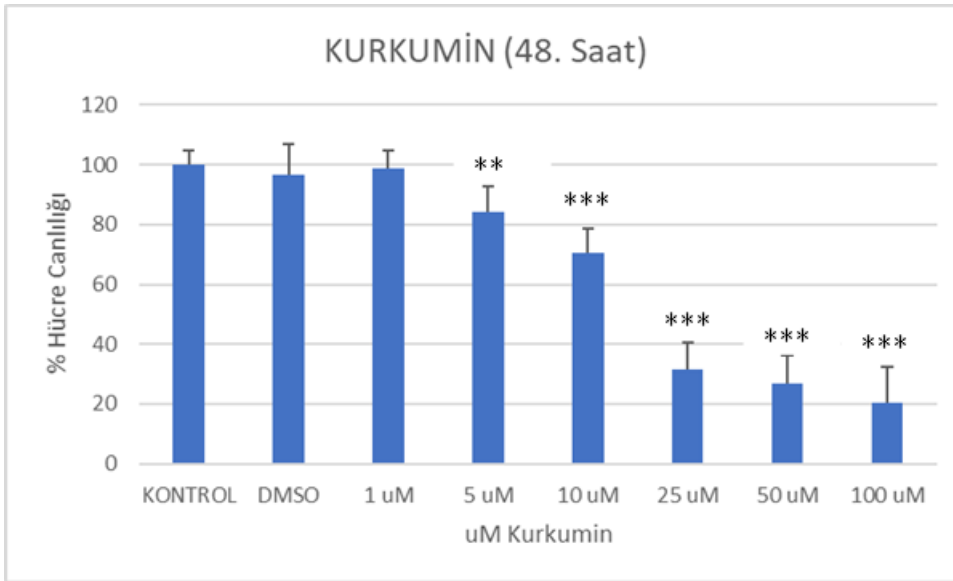
48 saat boyunca kurkumin ile muamele edilmiş deney gruplarında 5, 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlar için hücre canlılığı bakımından anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). 24. saatteki hücre canlılığı verilerine benzer şekilde 48. saatte de hücre canlılığı artan konsantrasyonlarda kademeli olarak azalmıştır (**Şekil 4.5.**).

72 saat boyunca kurkumin ile muamele edilmiş deney gruplarında 1, 10, 25, 50, 100 μM konsantrasyonlar için hücre canlılığı bakımından anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir. Diğer konsantrasyonlar için hücre canlılığı verileri 24. ve 48. saat verilerine benzer şekilde kademeli olarak azalma görülmüştür (**Şekil 4.6.**).

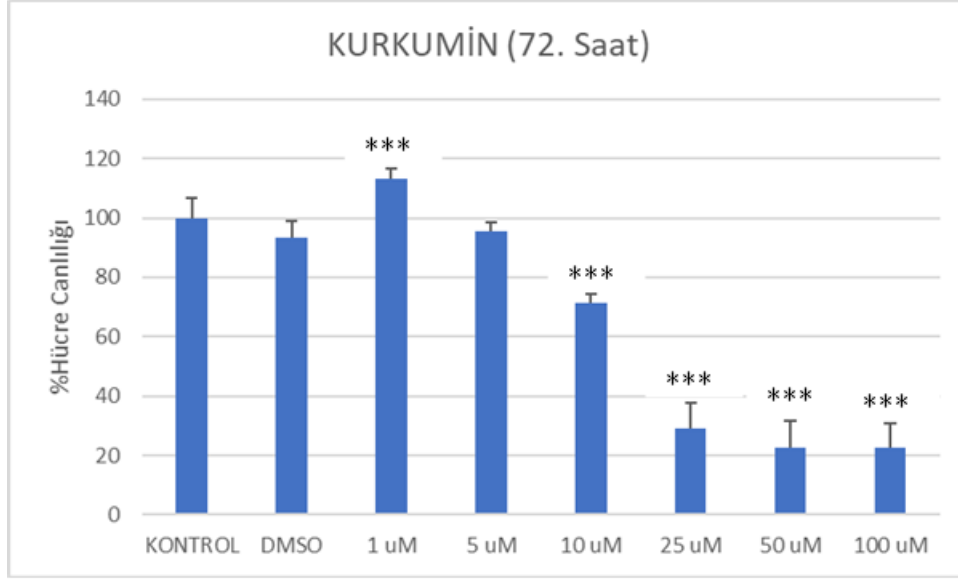
Sonuç olarak 24, 48 ve 72. saatlerde 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlar için hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü görülmektedir. Elde edilen verilere göre tez çalışması kapsamında primer astrosit hücreleri ile oluşturulacak deney grupları için 1, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarının uygulanması uygun görülmüştür.



Şekil 4.4. Kurkumın konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, ***; $p \leq 0,001$)



Şekil 4.5. Kurkumın konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$)



Şekil 4.6. Kurkumin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, ***, $p \leq 0,001$)

4.3.3. Piperin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Piperinin, literatürden yola çıkarak belirlenen konsantrasyonları L929 hücre hattı ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyon sonlarında MTT analizi yapılmıştır. Yapılan MTT analizinden elde edilen veriler ile % hücre canlılığı değerleri hesaplanarak her bir grup kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.

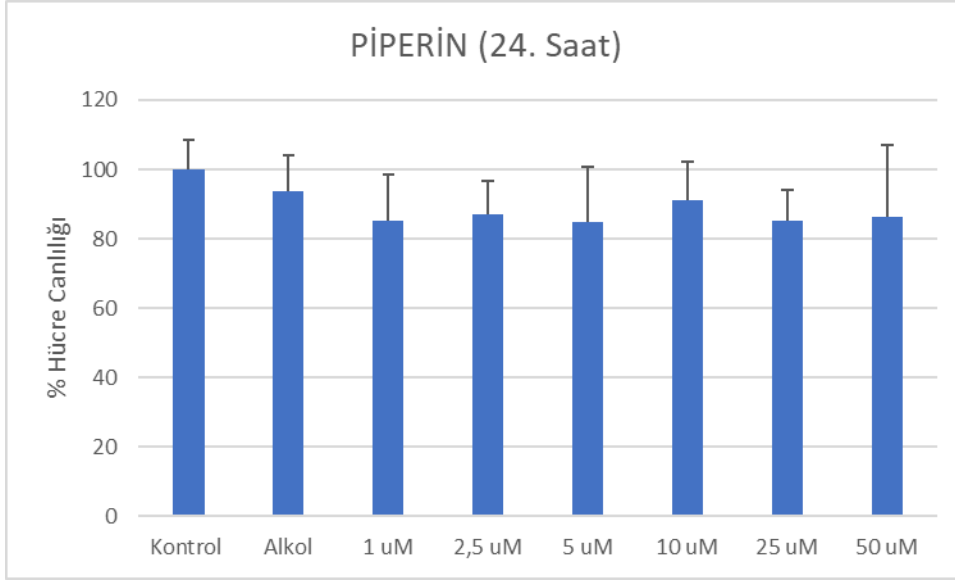
Piperin uygulaması sonrasında takip edilen 24. saatte konsantrasyonlar arasında hücre canlılığı bakımından kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (**Şekil 4.7.**).

48 saat inkübasyon sonrasında hücrelerde 1, 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarda, kontrol grubuna göre hücre canlılığı bakımından anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir (*; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$) (**Şekil 4.8.**).

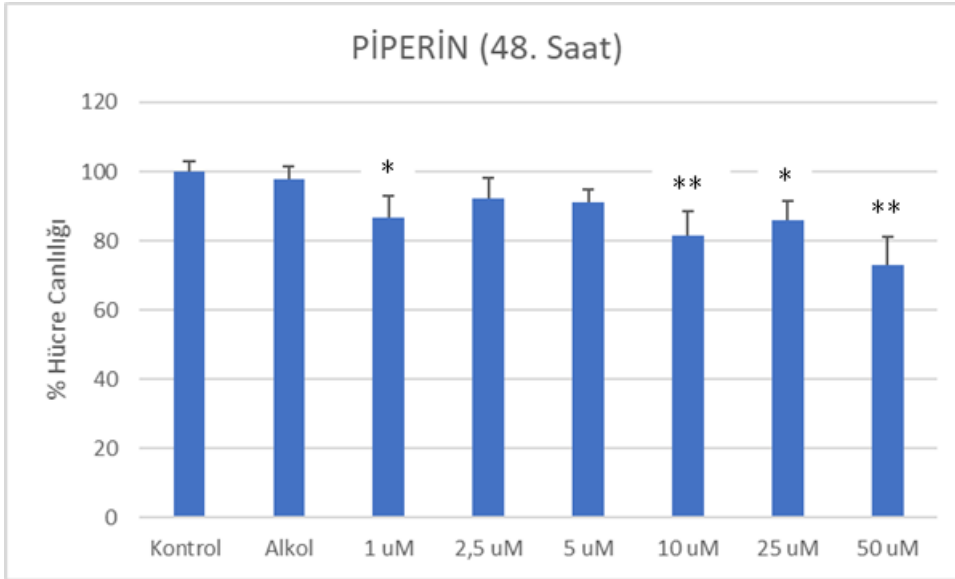
72 saat inkübasyon sonrasında ise sadece 25 μM konsantrasyonda, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur (***, $p \leq 0,001$) (**Şekil 4.9.**).

Elde edilen verilere göre tez çalışması kapsamında primer astrosit hücreleri ile oluşturulacak deney grupları için hücre canlılığında zaman aralıklarında canlılık

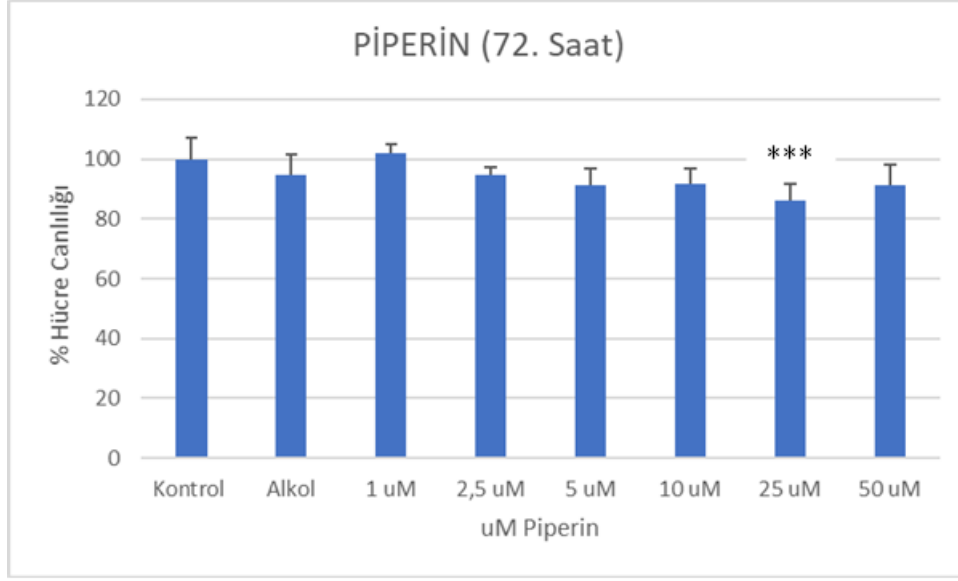
bakımından düşüş olmayan konsantrasyonların uygulanmasına karar verilmiştir (1, 2,5 ve 10 μ M).



Şekil 4.7. Piperin konsantrasyonlarının belirlenmesi.



