



PENTİLENTETRAZOL İLE UYARILMIŞ EPİLEPSİ MODELİNDE HESPERİDİN VE VALPROİK ASİT KOMBİNE UYGULAMASININ OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SAVUNMA ÜZERİNE ETKİSİ

Emel SERDAROĞLU KAŞIKÇI^{1,2*}, Burcu ÇEVRELİ², Kaan CENGİZ¹, Uğur COŞKUN¹,
Tayfun GÖZLER² Berfin TANHAN¹, Muhsin KONUK¹

¹ Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye
² Üsküdar Üniversitesi, Nöropsikofarmakoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Epilepsi dünya çapında popülasyonun yaklaşık %1'ini etkileyen psikolojik ve duygusal parametrelerde anlamlı değişiklikler ile ilişkili karmaşık nörolojik bir durumdur. Oksidatif stres pek çok nörodejeneratif bozuklukta nöronal hasarı açıklamak için kullanılan ortak bir yoldur. Bir bioflavonoid olan hesperidin'in nöroprotektif, antiinflamatuvar, analjezik, antibakteriyel, antihiperkolesterolemik ve antikanser özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda hesperidin ve anti epileptik ilaçlardan valproik asit'in kombine uygulamasının beyin ve karaciğer doku örneklerinde oksidan-antioksidan savunma üzerine etkilerini araştırmayı hedefledik. Bu amaçla 48 adet 3 aylık 200-250 gram erkek Wistar-Albino türü sıçan kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 8 adet olmak üzere 6 gruba ayrıldı: Grup 1: Kontrol, Grup 2: pentilentetrazol (60 mg/kg intraperitoneal), Grup 3: hesperidin (100 mg/kg oral), Grup 4: pentilentetrazol + hesperidin, Grup 5: pentilentetrazol + valproik asit (400 mg/kg intraperitoneal), Grup 6: pentilentetrazol + valproik asit + hesperidin. Kimyasal ajanlar kontrol grubu dışındaki tüm gruplara 1-7-14-28.günlerde verildi ve deney sonunda elde edilen doku homojenatlarında glutatyon ve malondialdehit düzeyleri ile süperoksit dismutaz aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar SPSS programında istatistik analize tabi tutuldu ve $p \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Çalışmamızda pentilentetrazol verilen grupta glutatyon düzeyleri ile süperoksit dismutaz aktivitesinin azaldığı, malondialdehit düzeylerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. Valproik asit ve hesperidin kombine uygulamasının pentilentetrazol ile oluşturulan epilepsi modelinde beyin ve karaciğer glutatyon düzeylerini anlamlı düzeyde artırdığı, malondialdehit düzeylerini ise azalttığı saptandı. Beyin doku örneklerinde hesperidin'in gerek tek başına gerekse valproik asit ile birlikte verildiğinde pentilentetrazol ve pentilentetrazol+ valproik asit gruplarına kıyasla süperoksit dismutaz aktivitesini anlamlı derecede artırdığı gözlemlendi. Karaciğer dokusunda ise kontrol grubuna kıyasla hesperidin'in süperoksit dismutaz aktivitesini anlamlı derecede artırdığı, beyin ve karaciğer örneklerinde pentilentetrazol grubuna kıyasla hesperidin grubunda da süperoksit dismutaz aktivitesinin anlamlı derecede arttığı görülmektedir. Sonuçlarımız hesperidin'in anti epileptik tedavi ile birlikte kullanıldığında antioksidan aktiviteyi artırabileceğini ve bazı çalışmalarda gösterilen valproik asit'in olası yan etkilerini azaltabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, Hesperidin, Valproik asit, Oksidan-antioksidan savunma sistemi

EFFECT OF COMBINED IMPLEMENTATION HESPERIDIN AND VALPROIC ACID ON OXIDANT-ANTIOXIDANT DEFENSE IN A PENTYLENETETRAZOL INDUCED EPILEPSY MODEL

ABSTRACT

Epilepsy is a complex neurological condition associated with significant changes in psychological and emotional parameters affecting approximately 1% of the population worldwide. Oxidative stress is a common pathway used to explain neuronal damage in many neurodegenerative disorders. Hesperidin, a bioflavonoid, has been reported to have neuroprotective, anti-inflammatory, analgesic, antibacterial, anti hypercholesterolemia and anticancer properties. In this study, it was aimed to investigate the effects of combined use of a valproic acid, an anti epileptic drug, with hesperidin on oxidant-antioxidant defense system both in brain and liver tissue specimens. For this purpose, a total of 48, 3-months old, and 200-250 gram male Wistar-Albino rats were divided into 6 groups. Group 1 was the Control. Group 2: pentylenetetrazole (60 mg / kg intraperitoneal), Group 3: hesperidin (100 mg / kg oral), Group 4: pentylenetetrazole + hesperidin, Group 5: pentylenetetrazole + valproic acid (400 mg / kg ip), Group 6: pentylenetetrazole + valproic acid + hesperidin. The results were subjected to statistical analysis by employing SPSS software and $p \leq 0.05$ accepted as significant value. Chemical agents were given to all groups outside the control group at 1-7-14-28 days. Glutathione, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity were determined in