Şekil 4.8. Piperin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$)



Şekil 4.9. Piperin konsantrasyonlarının belirlenmesi. (İstatistiksel olarak anlamlılık, ***; $p \leq 0,001$)

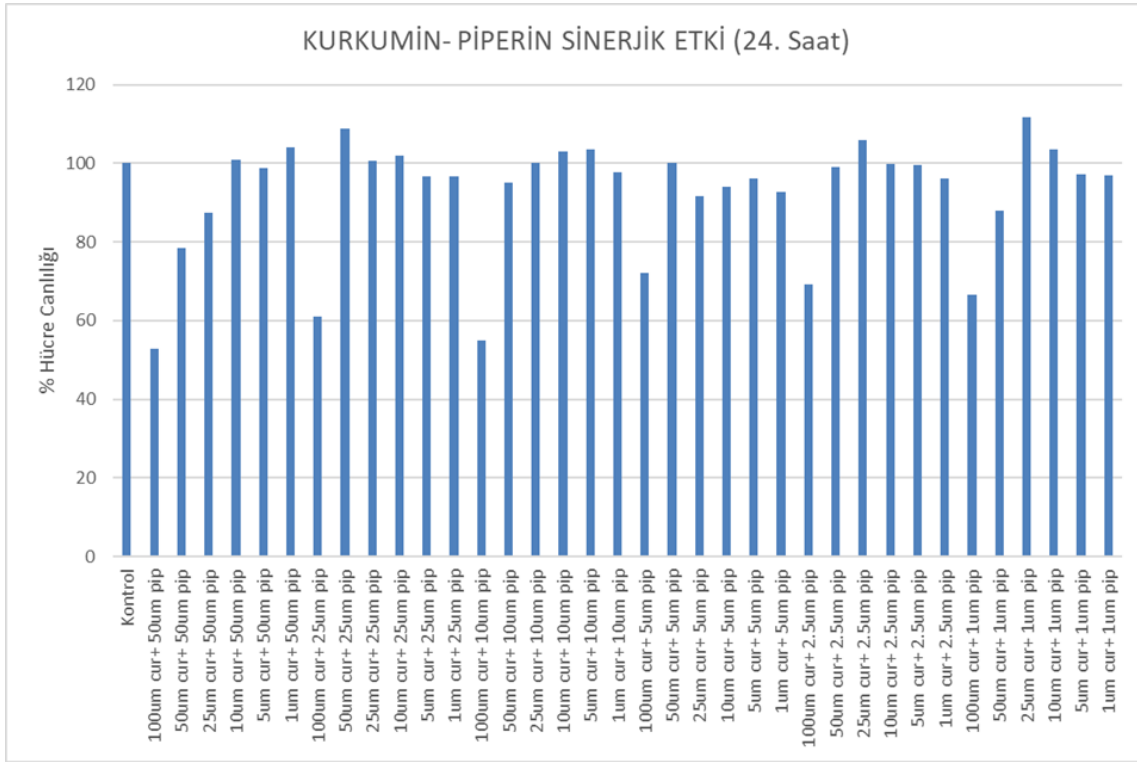
4.3.4. Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında primer astrosit hücreleri ile kurulacak olan deney gruplarında kurkumin ile piperinin birlikte kullanıldığında maksimum etki göstereceği dozu belirleyebilmek için “*dama tahtası sinerji testi*” uygulaması yapılmıştır. Kurkumin ile piperinin belirlenen tüm konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır (**Şekil 4.10.**). En yüksek hücre canlılığı olan;

1. 25 μ M kurkumin ile 1 μ M piperin;
2. 25 μ M kurkumin ile 2,5 μ M piperin;
3. 50 μ M kurkumin ile 25 μ M piperin ve
4. 5 μ M kurkumin ile 10 μ M piperin konsantrasyonlarının tez çalışması kapsamında uygulanması uygun görülmüştür.

Buradan elde edilen sonuçlar doğrultusunda deney grupları oluşturulurken aynı zamanda sinerji gruplarında kullanılacak olan kurkumin değerlerinin de (kurkumin 25 ve 50 μ M) deney gruplarına eklenmesine karar verilmiştir.

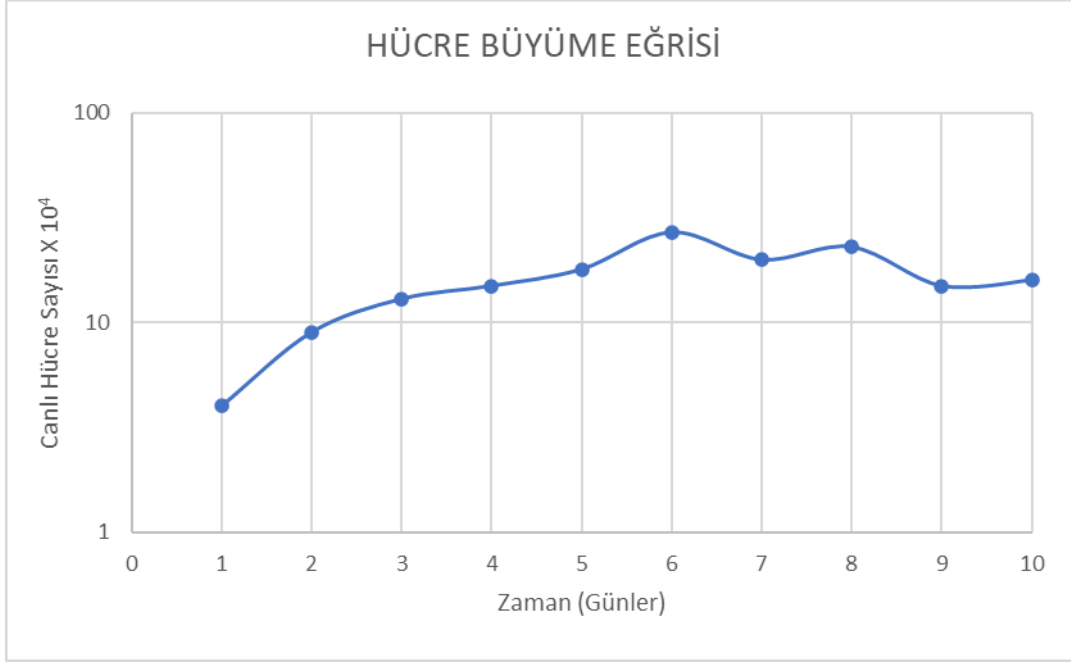
Hücre canlılıkları incelendiğinde, piperin ile kurkuminin birlikte kullanımının, kurkuminin hücre canlılığı bakımından etkilerini arttırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Kurkumin ile piperinin sinerjik etki konsantrasyonlarının belirlenmesi.

4.4. Primer Astrosit Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Elde edilen veriler ile astrosit hücrelerinin ikilenme zamanı belirlenmiş ve logaritmik olarak grafiği oluşturulmuştur (**Şekil 4.11.**). Astrosit hücre büyüme eğrisi verilerine göre hücre sayısındaki artış t₁'de başlayarak t₆'ya kadar devam etmiştir. En yüksek hücre sayısı ise t₆'da görülmüştür. Primer kortikal astrosit hücreleri için hesaplanan ikilenme zamanı 20,5 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Primer kortikal astrosit hücre büyüme eğrisi.

4.5. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Primer kortikal astrosit hücrelerinin deneylerde kullanılabilmesi için pasajlanarak yeterli sayıya ulaşmasının ardından *terapötik* ve *protektif* deney grupları üzerinde hücre canlılığının belirlenebilmesi için 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi sağlanmıştır.

4.5.1. Kurkumin, Piperin ve Sinerjik Etki Dozlarının AlCl₃ Hasarına Karşı *Terapötik* Etkinliğinin Belirlenmesi

4.5.1.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Astrosit hücrelerinde AlCl₃ maruziyetine karşı kurkumin, piperin ve kurkumin ile piperinin sinerjik etkilerinin belirlenebilmesi için hücre ekibini takiben, hücreler **Çizelge 3.1.**'de listelenen şekilde gruplandırılmıştır. Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmamıştır. Negatif kontrol grubu ve deney gruplarına hesaplanan IC₅₀ AlCl₃ dozu olan 4150 µM konsantrasyonu 24 saat süre ile uygulanmıştır. 24

saat inkübasyonun ardından $AlCl_3$ içerikli besiyerleri uzaklaştırılarak, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Terapötik etkinin belirlenebilmesi için kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonları hücrelere uygulanmıştır. 24 saat inkübasyonun ardından MTT analizi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile kontrol grubu kıyaslanarak “% hücre canlılığı” hesaplanmıştır. İstatiksel olarak anlamlılık, kontrol ve negatif kontrol grupları ile deney gruplarının kıyaslanması sonucu elde edilmiştir (**Şekil 4.12.**).

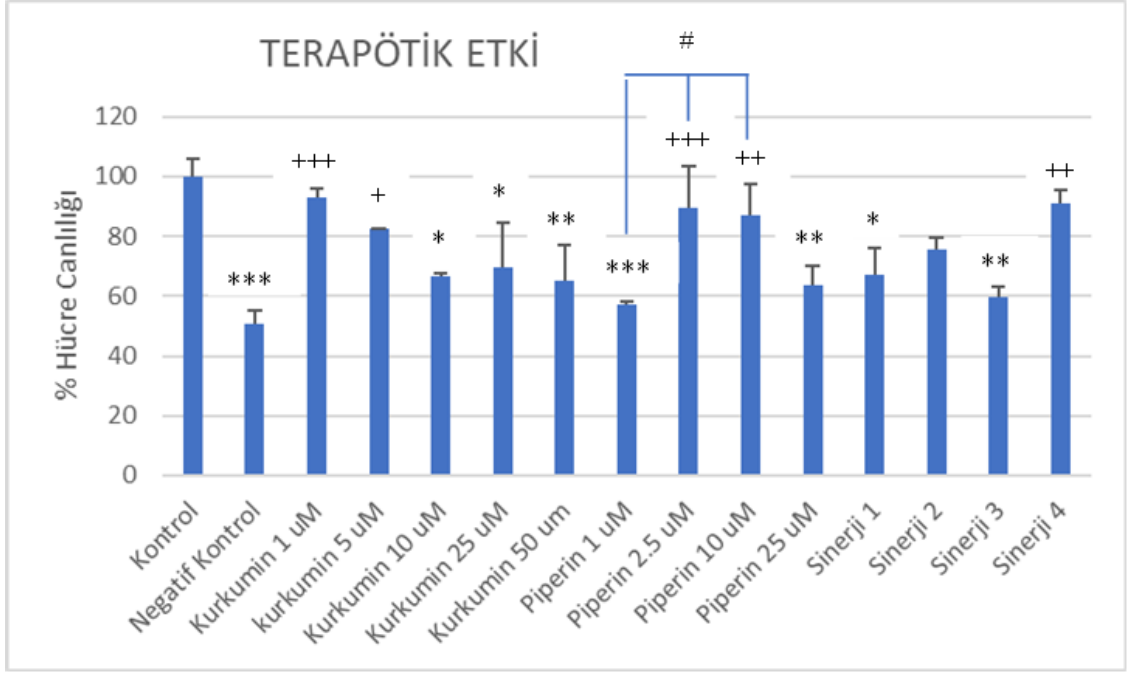
Deney gruplarından **kurkumin 10, 25 ve 50 μ M; piperin 1 ve 25 μ M ve sinerji 1- 3** gruplarında **kontrol grubu** ile kıyaslandığında hücre canlılığı bakımından anlamlı bir farklılık elde edilmiştir (*; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$ ***, $p \leq 0,001$). Ancak en yüksek hücre canlılığına sahip olan **sinerji 4** grubunun **kontrol grubu** ile hücre canlılığı bakımından istatistiksel anlamda bir farklılık olmadığı gözlenmiştir.

Deney grupları negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamda farklılık görülen gruplar; **kurkuminin 1 ve 5 μ M; piperin 2,5 ve 10 μ M ve sinerji 4** gruplarıdır (+; $p \leq 0,05$, ++; $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$).

Kurkumin ve piperin konsantrasyonları kendi aralarında da istatistiksel anlamda değerlendirilmiştir. **Piperin 1 μ M** konsantrasyonu ile **piperin 2,5 ve 10 μ M** konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulunurken (#; $p \leq 0,05$); **kurkumin** konsantrasyonları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Elde edilen verilere göre; astrosit hücrelerine $AlCl_3$ uygulanması astrosit hücrelerinde hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe sebep olmuştur (***, $p \leq 0,001$). Ancak $AlCl_3$ ile 24 saat inkübe edilen hücrelere **kurkumin 1 ve 5 μ M, piperin 2,5 ve 10 μ M** ile **sinerji 4** deney grupları uygulandığı zaman hücre canlılığında anlamlı derecede artış gözlenmiştir (**; $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$).

Sinerji deney grupları ile bu gruplarda kullanılan **kurkumin** konsantrasyonları (5, 25 ve 50 μ M) kıyaslandığı zaman piperinin biyogüçlendirici özelliği açısından istatistiksel anlamlılık düzeyinde herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir ancak hücre canlılık yüzdelerine göre grafikte farklılıklar gözlenmiştir.



Şekil 4.12. Astrosit hücrelerinde $AlCl_3$ hasarına karşı kurkumin, piperin ve sinerjik etki gruplarının *terapötik* etkilerinin belirlenmesi. 24 saat $AlCl_3$ uygulanmış astrosit hücrelerine 24 saat kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonları uygulanmıştır. (**Sinerji 1:** 25 μ M kurkumin+ 1 μ M piperin; **Sinerji 2:** 25 μ M kurkumin+ 2,5 μ M piperin; **Sinerji 3:** 50 μ M kurkumin+ 25 μ M piperin; **Sinerji 4:** 5 μ M kurkumin+ 10 μ M piperin). Kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; *, $p \leq 0,05$, ***, $p \leq 0,001$. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +; $p \leq 0,05$, ++; $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$. Piperin konsantrasyonları arasındaki istatistiksel anlamda farklılık; #; $p \leq 0,05$.

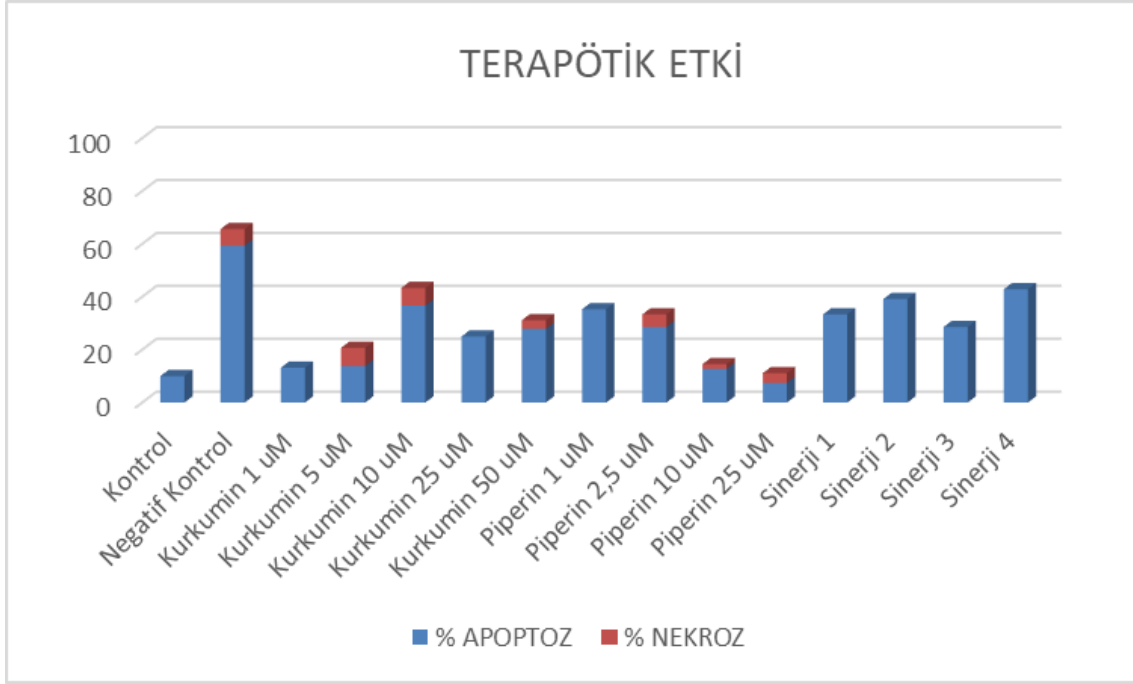
4.5.1.2. Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Belirlenmesi

Deney akış şemasına göre *terapötik* deney gruplarının oluşturulmasını takip eden 24. saatte uygulanan AO/PI ikili boyama sonucunda elde edilen hücre görüntülerinden % apoptoz ve nekroz oranları hesaplanmıştır.

Kontrol grubunda %10 oranında apoptotik hücre görülürken nekroz gözlenmemiştir.

$AlCl_3$ uygulaması yapılan **negatif kontrol** grubunda %59,3 apoptoz ve %6,25 nekroz tespit edilmiştir. Boyama sonuçları deney gruplarında negatif kontrole göre daha az hücre ölümü olduğunu göstermiştir.

En düşük apoptotik hücre ölümü %7,4 oranı ile piperin 25 μM konsantrasyonunda görülürken en düşük nekrotik hücre sayısı kurkuminin 1 ve 25 μM , piperinin 1 μM konsantrasyonları ile sinerji 1, 2, 3 ve 4 deney gruplarında gözlenmiştir.



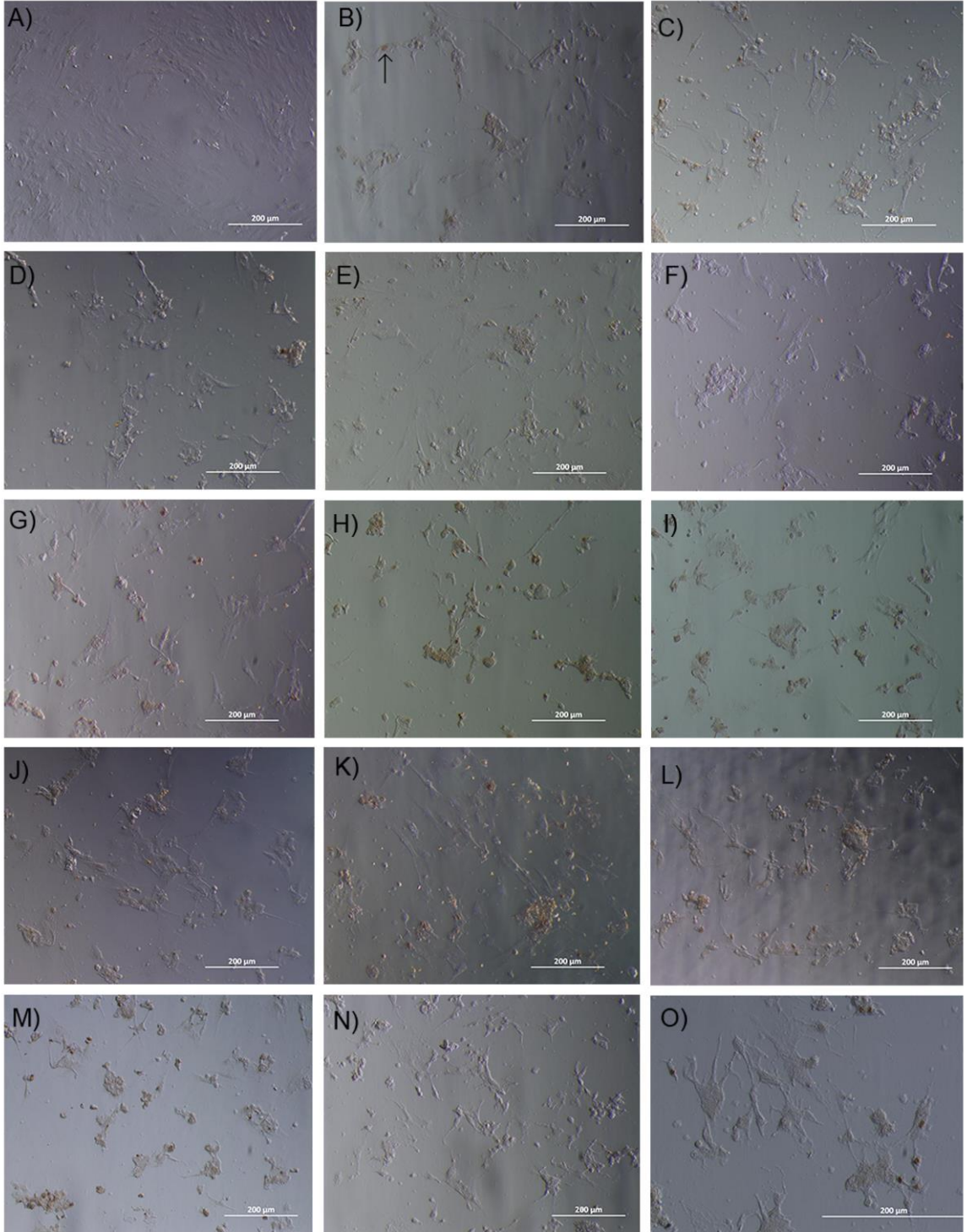
Şekil 4.13. Terapötik etki gruplarında apoptoz ve nekroz oranlarının belirlenmesi

4.5.1.3. TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Deney akış şemasına uygun şekilde deney gruplarının oluşturulmasının ardından TUNEL yöntemi ile, astrosit hücrelerinde $AlCl_3$ hasarı ve bu hasarda kurkumin, piperin ve sinerjik etkileri apoptoz bakımından değerlendirilmiştir. Hücrelerde görülen kahverengi çekirdek boyanmaları apoptotik hücre boyanması olarak kabul edilmiştir.

$AlCl_3$ uygulaması yapılmış olan negatif kontrol grubunda, apoptotik hücrelerin daha fazla ifade edildiği görülmüştür (**Şekil 4.14- B.**).

Elde edilen boyanma görüntüleri, hücre canlılığı verileri ve AO/PI boyanma görüntüleri ile kıyaslandığında birbirini destekler nitelikte olduğu görülmüştür.



Şekil 4.14. TUNEL yöntemi ile apoptozun gösterilmesi. B'de görülen oklar apoptotik boyanmaları ifade etmektedir. **A)** Kontrol grubu; **B)** Negatif kontrol grubu; **C)** Kurkumin 1 µM; **D)** Kurkumin 5 µM; **E)** Kurkumin 10 µM; **F)** Kurkumin 25 µM; **G)** Kurkumin 50 µM; **H)** Piperin 1 µM; **I)** Piperin 2,5 µM; **J)** Piperin 10 µM;

K) Piperin 25 μM ; **L)** Sinerji 1 (25 μM kurkumin+ 1 μM piperin); **M)** Sinerji 2 (25 μM kurkumin+ 2,5 μM piperin); **N)** Sinerji 3 (50 μM kurkumin+ 25 μM piperin); **O)** Sinerji 4 (5 μM kurkumin+ 10 μM piperin) Görüntüler 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir.

4.5.2. Kurkumin, Piperin ve Sinerjik Etki Dozlarının AlCl_3 Hasarına Karşı *Protaktif* Etkinliğinin Belirlenmesi

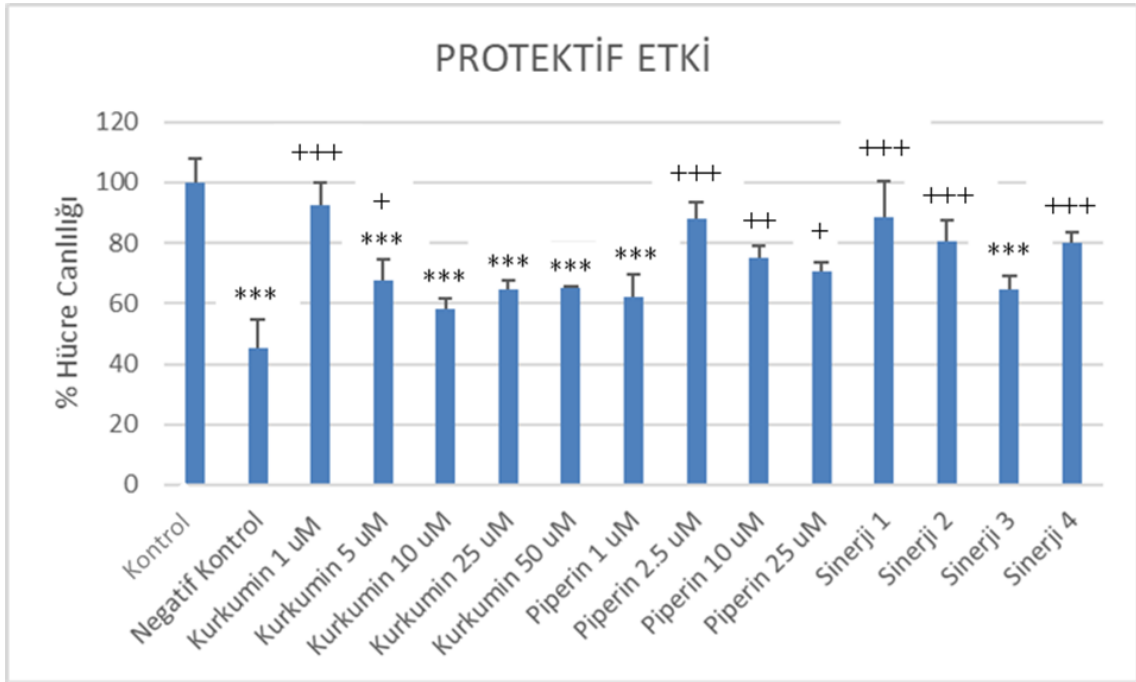
4.5.2.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Astrosit hücrelerinde kurkumin, piperin ve kurkumin ile piperinin sinerjik etkilerinin AlCl_3 hasarına karşı *protaktif* etkilerinin belirlenebilmesi için hücre ekimini takiben, deney grupları **Çizelge 3.1.**'de listelenen şekilde oluşturulmuştur. Kontrol gruplarına herhangi bir uygulama gerçekleştirilmemiştir. Deney grupları için belirlenen kurkumin, piperin ve kurkumin ile piperin sinerjik etki dozları uygulanmıştır. Tüm hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerleri aspire edilerek negatif kontrol ve deney gruplarına AlCl_3 IC50 konsantrasyonu uygulaması yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda MTT analizi yapılarak hücre canlılıkları analiz edilmiştir. Elde edilen veriler kontrol grubunun hücre canlılık verileri ile oranlanarak % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık, kontrol ve negatif kontrol gruplarının deney grupları ile kıyaslanması sonucu elde edilmiştir (**Şekil 4.13.**).