*Sorumlu Yazar: emel.serdaroglu@uskudar.edu.tr

Geliş: 04.07.2018 Kabul: 19.01.2019

the brain and liver tissue homogenates obtained at the end of the experiment. The results showed that while glutathione levels and superoxide dismutase activity decreased, malondialdehyde levels increased significantly in pentylenetetrazole group. In the combination of valproic acid and hesperidin increased brain and liver glutathione levels significantly and decreased malondialdehyde levels in the epilepsy model produced by pentylenetetrazole. It was also observed that hesperidin significantly increased superoxide dismutase activity in brain tissue samples when compared to pentylenetetrazole and pentylenetetrazole + valproic acid groups when it was given alone or together with valproic acid. In liver tissue, hesperidin increased superoxide dismutase activity significantly compared to control group, and superoxide dismutase activity increased significantly in brain and liver specimens compared to both pentylenetetrazole group and hesperidin group. Our results demonstrate that hesperidin may increase antioxidant activity when used in combination with antiepileptic drugs and may reduce the potential side effects of valproic acid alone.

Keywords: Epilepsy, Hesperidin, Valproic acid, Oxidant-antioxidant defence system

1. GİRİŞ

Epilepsi; merkezi sinir sisteminde, kortikal veya subkortikal bölgelerde yer alan nöron gruplarının ani, anormal ve hipersenkron deşarjları sonucu ortaya çıkan ve genellikle tekrarlayıcı nitelikte olan klinik bir tablodur [1,2]. Başka bir deyişle epilepsi; kognitif, psikolojik, nörobiyolojik ve sosyal durumun sonuçları ile sürekli bir epileptik nöbet oluşturmaya yatkınlık ile karakterize bir bozukluktur [3]. Epileptik nöbet, gelişmiş ülkelerde sık görülen nörolojik bir hastalıktır [1, 4, 5]. Yapılan çalışmalarda epilepsi görülme oranının çocukluk çağında ve yaşlılıkta en yüksek düzeyde olduğu gözlemlenirken, erken erişkinlikte daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir [6-8].

Epilepsi oluşumunda hangi mekanizmanın rol oynadığı tam olarak bilinmemektedir [9-11]. Yapılan çalışmalarda oksidatif stresin bilişsel fonksiyonlardaki eksiklikler ile karakterize bazı nörodejeneratif bozuklukların patolojisinde önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir [12]. Nöronal hücre ölümü pek çok faktörün etkisi altında bir nöbet tarafından tetiklenebilmektedir. Bunlar genetik faktörler, artmış glutamaterjik hücre toksisitesine yol açan elektrolit metabolizma bozuklukları, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresdir [13]. Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidan savunma moleküllerinin oluşumundaki dengesizlikten kaynaklanan, hücre hasarı ve onun ölümüne yol açan yapısal değişikliklere neden olarak, biyolojik makromoleküllere etki etmektedir [14].

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkenlerin etkisiyle de oluşabilir. Serbest radikal oluşturan kaynaklar başta moleküler oksijen, virüsler, ultraviyole ışınları, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, bazı tahrip edici kimyasallar, pestisitler ve birçok başka etkenlerdir [15,16].

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA'nın oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen moleküllere antioksidan adı verilir. Flavonoidler aromatik hidroksil gruplarının varlığından dolayı antioksidan aktiviteleri çok iyi bilinen diyet destekleridir. Bir bioflavonoid olan hesperidin (5, 7, 3'-trihidroksi-4'-metoksi-flavanon 7-ramno glukozid); flavanon hesperitin ve disakkarit rutinozdan meydana gelmiştir [17,18]. Hesperidin, portakal ve limon gibi turuncgillerde fazla miktarlarda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda hesperidinin anlamlı derecede nöroprotektif, antiinflamatuvar ve analjezik, antibakteriyal, antifungal, antiviral, anti-hiperkolesterolemik ve antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [17-20]. Daha ileri *in vitro* çalışmalarda antikonvulsan aktiviteye de sahip olduğu gösterilmiştir [21].