Deney grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığı bakımından anlamlı farklılık görülen gruplar; **kurkumin 5- 10- 25- 50 μM** konsantrasyonları ile **sinerji 3 konsantrasyonu** olduğu belirlenmiştir (***, $p \leq 0,001$).

Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda kıyaslama yapıldığında **kurkuminin 1- 5 μM ; piperinin 2,5- 10- 25 μM** konsantrasyonları ve **sinerji 1- 2- 4** gruplarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir (+; $p \leq 0,05$, ++; $p \leq 0,01$, +++; $p \leq 0,001$).

Sinerji deney grupları ile bu gruplarda kullanılan kurkumin konsantrasyonları (5, 25 ve 50 μM) kıyaslandığı zaman hücre canlılık yüzdelerine göre **sinerji 1- 2- 4** gruplarında farklılık tespit edilmiştir. Ancak bu farklılık istatistikî açıdan anlamlı bulunamamıştır.



Şekil 4.15. Astrosit hücrelerinde $AlCl_3$ hasarına karşı kurkumin, piperin ve sinerjik etkinin protektif etkilerinin belirlenmesi. 24 saat kurkumin, piperin ve sinerjik etki konsantrasyonlarının uygulanmış astrosit hücrelerine 24 saat süre ile $AlCl_3$ uygulaması yapılmıştır. (Sinerji 1: 25 μM kurkumin+ 1 μM piperin; Sinerji 2: 25 μM kurkumin+ 2,5 μM piperin; Sinerji 3: 50 μM kurkumin+ 25 μM piperin; Sinerji 4: 5 μM kurkumin+ 10 μM piperin). Kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +, $p \leq 0,05$, ++, $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$.

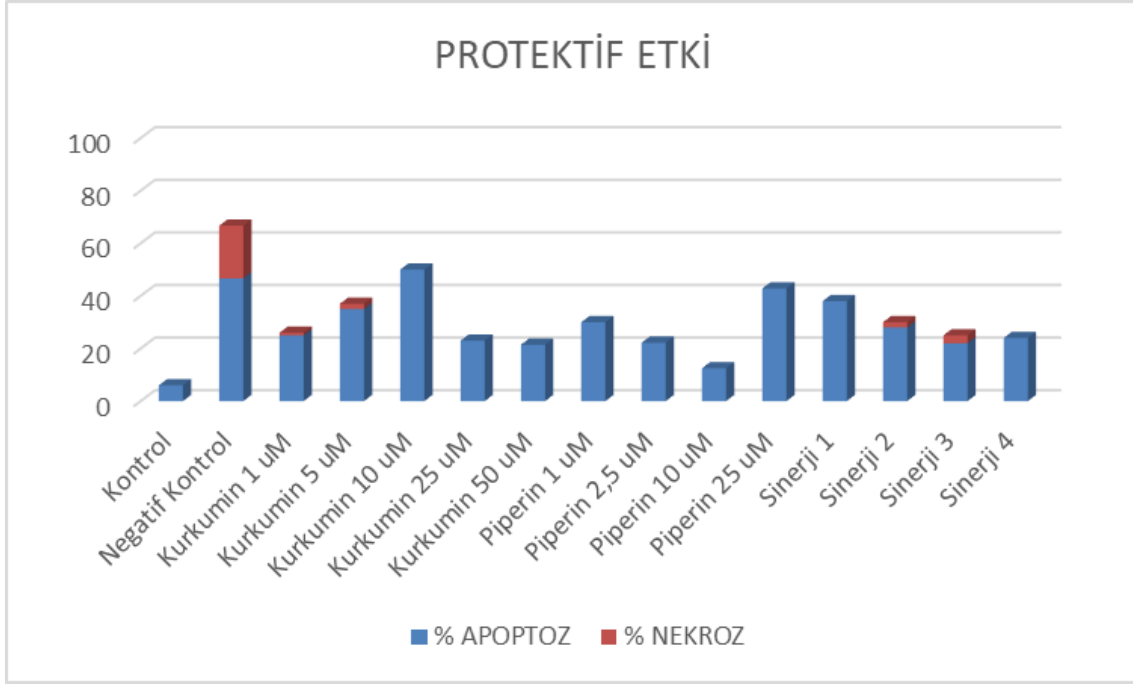
4.5.2.2. Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Belirlenmesi

Deney akış şemasına göre *protektif* deney gruplarının oluşturulmasını takip eden 24. saatte uygulanan AO/PI ikili boyama sonucunda elde edilen hücre görüntülerinden % apoptoz ve nekroz oranları hesaplanmıştır.

Kontrol grubunda %6 oranında apoptotik hücre görülürken nekroz gözlenmemiştir.

$AlCl_3$ uygulaması yapılan **negatif kontrol** grubunda %46,6 apoptoz ve %20 nekroz tespit edilmiştir.

Boyama sonuçları, deney gruplarında negatif kontrole göre daha az hücre ölümü olduğunu göstermiştir. En düşük apoptotik hücre ölümü %12,5 oranı ile piperin 10 µM konsantrasyonunda görülürken en düşük nekrotik hücre sayısı kurkuminin 10, 25 ve 50 µM, piperinin 1, 2,5, 10 ve 25 µM konsantrasyonları ile sinerji 1 ve 4 deney gruplarında gözlenmiştir.



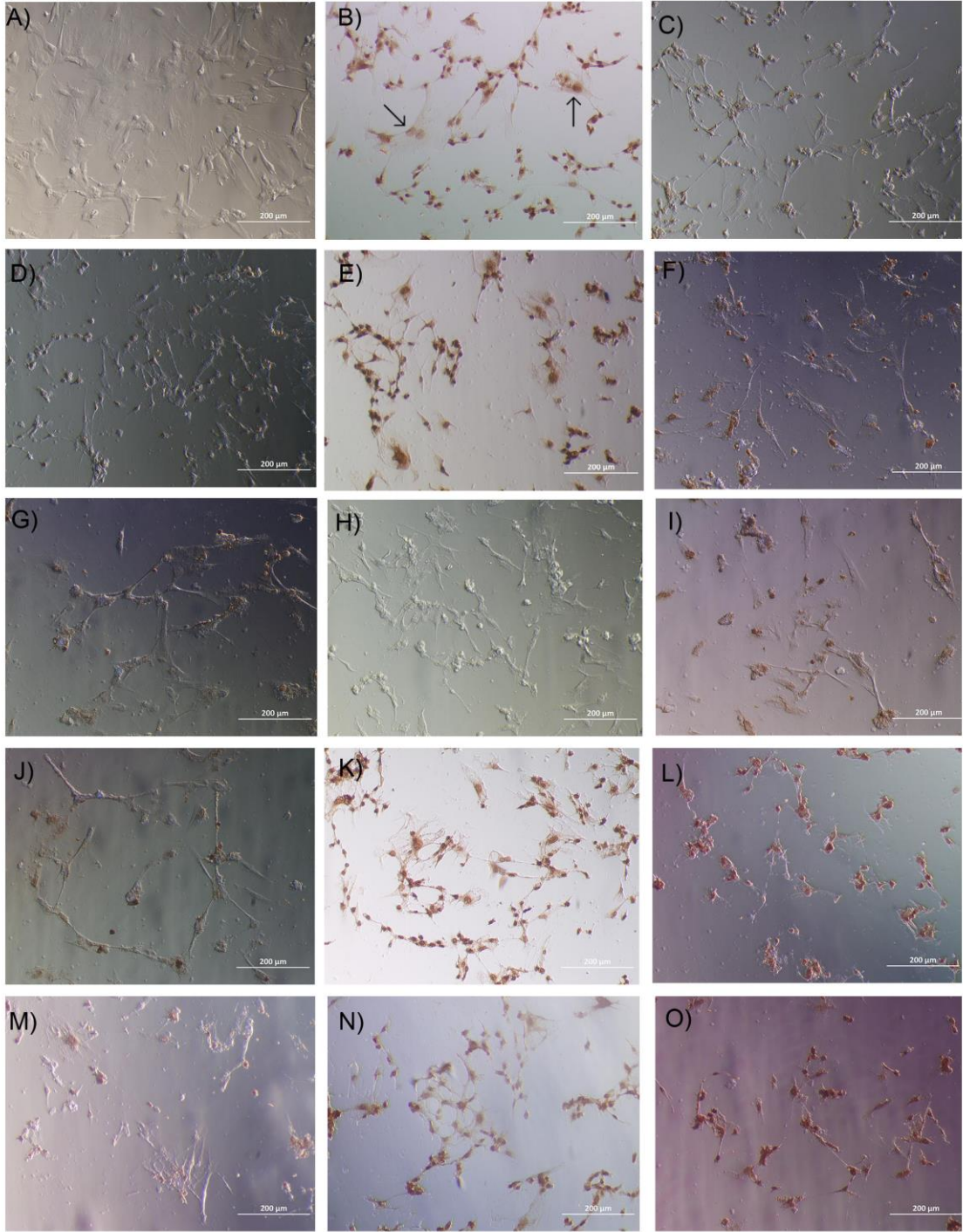
Şekil 4.16. Protektif etki gruplarında apoptoz ve nekroz oranlarının belirlenmesi

4.5.1.3. TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Deney akış şemasına uygun şekilde deney gruplarının oluşturulmasının ardından TUNEL yöntemi ile, astrosit hücrelerinde $AlCl_3$ hasarı ve bu hasarda kurkumin, piperin ve sinerjik etkileri apoptoz bakımından değerlendirilmiştir.

$AlCl_3$ uygulaması yapılmış olan negatif kontrol grubunda, hücrelerde çekirdeklerin kahverengi boyanmalarının daha yoğun olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.16- B.**).

Elde edilen görüntüler, hücre canlılığı verileri ile kıyaslandığında birbirini destekler nitelikte olduğu görülmüştür.



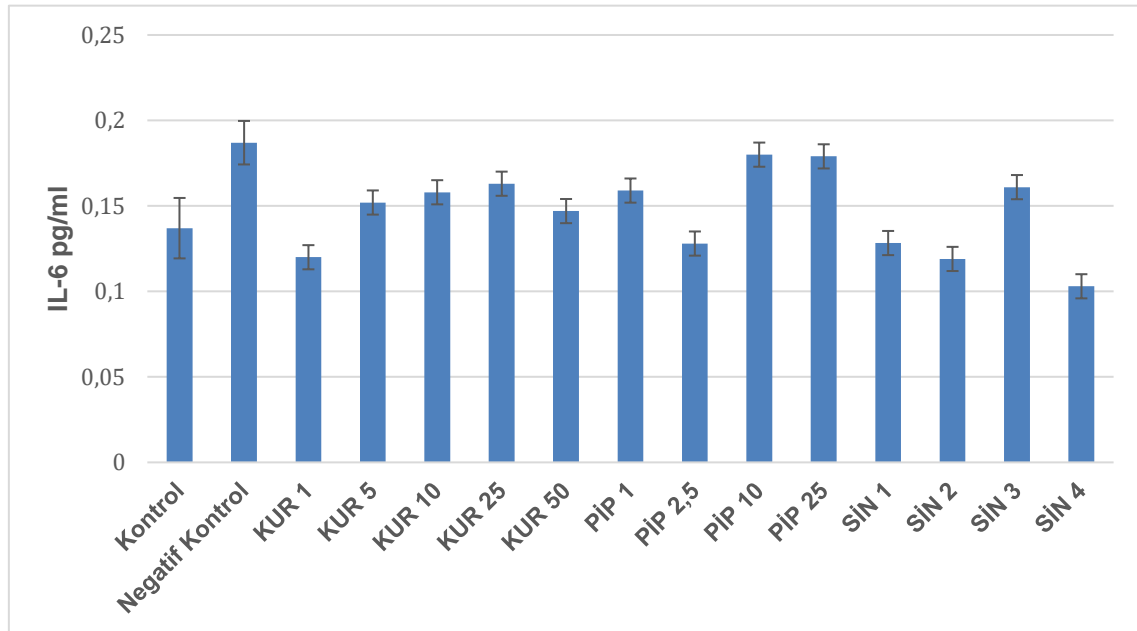
Şekil 4.17. TUNEL yöntemi ile apoptozun gösterilmesi. B'de görülen oklar apoptotik boyanmaları ifade etmektedir. **A)** Kontrol grubu; **B)** Negatif kontrol grubu; **C)** Kurkumin 1 μM ; **D)** Kurkumin 5 μM ; **E)** Kurkumin 10 μM ; **F)** Kurkumin 25 μM ; **G)** Kurkumin 50 μM ; **H)** Piperin 1 μM ; **I)** Piperin 2,5 μM ; **J)** Piperin 10 μM ; **K)** Piperin 25 μM ; **L)** Sinerji 1 (25 μM kurkumin+ 1 μM piperin); **M)** Sinerji 2 (25 μM kurkumin+2,5 μM piperin); **N)** Sinerji 3 (50 μM kurkumin+ 25 μM piperin); **O)**

Sinerji 4 (5 µM kurkumin+ 10 µM piperin) Görüntüler 10X büyütme kullanılarak çekilmiştir.

4.5.2.4. Sitokin Miktarlarının Belirlenmesi

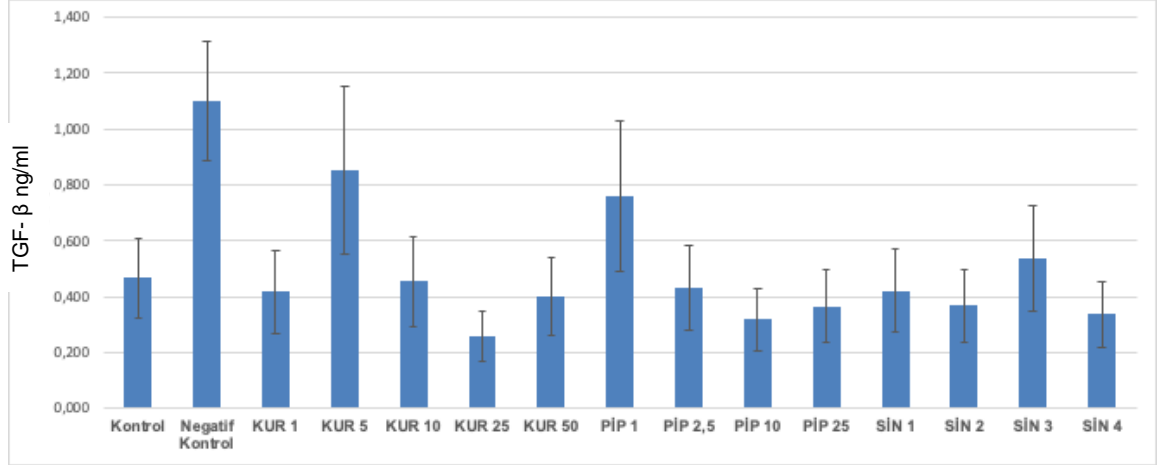
IL-6 ve TGF-β sitokinlerinin nörodejenerasyonda nöroglial hücrelerden salgılandığı bilinmektedir. Elde edilen *protektif* etki sonuçlarında IL-6 ve TGF-β sitokin seviyelerinin, AlCl₃ uygulaması yapılmış **negatif kontrol** grubunda artış gösterdiği gözlenmiştir. Kurkumin, piperin ve sinerjik etki deney gruplarında ise sitokin salınımının negatif kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur.

IL-6 sitokin grafiğinde görüldüğü gibi kurkumin ve sinerji grupları sitokin salınımı bakımından kıyaslandığında; **sinerji 1, 3 ve 4** gruplarından salınan sitokin miktarlarının, **kurkumin** uygulanmış gruplara göre daha az olduğu gözlenmiştir. Bu durumda kurkuminin özellikle 25 ve 50 konsantrasyonlarında gözlenen azalmanın piperin ile birlikte kullanımından dolayı daha da güçlendiği söylenebilir.



Şekil 4.18. IL- 6 sitokin salınımının belirlenmesi. (KUR: kurkumin, PIP: piperin, SIN: sinerji)

Aynı şekilde proenflamatuvar sitokin olan **TGF- β** miktarının negatif kontrolde yüksek oranda salındığı gözlenirken özellikle **Kurkumin 25 μ M** konsantrasyonunda diğer gruplara kıyasla TGF- β salınımının en düşük değerde olduğu görülmüştür (**Şekil 4.18.**).



Şekil 4.19. TGF- β sitokin salınımının belirlenmesi. (KUR: kurkumin, PIP: piperin, SIN: sinerji)

5. TARTIŞMA

MSS farklı işlevler için iş birliği içinde faaliyet gösteren pek çok hücreden meydana gelmektedir. MSS hücrelerinden biri olan *astrositler*, uygun nöronal mikroçevrenin sağlanması ve korunmasında önemli roller üstlenen glial hücrelerdir. MSS'nde meydana gelen patolojik koşullarda vermiş oldukları fizyolojik yanıtlar ile nöronal çevrenin ve nöronların korunmasında rol alırlar. Bu süreçlerde etkin bir şekilde rol almaları nedeniyle MSS patolojilerinin araştırılmasında büyük önem kazanmaktadır.

Normal fizyolojik koşullarda homeostazinin sağlanması ve devamlılığı için hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu denge halindedir. Dejeneratif süreçlerde ise bu homeostatik dengenin bozulduğu görülmektedir. Vücutta Al'un kronik olarak maruziyeti sonucunda vücudun çeşitli bölgelerinde birikim göstererek dejeneratif süreçlere neden olduğu bilinmektedir. Al'a maruz kalma oranı ve Al'un kimyasal yapısı nedeniyle diğer elementlerle bileşik oluşturabilme yeteneği, vücutta birikim gösterme kapasitesini arttırmaktadır. MSS de Al'un birikim göstererek dejeneratif süreçlere neden olduğu başlıca sistemlerden biridir. AD, Parkinson, Amyotrofik lateral skleroz, ensefalopati, epilepsi ve demans Al'un sebep olduğu nörodejeneratif hastalıklar arasındadır [1,6,7]. MSS nin dejeneratif süreçlerinde astrosit hücreleri önemli bir rol oynar ve MSS de en bol bulunan glial hücre tipidir. MSS Al'a maruz kaldığı zaman özellikle astrositlerde birikim göstermektedir. Astrositlerde birikim göstermesinin sonucu olarak astrositlerde hücre gövdesinin küçülmesi de dahil olmak üzere çeşitli morfolojik değişimler ve apoptotik sürecin tetiklendiği bildirilmiştir [52].

Tez çalışması kapsamında primer olarak izole edilen karışık glial kültür hücreleri uygun yoğunluğa ulaştığında saf astrosit hücresi elde edebilmek için literatürde belirtildiği gibi "astrosit zenginleştirme işlemi" gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4.1.**) [92,93]. Astrosit zenginleştirme işleminden sonra ikinci pasajdaki hücreler, astrositlerde yoğun olarak ifade edilmekte olan GFAP molekülü ile karakterize edilmiştir (**Şekil 4.2.**) [94]. Yapılan bir çalışmada primer astrosit hücrelerine ait ikilenme süresi 31 saat olarak belirlenmiştir [95]. Aynı zamanda yapılan diğer çalışmalar farklı koşulların astrosit hücrelerinde ikilenme sürelerinin değiştirdiğini göstermiştir [96,97]. Tez kapsamında deney gruplarının kurulmasından önce

primer olarak izole edilen astrosit hücrelerinin ikilenme zamanının belirlenebilmesi için büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuştur. Literatürdeki ikilenme sürelerinden farklı olarak tez çalışmasında elde edilen primer astrosit hücrelerinin ikilenme zamanı 20,5 saat olarak tespit edilmiştir (**Şekil 4.11.**).

Oshiro ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada glial hücrelerin Al maruziyetine karşı nöronlara kıyasla daha dirençli olduğu gösterilmiştir [98]. Tez çalışması kapsamında Al'un sitotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için literatürden yola çıkılarak belirlenen 200, 400, 800, 1000, 2000, 4000, 8000 ve 10000 µM konsantrasyonlar önce L929 hücre hattı üzerinde test edilmiştir. L929 hücre hattı için hesaplanan IC50 değeri 3763 µM olarak belirlenmiş ve hesaplanan bu değer astrositler üzerinde uygulanmıştır. Ancak astrosit hücrelerinde canlılık %50 üzerinde görülmüştür. Bu elde edilen sonuç, astrosit hücrelerinin koruyucu etkisinin bir göstergesi olarak kabul edilmiş ve primer astrosit hücrelerinde 4000, 6000, 8000 ve 10000 µM konsantrasyonlarda AlCl₃ uygulaması yapılarak yeniden % hücre canlılığı grafiği elde edilmiştir (**Şekil 4.3.**). Uygulanan konsantrasyonların tamamı kontrol grubu ile istatistiksel anlamda kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Elde edilen verilerine göre, primer kortikal astrosit hücrelerinde IC50 değeri 4150 µM olarak belirlenmiştir. L929 ve primer kortikal astrosit hücreleri ile yapılan hücre canlılık analizi sonuçlarına göre; primer kortikal astrosit hücrelerinin L929 fare fibroblastik hücre hattına göre daha dirençli hücreler oldukları tespit edilmiştir. Kress ve ark. tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada, astrosit hücrelerinin Fe⁺³ toksisitesinde bu hücrelerin, oligodendrosit ve nöronlara göre daha dirençli oldukları bildirilmiştir [99]. Khanna ve Behru tarafından 2007 yılında yapılan başka bir çalışma da ise Al toksisitesinde, glial hücrelerin nöronlara göre antioksidan kapasitesinin daha yüksek olduğunu, bu durumun glial hücrelerin glutasyon sentezini teşvik ettiği ve bu doğrultuda da glial hücrelerin Al toksisitesine karşı direncini ve savunma mekanizmalarını yansıttığını bildirmişlerdir [100]. Yapılan bu çalışmalar, elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının daha önce yapılmış olan çalışmalar ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir.