Valproik asit; geniş spektrumlu antiepileptik etkiye sahip olup, antikonvülzan özelliği iki ayrı mekanizma üzerinden etki göstermektedir: 1-Nöronal membrandaki voltaj bağımlı sodyum kanallarını bloke eder. 2-Inhibitör etkili nörotransmitter GABA'nın beyindeki düzeyini arttırarak GABA bağımlı postsinaptik inhibisyonu kuvvetlendirir [22]. Valproik asit Süksinik semialdehid dehidrogenaz ve GABA transaminaz ile yarışmalı inhibisyona girerek, ayrıca glutamat dehidrogenaz gibi GABA sentezleyen enzimleri stimüle ederek GABA düzeylerini arttırır [23].

Bu nedenle çalışmamızda pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturduğumuz epilepsi modelinde literatürde farklı hastalık modellerinde tedaviye yönelik kullanılan bir biyoflavonoid olan hesperidinin [17,18,20, 24] ve bugün için epilepsi tedavisinde kullanılan ilaç etken maddesi olarak bilinen valproik asidin kombine uygulamasının, beyin ve karaciğer dokularında oksidan-antioksidan savunma üzerine olan etkilerinin araştırılması çalışmamızın amaçları arasında yer almaktadır. Aynı zamanda, valproik asit tedavisinin literatürde belirtilen karaciğer dokusu [25-27] üzerindeki yan etkilerinin de hesperidin uygulaması ile aza indirgenmesi bu çalışmanın bir başka amacını oluşturmaktadır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kimyasallar

PTZ ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) firmasından elde edildi. Valproik asit (Depakin liyofilize toz içeren flakon, Sanofi, Türkiye) ticari olarak satın alındı.

2.2. Deneysel Hayvanları ve Etik Onam

Çalışmamızda Üsküdar Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi (ÜSKÜDAB)'nden temin edilen 48 adet 3 aylık 200-250 g ağırlığında erkek Wistar-Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar *ad libitum* olarak beslendi, 12 saat aydınlık-karanlık periyoda uygun standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık 22+/-2°C, nem %60+/-5) muhafaza edildi. Çalışmamız ÜSKÜDAB bünyesinde yer alan Üsküdar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ÜÜ-HADYEK) tarafından incelenerek etik kurul onayı alınmıştır.

2.3. Deney Grupları ve Deneysel Süreç

Deney hayvanları her grupta 8 adet olmak üzere 6 gruba ayrıldı:

- Grup 1: Kontrol
- Grup 2: PTZ
- Grup 3: Hesperidin (HES)
- Grup 4: PTZ + HES
- Grup 5: PTZ + Valproik asit (VPA)
- Grup 6: PTZ + VPA + HES

Kontrol ve 3. grup dışındaki tüm gruplara 1-7-14-28. günlerde 60 mg/kg PTZ intraperitoneal (i.p.), 5. ve 6. gruba 28 gün boyunca 400 mg/kg/gün VPA i.p. olarak verildi. 3. 4. ve 6.gruba hesperidin deney başlangıcından 1 hafta öncesinde ve 28 gün süre ile 100 mg/kg/gün oral olarak verildi. Kontrol grubuna ise 28 gün boyunca oral yol ile distile su verildi. Deney sonunda elde edilen karaciğer ve beyin doku örnekleri -80°C'de analiz yapılmaya kadar muhafaza edildi.

2.4. PTZ ile Uyarılan Nöbet Tipleri

Grand-mal (büyük nöbet) şuurun aniden ve tamamen kaybı ile tonik-klonik hareketler ile belirgindir.

- Tonik dönemde kas tonusu yükselir.
- Klonik dönemde kaslarda sertleşme olur.
- Myoklonik nöbette yüz veya ekstremitelerde bir veya birkaç kez gerilmeler olur. Uzun-ritmik gerilmeler görülmez.
- Tonik nöbetler sertleşme, klonik nöbetler ise ritmik gerilmeler ile karakterizedir.

Bu nöbet tipleri şematik olarak Şekil 1' de gösterilmiştir [28].



Şekil 1. A, ön ve arka ekstremiteleri, kulakları ve bıyıkları etkileyen jeneralize kasılmalar. B, boyun, gövde ve ön ekstremitelerde tonik fleksiyon, arka ekstremitelerde kasılma. C, B dekinden farklı olarak arka ekstremitelerde parsiyel tonik ekstensiyon. D, C dekinden farklı olarak arka ekstremitelerde tam ekstensiyon olur.

2.5. Nöbetlerin Oluşturulması ve Nöbetlerin Değerlendirilmesi

Kimyasal uyarı ile epileptik nöbet oluşturmak için en çok kullanılan kimyasal madde PTZ'dir. PTZ 30-160 mg/kg arası dozlarında kemirgenlerde miyoklonik jerklerle (çekilmeler) başlayan ve verilen dozun miktarı ile deneğin duyarlılığına bağlı olarak tonik-klonik tipte nöbetlere veya nöbet esnasında ölüme kadar varan şiddette yanıtlar oluşturur [28-32].