Zerdeçalın etken maddesi olan kurkuminin, çeşitli alanlarda terapötik ve protektif ajan olarak kullanımı araştırılmıştır. Özellikle antiapoptotik karakteri nedeniyle

kanser hastalığı ile ilgili çalışmalarda geniş bir alana sahiptir. Nörodejeneratif süreçlerde de antiapoptotik, antienflamatuar, antiamiloid, antioksidan, nöroprotektif, serebral dolaşımı düzenleyici ve metal şelatlayıcı etkileri, nörogenez aktivitesini arttırarak sinaptogenezi desteklemesi ile araştırmacıların dikkatini çekmektedir [58,101]. Bu özelliklerinin yanı sıra, kullanımının güvenli, düşük maliyetli ve kolay ulaşılabilir bir madde olması nedeniyle çeşitli kültürlerde birbirinden farklı pek çok hastalığın tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda MSS'nin farklı dejeneratif süreçlerde aktif olarak rol aldığı gösterilmiştir [102]. Laabbar ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada astrosit hücreleri üzerinde Al hasarına bağlı olarak gelişen nörodejeneratif süreçler gösterilmiştir. Aynı çalışmada Al hasarına karşı kurkuminin protektif etkileri ortaya konulmuştur [103]. Kurkuminin glioprotektif etkilerinin, antioksidan sistemlerin aktivasyonu ile sağladığını ve kurkumin ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda nörodejeneratif süreçlerde umut vaadedici terapötik bir ajan olduğu bildirilmiştir [103]. Bu tez kapsamında da kurkumin ile yapılan doz belirleme çalışmaları sonucunda, L929 hücre hattı üzerinde yapılan hücre canlılığı analizi ile 24, 48 ve 72. saatlerde kurkuminin 1, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığının %50'nin üzerinde olduğu tespit edilirken, aynı zaman dilimlerinde kurkuminin daha yüksek (25, 50 ve 100 µM) konsantrasyonlarda %50'nin altında hücre canlılığına sahip olduğu gösterilmiştir (**Şekil 4.4.- Şekil 4.6.**).

Karabiberin alkaloid karakterli bir bileşeni olan piperinin; antienflamatuar, antidepresan, immünomodülatör, antiapoptotik, nöroprotektif etkilerinin olduğu bildirilmiştir [12–14]. Aynı zamanda ksenobiyotik ajanlarla birlikte kullanımının, biyoyararlanım açısından etkilerini desteklediği belirtilmiş ve “biyogüçlendirici” olarak ifade edilmiştir [16,17,87]. Tez kapsamında piperinin doz belirleme ve sitotoksosite potansiyelinin incelenebilmesi için L929 hücre hattı üzerinde yapılan hücre canlılığı analizi ile piperinin tüm konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılığının %50 üzerinde olduğu gösterilmiştir (**Şekil 4.7.- Şekil 4.9.**).

Kurkuminin suda çözünmemesi vücut sıvılarındaki çözünürlüğünü de kısıtladığından, kurkuminin biyoyararlanımı açısından bir sorun oluşturmaktadır. Bu sebeple kurkuminin biyolojik olarak desteklenerek kullanımı terapötik ve

protektif etkilerinin anlaşılabilmesinde ve bu süreçlerde etkin bir şekilde kullanılabilmesinde önemli rol oynamaktadır. MSS'nde görülen çeşitli nörojeneratif süreçlerde kurkuminin biyolojik yönden desteklenerek kullanıldığı bildirilmiştir. Biyoyararlanım bakımından kurkuminin sıklıkla nanotaşıyıcılar [104–107] ve piperin [62,64,108–111] ile desteklendiği gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında da kurkumin ile piperinin sinerjik olarak etkin konsantrasyonları belirlenmiştir. Bunun için özellikle mikrobiyoloji alanında sıklıkla kullanılmakta olan “dama tahtası sinerji testi” tercih edilmiş [109] ve metot “**4.3.4. Sinerjik Etki Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**” başlığında anlatıldığı şekilde uygulanarak MTT analizi ile hücre canlılığı tespit edilmiştir. Yapılan MTT analizi sonucunda, kurkuminin piperin ile desteklendiğinde etkisinin hücre canlılığı bakımından sinerjik olarak arttığı belirlenmiştir (**Şekil 4.10.**). Kurkumin ile piperinin birlikte kullanımının sinerjik etki bakımından hücre canlılığının en yüksek olduğu konsantrasyonlar; **Sinerji 1:** 25 µM kurkumin+ 1 µM piperin; **Sinerji 2:** 25 µM kurkumin+ 2,5 µM piperin; **Sinerji 3:** 50 µM kurkumin+ 25 µM piperin ve **Sinerji 4:** 5 µM kurkumin+ 10 µM piperin olarak belirlenmiştir.

Terapötik etki deney grupları kurulduktan sonra (**Çizelge 3.1.**), yapılan hücre canlılığı analizi ile negatif kontrol grubu istatistiksel olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Piperin 1, 2,5, 10 ve 25 µM konsantrasyonları hücre canlılığı bakımından negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, piperinin astrosit hücrelerinde AlCl₃ hasarı bakımından terapötik etkisini göstermektedir. Sinerjik etki konsantrasyonları olan 25 µM kurkumin+ 2,5 µM piperin (Sinerji 2) ve 25 µM kurkumin+ 1 µM piperin (Sinerji 4) konsantrasyonlarındaki % hücre canlılığı ile kurkuminin 25 µM % hücre canlılığı verileri kıyaslandığında hücre canlılığının arttığı görülmektedir. Bu durum da astrosit hücrelerinde AlCl₃ hasarına karşı piperinin biyogüçlendirici karakterini göstermiş ancak istatistiki olarak farklılık bulunamamıştır (**Şekil 4.12.**). *Al'a bağlı gelişen astrosit hasarında kurkumin, piperin ve sinerjik etki gruplarının terapötik etkisi ilk kez tartışılmıştır.*

Protektif etki deney grupları kurulduktan sonra (**Çizelge 3.1.**), yapılan hücre canlılığı analizi ile negatif kontrol grubu istatistiksel olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği gözlenmiştir. İstatistiksel

olarak hücre canlılığı bakımından negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, piperin 2,5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir şekilde hücre canlılığının arttığı gözlenmiştir (**Şekil 4.13.**). Elde edilen bu sonuçlar piperinin astrosit hücrelerinde AlCl₃ hasarına karşı protektif etkisini göstermiştir. Laabbar ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde kurkumin dozlarında da negatif kontrol grubuna göre hücre canlılığının arttığı tespit edilmiştir [112]. Sinerjik etki konsantrasyonları olan 25 µM kurkumin+ 1 µM piperin (Sinerji 1); 25 µM kurkumin+ 2,5 µM piperin (Sinerji 2) ve 25 µM kurkumin+ 1 µM piperin (Sinerji 4) konsantrasyonlarında kullanılan kurkumin konsantrasyonlarında elde edilen hücre canlılıkları sinerjik etki konsantrasyonlarında elde edilen hücre canlılığı ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum piperinin astrosit hücrelerinde AlCl₃ hasarına karşı protektif etkisinin yanında biyogüçlendirici olarak da davranışını desteklemiştir. *Al'a bağlı gelişen astrosit hasarlarında piperin ve piperinin kurkumin üzerindeki biyogüçlendirici etkisi (sinerjik etki) ilk kez tartışılmıştır.*

Terapötik etki ve protektif etki deney gruplarında yapılan AO/PI ikili boyama ve TUNEL metodu sonucunda Al'a maruz kalmış astrosit hücrelerinde morfolojik değişimler görülmüştür. Al'un neden olmuş olduğu bu morfolojik değişimler, Al maruziyeti sonucunda hücrelerdeki enerji metabolizmasının bozulması olarak tanımlanmaktadır [56,113]. Hücrelerdeki enerji metabolizmasının bozulması ise, aktin filamentlerin polimerizasyonunda bozulmaya sebep olarak, hücrelerin daha küresel bir şekil almasına neden olmaktadır [56,113].

MSS'nde IL-6 salınımının temel kaynağı astrosit hücreleridir [114] ve TGF-β ile birlikte nöroprotektif olarak işlev görmektedir [115]. Diniz ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, astrositten salınan TGF-β1'in Aβ oligomerlerine karşı sinapsları koruyan endojen bir mekanizmanın parçası olduğu gösterilmiştir [38]. Yapılan başka bir çalışmada da benzer bir durum olarak IL-6'nın AlCl₃/D-galaktoz ile indüklenen astrosit hasarında proenflamatuvar bir sitokin olarak davrandığını ve hasar sonrasında IL-6 seviyesinin arttığını bildirmişlerdir [116]. Tez çalışması kapsamında da kurkumin, piperin ve sinerji gruplarının protektif etkileri IL-6 ve TGF-β sitokin düzeyleri kapsamında tartışılmıştır. Literatürde yer alan bilgilere benzer şekilde Al maruziyeti sonrasında astrosit hücrelerinde bu sitokinlerin miktarlarında artış görülmüştür (**Şekil 4.17.- 4.18.**). Deney grupları negatif kontrol

grubu ile kıyaslandığında sitokin salınımlarının daha az olduğu görülmüştür. Bu durum; kurkumin, piperin ve sinerji gruplarının astrosit hücrelerinde Al hasarına karşı protektif etkilerini destekler nitelik taşımaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında Al maruziyeti ile oluşabilecek astrosit hücre dejenerasyonlarında kurkuminin teröpatik etkisi, piperinin protektif ve teröpatik etkileri ile piperinin biyogüçlendirici olarak kullanımının yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Kurkumin, piperin ve sinerjik etkilerinin astrosit hücrelerinde Al hasarına karşı terapötik ve protektif etkilerinin daha detaylı incelenebilmesi için moleküler düzeyde ileri analizler yapılması ve bu analizlerin üç boyutlu hücre kültür sistemleri ile *in vivo* hayvan çalışmaları ile desteklenmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] L. Liaquat, S. Sadir, Z. Batool, S. Tabassum, S. Shahzad, A. Afzal, S. Haider, Acute aluminum chloride toxicity revisited: Study on DNA damage and histopathological, biochemical and neurochemical alterations in rat brain, *Life Sciences*. 217 (2019) 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.009>.
- [2] Neurotoxicity of Aluminum, n.d. <http://www.springer.com/series/5584>.
- [3] F. Kar, C. Hacıoglu, S. Uslu, G. Kanbak, Curcumin Acts as Post-protective Effects on Rat Hippocampal Synaptosomes in a Neuronal Model of Aluminum-Induced Toxicity, *Neurochemical Research*. 44 (2019) 2020–2029. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02839-9>.
- [4] M. Nampoothiri, J. John, N. Kumar, J. Mudgal, G.K. Nampurath, M.R. Chamallamudi, Modulatory role of simvastatin against aluminium chloride-induced behavioural and biochemical changes in rats, *Behavioural Neurology*. 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/210169>.
- [5] H. Zhang, P. Wang, H. Yu, K. Yu, Z. Cao, F. Xu, X. Yang, M. Song, Y. Li, Aluminum trichloride-induced hippocampal inflammatory lesions are associated with IL-1B-activated IL-1 signaling pathway in developing rats, *Chemosphere*. 203 (2018) 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.162>.
- [6] K.P. Reichert, M.M. Pillat, M.R.C. Schetinger, N.B. Bottari, T. v. Palma, C.E. Assmann, J.M. Gutierrez, H. Ulrich, C.M. Andrade, C. Exley, V.M.M. Morsch, Aluminum-induced alterations of purinergic signalling in embryonic neural progenitor cells, *Chemosphere*. 251 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126642>.
- [7] M.H. Weng, S.Y. Chen, Z.Y. Li, G.C. Yen, Camellia oil alleviates the progression of Alzheimer's disease in aluminum chloride-treated rats, *Free Radical Biology and Medicine*. 152 (2020) 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.004>.

- [8] I. Matias, A.S. Buosi, F.C.A. Gomes, Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds, *Neurochemistry International*. 95 (2016) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.01.009>.
- [9] C. Gorinova, D. Aluani, Y. Yordanov, M. Kondeva-Burdina, V. Tzankova, C. Popova, K. Yoncheva, In vitro evaluation of antioxidant and neuroprotective effects of curcumin loaded in Pluronic micelles, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 30 (2016) 991–997. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1186500>.
- [10] A. Prema, A. Justin Thenmozhi, T. Manivasagam, M. Mohamed Essa, G.J. Guillemin, Fenugreek Seed Powder Attenuated Aluminum Chloride-Induced Tau Pathology, Oxidative Stress, and Inflammation in a Rat Model of Alzheimer's Disease, *Journal of Alzheimer's Disease*. 60 (2017) S209–S220. <https://doi.org/10.3233/JAD-161103>.
- [11] S.J. Hewlings, D.S. Kalman, Curcumin: A review of its effects on human health, *Foods*. 6 (2017). <https://doi.org/10.3390/foods6100092>.
- [12] W. Laabbar, A. Abbaoui, A. Elgot, M. Mokni, M. Amri, O. Masmoudi-Kouki, H. Gamrani, Aluminum induced oxidative stress, astrogliosis and cell death in rat astrocytes, is prevented by curcumin, *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 112 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101915>.
- [13] C. Ban, M. Jo, Y.H. Park, J.H. Kim, J.Y. Han, K.W. Lee, D.H. Kweon, Y.J. Choi, Enhancing the oral bioavailability of curcumin using solid lipid nanoparticles, *Food Chemistry*. 302 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125328>.
- [14] P.K. Singh, V. Kotia, D. Ghosh, G.M. Mohite, A. Kumar, S.K. Maji, Curcumin modulates α -synuclein aggregation and toxicity, *ACS Chemical Neuroscience*. 4 (2013) 393–407. <https://doi.org/10.1021/cn3001203>.
- [15] A. Jangra, M. Kwatra, T. Singh, R. Pant, P. Kushwah, Y. Sharma, B. Saroha, A.K. Datusalia, B.K. Bezbaruah, Piperine Augments the Protective Effect of Curcumin Against Lipopolysaccharide-Induced Neurobehavioral

- and Neurochemical Deficits in Mice, *Inflammation*. 39 (2016) 1025–1038. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0332-4>.
- [16] A. Tiwari, K.R. Mahadik, S.Y. Gabhe, Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties, *Medicine in Drug Discovery*. 7 (2020) 100027. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100027>.
- [17] V. Yadav, A. Krishnan, D. Vohora, A systematic review on *Piper longum* L.: Bridging traditional knowledge and pharmacological evidence for future translational research, *Journal of Ethnopharmacology*. 247 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112255>.
- [18] G.J. Tortora, V. College, *Principles of Anatomy & Physiology 15th Edition* BRYAN DERRICKSON, n.d.
- [19] C.A. Durkee, A. Araque, Diversity and Specificity of Astrocyte–neuron Communication, *Neuroscience*. 396 (2019) 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.010>.
- [20] M. v. Sofroniew, H. v. Vinters, Astrocytes: Biology and pathology, *Acta Neuropathologica*. 119 (2010) 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.
- [21] S.A. Liddelov, B.A. Barres, Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential, *Immunity*. 46 (2017) 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>.
- [22] F. Giovannoni, F.J. Quintana, The Role of Astrocytes in CNS Inflammation, *Trends in Immunology*. 41 (2020) 805–819. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007>.
- [23] H.K. Rucker, H.J. Wynder, W.E. Thomas, *Cellular mechanisms of CNS pericytes*, 2000.
- [24] A. Verkhratsky, M.S. Ho, R. Zorec, V. Parpura, Neuroglia in Neurodegenerative Diseases, 1175. <http://www.springer.com/series/5584>.
- [25] N. Delgehyr, A. Meunier, M. Faucourt, M.B. Grau, L. Strehl, C. Janke, N. Spassky, Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated

- cells, *Methods in Cell Biology*. 127 (2015) 19–35. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.004>.
- [26] B. Elbakary, R.K.S. Badhan, A dynamic perfusion based blood-brain barrier model for cytotoxicity testing and drug permeation, *Scientific Reports*. 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60689-w>.
- [27] G. Perea, M. Navarrete, A. Araque, Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information, *Trends in Neurosciences*. 32 (2009) 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>.
- [28] H. Ikeshima-Kataoka, Neuroimmunological implications of AQP4 in astrocytes, *International Journal of Molecular Sciences*. 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17081306>.
- [29] M. Kinboshi, A. Ikeda, Y. Ohno, Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis, *Frontiers in Neurology*. 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.626658>.
- [30] H. Phatnani, T. Maniatis, Astrocytes in neurodegenerative disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 7 (2015) 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020628>.
- [31] V. Parpura, A. Verkhratsky, Astrocytes revisited: Concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling, *Croatian Medical Journal*. 53 (2012) 518–528. <https://doi.org/10.3325/cmj.2012.53.518>.
- [32] S. Michinaga, Y. Koyama, Dual roles of astrocyte-derived factors in regulation of blood-brain barrier function after brain damage, *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20030571>.
- [33] C.F. Lien, S.K. Mohanta, M. Frontczak-Baniewicz, J.D. Swinny, B. Zablocka, D.C. Górecki, Absence of glial α -dystrobrevin causes abnormalities of the blood-brain barrier and progressive brain edema, *Journal of Biological Chemistry*. 287 (2012) 41374–41385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400044>.
- [34] Y. Takeshita, R.M. Ransohoff, Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models, n.d.

- [35] N.J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nature Reviews Neuroscience*. 7 (2006) 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>.
- [36] P. Kofuji, A. Araque, G-Protein-Coupled Receptors in Astrocyte–Neuron Communication, *Neuroscience*. 456 (2021) 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.025>.
- [37] D.K. Binder, C. Steinhäuser, Astrocytes and Epilepsy, *Neurochemical Research*. 46 (2021) 2687–2695. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03236-x>.
- [38] L.P. Diniz, V. Tortelli, I. Matias, J. Morgado, A.P.B. Araujo, H.M. Melo, G.S. Seixas da Silva, S. v. Alves-Leon, J.M. de Souza, S.T. Ferreira, F.G. de Felice, F.C.A. Gomes, Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against A β oligomers in Alzheimer’s disease model, *Journal of Neuroscience*. 37 (2017) 6797–6809. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3351-16.2017>.
- [39] L.P. Diniz, I.C.P. Matias, M.N. Garcia, F.C.A. Gomes, Astrocytic control of neural circuit formation: Highlights on TGF-beta signaling, *Neurochemistry International*. 78 (2014) 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.07.008>.
- [40] L.P. Diniz, J.C. Almeida, V. Tortelli, C.V. Lopes, P. Setti-Perdigão, J. Stipursky, S.A. Kahn, L.F. Romão, J. de Miranda, S.V. Alves-Leon, J.M. de Souza, N.G. Castro, R. Panizzutti, F.C.A. Gomes, Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor β signaling through modulation of d-serine levels in cerebral cortex neurons, *Journal of Biological Chemistry*. 287 (2012) 41432–41445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380824>.
- [41] B. v. Zlokovic, Neurovascular mechanisms of Alzheimer’s neurodegeneration, *Trends in Neurosciences*. 28 (2005) 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.02.001>.
- [42] S.S. Choi, H.J. Lee, I. Lim, J.I. Satoh, S.U. Kim, Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines, *PLoS ONE*. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092325>.

- [43] M. v. Sofroniew, Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators, *Neuroscientist*. 20 (2014) 160–172. <https://doi.org/10.1177/1073858413504466>.
- [44] G. Berthon, Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity, n.d. www.elsevier.com/locate/ccr.
- [45] G.M. Abu-Taweel, M.G. Al-Mutary, Pomegranate juice rescues developmental, neurobehavioral and biochemical disorders in aluminum chloride-treated male mice, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 63 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126655>.
- [46] M. Kawahara, M. Kato-Negishi, Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses, *International Journal of Alzheimer's Disease*. (2011). <https://doi.org/10.4061/2011/276393>.
- [47] G.M. Abu-Taweel, M.G. Al-Mutary, Pomegranate juice rescues developmental, neurobehavioral and biochemical disorders in aluminum chloride-treated male mice, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 63 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126655>.
- [48] K. Klotz, W. Weistenhöfer, F. Neff, A. Hartwig, C. van Thriel, H. Drexler, The health effects of aluminum exposure, *Deutsches Arzteblatt International*. 114 (2017) 653–659. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0653>.
- [49] M. Bhadauria, Combined treatment of HEDTA and propolis prevents aluminum induced toxicity in rats, *Food and Chemical Toxicology*. 50 (2012) 2487–2495. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.040>.
- [50] A. Prakash, G.J. Dushendra Babu, M. Lavanya, K. Shenbaga Vidhya, T. Devasena, Toxicity Studies of Aluminium Oxide Nanoparticles in Cell Lines, 2011. <http://www.ripublication.com/ijna.htm>.
- [51] Neurotoxicity of Aluminum, n.d. <http://www.springer.com/series/5584>.
- [52] Q. Yu, K. Zhu, Y. Ding, R. Han, D. Cheng, Comparative study of aluminum (Al) speciation on apoptosis-promoting process in PC12 cells: Correlations between morphological characteristics and mitochondrial kinetic disorder,

- Journal of Inorganic Biochemistry. 232 (2022) 111835. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111835>.
- [53] J. Lemire, R.J. Mailloux, V.D. Appanna, Mitochondrial lactate dehydrogenase is involved in oxidative-energy metabolism in human astrocytoma cells (CCF-STTG1), PLoS ONE. 3 (2008). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001550>.
- [54] J. Lemire, V.D. Appanna, Aluminum toxicity and astrocyte dysfunction: A metabolic link to neurological disorders, Journal of Inorganic Biochemistry. 105 (2011) 1513–1517. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.001>.
- [55] J. Lemire, R. Mailloux, S. Puisseux-Dao, V.D. Appanna, Aluminum-induced defective mitochondrial metabolism perturbs cytoskeletal dynamics in human astrocytoma cells, Journal of Neuroscience Research. 87 (2009) 1474–1483. <https://doi.org/10.1002/jnr.21965>.
- [56] J. Lemire, V.D. Appanna, Aluminum toxicity and astrocyte dysfunction: A metabolic link to neurological disorders, Journal of Inorganic Biochemistry. 105 (2011) 1513–1517. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.001>.
- [57] F.W. Pfrieger, Outsourcing in the brain: Do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes?, BioEssays. 25 (2003) 72–78. <https://doi.org/10.1002/bies.10195>.
- [58] B. Salehi, Z. Stojanović-Radić, J. Matejić, M. Sharifi-Rad, N. v. Anil Kumar, N. Martins, J. Sharifi-Rad, The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials, European Journal of Medicinal Chemistry. 163 (2019) 527–545. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.016>.
- [59] B. Salehi, D. Calina, A.O. Docea, N. Koirala, S. Aryal, D. Lombardo, L. Pasqua, Y. Taheri, C.M.S. Castillo, M. Martorell, N. Martins, M. Iriti, H.A.R. Suleria, J. Sharifi-rad, Curcumin's nanomedicine formulations for therapeutic application in neurological diseases, Journal of Clinical Medicine. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/jcm9020430>.
- [60] B. Kocaadam, N. Şanlıer, Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health, Critical Reviews in Food

Science and Nutrition. 57 (2017) 2889–2895.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>.

- [61] X.Y. Xu, X. Meng, S. Li, R.Y. Gan, Y. Li, H. bin Li, Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: Current progress, challenges, and perspectives, *Nutrients*. 10 (2018).
<https://doi.org/10.3390/nu10101553>.
- [62] S. Singh, P. Kumar, Neuroprotective potential of curcumin in combination with piperine against 6-hydroxy dopamine induced motor deficit and neurochemical alterations in rats, *Inflammopharmacology*. 25 (2017) 69–79. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0297-9>.
- [63] S. Singh, P. Kumar, Neuroprotective Activity of Curcumin in Combination with Piperine against Quinolinic Acid Induced Neurodegeneration in Rats, *Pharmacology*. 97 (2016) 151–160. <https://doi.org/10.1159/000443896>.
- [64] S. Singh, S. Jamwal, P. Kumar, Piperine Enhances the Protective Effect of Curcumin Against 3-NP Induced Neurotoxicity: Possible Neurotransmitters Modulation Mechanism, *Neurochemical Research*. 40 (2015) 1758–1766. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1658-2>.
- [65] M.A. Hickey, C. Zhu, V. Medvedeva, R.P. Lerner, S. Patassini, N.R. Franich, P. Maiti, S.A. Frautschy, S. Zeitlin, M.S. Levine, M.F. Chesselet, Improvement of neuropathology and transcriptional deficits in CAG 140 knock-in mice supports a beneficial effect of dietary curcumin in Huntington's disease, *Molecular Neurodegeneration*. 7 (2012). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-12>.
- [66] Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014 Dec 1;19(12):20091-112. doi: 10.3390/molecules191220091. PMID: 25470276; PMCID: PMC6270789
- [67] M. Teymouri, M. Pirro, T.P. Johnston, A. Sahebkar, Curcumin as a multifaceted compound against human papilloma virus infection and cervical cancers: A review of chemistry, cellular, molecular, and preclinical features, *BioFactors*. 43 (2017) 331–346. <https://doi.org/10.1002/biof.1344>.

- [68] S. Caito, M. Aschner, Neurotoxicity of metals, 2015.
- [69] S. Prasad, D. Dubourdieu, A. Srivastava, P. Kumar, R. Lall, Metal–curcumin complexes in therapeutics: An approach to enhance pharmacological effects of curcumin, *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22137094>.
- [70] J. Yuan, W. Liu, H. Zhu, X. Zhang, Y. Feng, Y. Chen, H. Feng, J. Lin, Curcumin attenuates blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in mice, *Journal of Surgical Research*. 207 (2017) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.090>.
- [71] K.I. Priyadarsini, The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent, *Molecules*. 19 (2014) 20091–20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>.
- [72] C.P.V. Mary, S. Vijayakumar, R. Shankar, Metal chelating ability and antioxidant properties of Curcumin-metal complexes – A DFT approach, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 79 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.10.022>.
- [73] F. di Meo, S. Margarucci, U. Galderisi, S. Crispi, G. Peluso, Curcumin, gut microbiota, and neuroprotection, *Nutrients*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/nu11102426>.
- [74] M.C. Scuto, C. Mancuso, B. Tomasello, M.L. Ontario, A. Cavallaro, F. Frasca, L. Maiolino, A.T. Salinaro, E.J. Calabrese, V. Calabrese, Curcumin, hormesis and the nervous system, *Nutrients*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/nu11102417>.
- [75] H. Yavarpour-Bali, M. Pirzadeh, M. Ghasemi-Kasman, Curcumin-loaded nanoparticles: A novel therapeutic strategy in treatment of central nervous system disorders, *International Journal of Nanomedicine*. 14 (2019) 4449–4460. <https://doi.org/10.2147/IJN.S208332>.
- [76] E.N. Yilmaz, S. Bay, G. Ozturk, M.H. Ucisik, Neuroprotective effects of curcumin-loaded emulsomes in a laser axotomy-induced cns injury model, *International Journal of Nanomedicine*. 15 (2020) 9211–9229. <https://doi.org/10.2147/IJN.S272931>.

- [77] B. Salehi, D. Calina, A.O. Docea, N. Koirala, S. Aryal, D. Lombardo, L. Pasqua, Y. Taheri, C.M.S. Castillo, M. Martorell, N. Martins, M. Iriti, H.A.R. Suleria, J. Sharifi-rad, Curcumin's nanomedicine formulations for therapeutic application in neurological diseases, *Journal of Clinical Medicine*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/jcm9020430>.
- [78] P. Maiti, G.L. Dunbar, Use of curcumin, a natural polyphenol for targeting molecular pathways in treating age-related neurodegenerative diseases, *International Journal of Molecular Sciences*. 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19061637>.
- [79] M. Beckerman, Chaperones, Endoplasmic Reticulum Stress, and the Unfolded Protein Response, in: 2009: pp. 391–410. https://doi.org/10.1007/978-0-387-98173-4_18.
- [80] *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease i*, 2007.
- [81] S. Awasthi, U. Pandya, S.S. Singhal, J.T. Lin, V. Thiviyanathan, W.E. Seifert, Y.C. Awasthi, G.A.S. Ansari, Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S- transferase P1-1, *Chemico-Biological Interactions*. 128 (2000) 19–38. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00185-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00185-X).
- [82] D. Jat, P. Parihar, S.C. Kothari, M.S. Parihar, Curcumin Reduces Oxidative Damage By Increasing Reduced Glutathione And Preventing Membrane Permeability Transition In Isolated Brain Mitochondria, *Cell. Mol. Biol*. 59 (2013). <https://doi.org/10.14715/cmb/2013.59.s.14>.
- [83] C.B. Bharat Aggarwal, A.B. Kunnumakkara, D. Bordoloi, G. Padmavathi, J. Monisha, N. Kishor Roy, S. Prasad, B.B. Aggarwal, Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases, (2016). <https://doi.org/10.1111/bph.v174.11/issuetoc>.
- [84] G.P. Lim, T. Chu, F. Yang, W. Beech, S.A. Frautschy, G.M. Cole, *The Curry Spice Curcumin Reduces Oxidative Damage and Amyloid Pathology in an Alzheimer Transgenic Mouse*, 2001.

- [85] Biswas, S. K., McClure, D., Jimenez, L. A., Megson, I. L., & Rahman, I. (2005). Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxidants & redox signaling*, 7(1-2), 32-41.
- [86] M. Mazidi, E. Karimi, M. Meydani, M. Ghayour-Mobarhan, G.A. Ferns, Potential effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor- γ in vitro and in vivo, *World Journal of Methodology*. 6 (2016) 112. <https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i1.112>.
- [87] I.U. Haq, M. Imran, M. Nadeem, T. Tufail, T.A. Gondal, M.S. Mubarak, Piperine: A review of its biological effects, *Phytotherapy Research*. 35 (2021) 680–700. <https://doi.org/10.1002/ptr.6855>.
- [88] B. Chopra, A.K. Dhingra, R.P. Kapoor, D.N. Prasad, Piperine and Its Various Physicochemical and Biological Aspects: A Review, *Open Chemistry Journal*. 3 (2017) 75–96. <https://doi.org/10.2174/1874842201603010075>.
- [89] S.H. Lee, H.Y. Kim, S.Y. Back, H.K. Han, Piperine-mediated drug interactions and formulation strategy for piperine: recent advances and future perspectives, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 14 (2018) 43–57. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1418854>.
- [90] S. Shityakov, E. Bigdelian, A.A. Hussein, M.B. Hussain, Y.C. Tripathi, M.U. Khan, M.A. Shariati, Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 176 (2019) 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.002>.
- [91] G. Randhawa, J. Kullar, Rajkumar, Bioenhancers from mother nature and their applicability in modern medicine, *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 1 (2011) 5. <https://doi.org/10.4103/2229-516x.81972>.
- [92] S. Schildge, C. Bohrer, K. Beck, C. Schachtrup, Isolation and culture of mouse cortical astrocytes., *J Vis Exp*. (2013). <https://doi.org/10.3791/50079>.

- [93] K.W. Zeng, H. Fu, G.X. Liu, X.M. Wang, Aluminum maltolate induces primary rat astrocyte apoptosis via overactivation of the class III PI3K/Beclin 1-dependent autophagy signal, *Toxicology in Vitro*. 26 (2012) 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.11.010>.
- [94] A. Abdelhak, M. Foschi, S. Abu-Rumeileh, J.K. Yue, L. D'Anna, A. Huss, P. Oeckl, A.C. Ludolph, J. Kuhle, A. Petzold, G.T. Manley, A.J. Green, M. Otto, H. Tumani, Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders, *Nature Reviews Neurology*. 18 (2022) 158–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00616-3>.
- [95] Y. Miyakoshi, Y. Suzuki, M. Ooida, *Micronucleus Astrocytes Test Using Cultured New Born Rat*, 1999.
- [96] W.-H. Lee, M.-Y. Yeh, Y.-C. Tu, S.-H. Han, Y.-C. Wanc, Establishment and Characterization of a Malignant Glioma Cell Line, GBM8401 /TSGH,N DMC, 1988.
- [97] K. Yamagata, Y. Nara, M. Tagamit, Y. Yamorit, *Demonstration Of Hereditarily Accelerated Taneously Hypertensive Rats Proliferation In Astrocytes Derived From Spon*, 1995.
- [98] S. Oshiro, M. Kawahara, Y. Kuroda, C. Zhang, Y. Cai, S. Kitajima, M. Shirao, Glial cells contribute more to iron and aluminum accumulation but are more resistant to oxidative stress than neuronal cells, n.d. www.elsevier.com/locate/bba.
- [99] G.J. Kress, K.E. Dineley, I.J. Reynolds, *The Relationship between Intracellular Free Iron and Cell Injury in Cultured Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes*, 2002.
- [100] P. Khanna, B. Nehru, Antioxidant enzymatic system in neuronal and glial cells enriched fractions of rat brain after aluminum exposure, *Cellular and Molecular Neurobiology*. 27 (2007) 959–969. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9233-2>.
- [101] S. Caito, M. Aschner, *Neurotoxicity of metals*, 2015.
- [102] *An Overview of Curcumin in Neurological Disorders*, (n.d.).

- [103] W. Laabbar, A. Abbaoui, A. Elgot, M. Mokni, M. Amri, O. Masmoudi-Kouki, H. Gamrani, Aluminum induced oxidative stress, astrogliosis and cell death in rat astrocytes, is prevented by curcumin, *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 112 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101915>.
- [104] C. Puglia, G. Frasca, T. Musumeci, L. Rizza, G. Puglisi, F. Bonina, S. Chiechio, Curcumin loaded NLC induces histone hypoacetylation in the CNS after intraperitoneal administration in mice, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 81 (2012) 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.03.015>.
- [105] E.N. Yilmaz, S. Bay, G. Ozturk, M.H. Ucisik, Neuroprotective effects of curcumin-loaded emulsomes in a laser axotomy-induced CNS injury model, *International Journal of Nanomedicine*. 15 (2020) 9211–9229. <https://doi.org/10.2147/IJN.S272931>.
- [106] N.A. Noor, E.N. Hosny, Y.A. Khadrawy, I.M. Mourad, A.I. Othman, H.S. Aboul Ezz, H.S. Mohammed, Effect of curcumin nanoparticles on streptozotocin-induced male Wistar rat model of Alzheimer's disease, *Metabolic Brain Disease*. 37 (2022) 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00897-z>.
- [107] M. Mohajeri, M. Sadeghizadeh, F. Najafi, M. Javan, Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair, *Neuropharmacology*. 99 (2015) 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.013>.
- [108] S. Singh, P. Kumar, Neuroprotective Activity of Curcumin in Combination with Piperine against Quinolinic Acid Induced Neurodegeneration in Rats, *Pharmacology*. 97 (2016) 151–160. <https://doi.org/10.1159/000443896>.
- [109] A.S.A. Manap, A.C.W. Tan, W.H. Leong, A.Y.Y. Chia, S. Vijayabalan, A. Arya, E.H. Wong, F. Rizwan, U. Bindal, S. Koshy, P. Madhavan, Synergistic effects of curcumin and piperine as potent acetylcholine and amyloidogenic inhibitors with significant neuroprotective activity in sh-sy5y cells via

computational molecular modeling and in vitro assay, *Frontiers in Aging Neuroscience*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00206>.

- [110] A. Jangra, M. Kwatra, T. Singh, R. Pant, P. Kushwah, Y. Sharma, B. Saroha, A.K. Datusalia, B.K. Bezbaruah, Piperine Augments the Protective Effect of Curcumin Against Lipopolysaccharide-Induced Neurobehavioral and Neurochemical Deficits in Mice, *Inflammation*. 39 (2016) 1025–1038. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0332-4>.
- [111] M. Bishnoi, K. Chopra, L. Rongzhu, S.K. Kulkarni, Protective effect of curcumin and its combination with piperine (bioavailability enhancer) against haloperidol-associated neurotoxicity: Cellular and neurochemical evidence, *Neurotoxicity Research*. 20 (2011) 215–225. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9229-4>.
- [112] W. Laabbar, A. Abbaoui, A. Elgot, M. Mokni, M. Amri, O. Masmoudi-Kouki, H. Gamrani, Aluminum induced oxidative stress, astrogliosis and cell death in rat astrocytes, is prevented by curcumin, *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 112 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101915>.
- [113] J. Lemire, R. Mailloux, S. Puiseux-Dao, V.D. Appanna, Aluminum-induced defective mitochondrial metabolism perturbs cytoskeletal dynamics in human astrocytoma cells, *Journal of Neuroscience Research*. 87 (2009) 1474–1483. <https://doi.org/10.1002/jnr.21965>.
- [114] J.P. Blass, ed., *Neurochemical Mechanisms in Disease*, Springer New York, New York, NY, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7104-3>.
- [115] M. Obulesu, M. Jhansilakshmi, Neuroinflammation in Alzheimer's disease: an understanding of physiology and pathology, *International Journal of Neuroscience*. 124 (2014) 227–235. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.831852>.
- [116] Y. Hu, X. Fang, J. Wang, T.-T. Ren, Y.-Y. Zhao, J.-F. Dai, X.-Y. Qin, R. Lan, Astragalosin attenuates AlCl₃/D-galactose-induced aging-like disorders by inhibiting oxidative stress and neuroinflammation, *NeuroToxicology*. 91 (2022) 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.05.003>.