Kontrol ve test edilen ilaç gruplarında, epileptik “uyaranın verilmesini izleyerek nöbetlerin ortaya çıkmasına kadar geçen zamanın saptanması (onn-set time)”, “epileptik nöbetlerin var veya yok şeklinde değerlendirilerek yüzde sıklıklarının saptanması” ve “oluşan nöbetlerin davranışsal düzeyde skorlanarak şiddetinin saptanması” epileptik çalışmalarda kullanılan başlıca değerlendirme yöntemlerindedir. Nöbetlerin şiddetinin değerlendirilmesinde çeşitli skorlama tabloları kullanılmaktadır [33,34]. PTZ enjeksiyonu sonrasında nöbet başlangıcı için üç karakteristik davranış değişiklikleri olan; ilk miyoklonik silkinmelerin, jeneralize klonik nöbetlerin ve tonik jeneralize ekstensiyonların geliş süreleri saptandı ve nöbet şiddeti değerlendirmesi yapıldı [34]. Buna göre;

Evre 0: Cevap yok

Evre 1: Kulaklar ve yüzde seyirmeler ile vücuda yayılan konvülsif dalga

Evre 2: Myoklonik jerkler ve arka ayaklar üzerinde şaha kalkma

Evre 3: Kısa süreli klonik nöbetler

Evre 4: Hayvanın yan yatmasıyla geçirilen uzun süreli klonik nöbetler

Evre 5: Hayvanın nöbetten çıkmasıyla birlikte tekrar nöbete girmesi

Evre 6: Her açılmayla birlikte ard arda tekrarlayan şiddetli tonik-klonik nöbetler

Evre 7: Nöbetlerden çıkamayarak gerçekleşen ölüm

Evre 8: Kendi kendine geçirilen şiddetli tonik-klonik nöbetler ve beraberinde gelen ölüm

2.6. Deney Grupları

Kontrol ve 3. grup dışındaki tüm gruplara 1-7-14-28. günlerde 60 mg/kg PTZ intra-peritoneal (i.p.), 5. ve 6. gruba 28 gün boyunca 400 mg/kg/gün VPA i.p. olarak verildi. 3. 4. ve 6.gruba HES deney başlangıcından 1 hafta öncesinde ve 28 gün süre ile 100 mg/kg/gün oral olarak verildi. Çalışmamızda

kullanılan 100 mg/kg hesperidin dozu Kaynaklar kısmında yer alan [18] no'lu makale referans alınarak belirlenmiştir. Bu makalede oral yol ile verilen 50-100 mg/kg hesperidin serebral iskemi, Huntington's hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi bazı nörolojik bozukluklarda nöroprotektif etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Benzer şekilde bir başka çalışmada L-metiyonin ile hiperhomosisteinemi oluşturulan Wistar sıçanlarda hesperidin 25, 50, 100 mg/kg dozları uygulanmış ve 100 mg/kg dozun beyin dokusunda asetilkolinesteraz, lipid peroksidasyonu, endotelial disfonksiyon, serum homosistein ve serum kolesterol düzeylerini azalttığı, beyin dokusunda glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzim seviyelerini artırdığı bildirilmiştir. Biz de çalışmamızda yüksek doz sayılabilecek 100 mg/kg hesperidin dozunun epilepsi modelinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak istedik. Kontrol grubuna ise 28 gün boyunca oral yol ile distile su verildi. Deney sonunda elde edilen karaciğer ve beyin doku örnekleri -80°C'de analiz yapılıncaya kadar muhafaza edildi.

2.7. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Deney süresi sonunda tüm sıçanlar ketamin HCl (80 mg/kg i.p.) ve ksilezin (10 mg/kg i.p.) anestezisi altında sakrifiye edildi. Beyin ve karaciğer dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı, serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) ile temizlendi ve -80°C'de muhafaza edildi. Karaciğer ve beyin hipokampus bölgesi buzlu ortamda 0.15 M KCl (% 10 w/v)'de homojenize edildikten sonra, homojenatlar 10 dk 4°C'de 600xg'de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar 10 000 x g'de 20 dk santrifüj edilerek bu fraksiyonlarda GSH, MDA düzeyleri ile SOD aktivitesi ölçüldü.

2.8. Glutatyon (GSH) Düzeylerinin Tayini

Doku homojenatlarında GSH düzeyleri 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanılarak 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü [35].

2.9. Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Tayini

MDA düzeyleri; Tiyobarbiturik asit (TBA) kullanılarak düzeyleri ölçülerek 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi [36].

2.10. Süperoksit dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

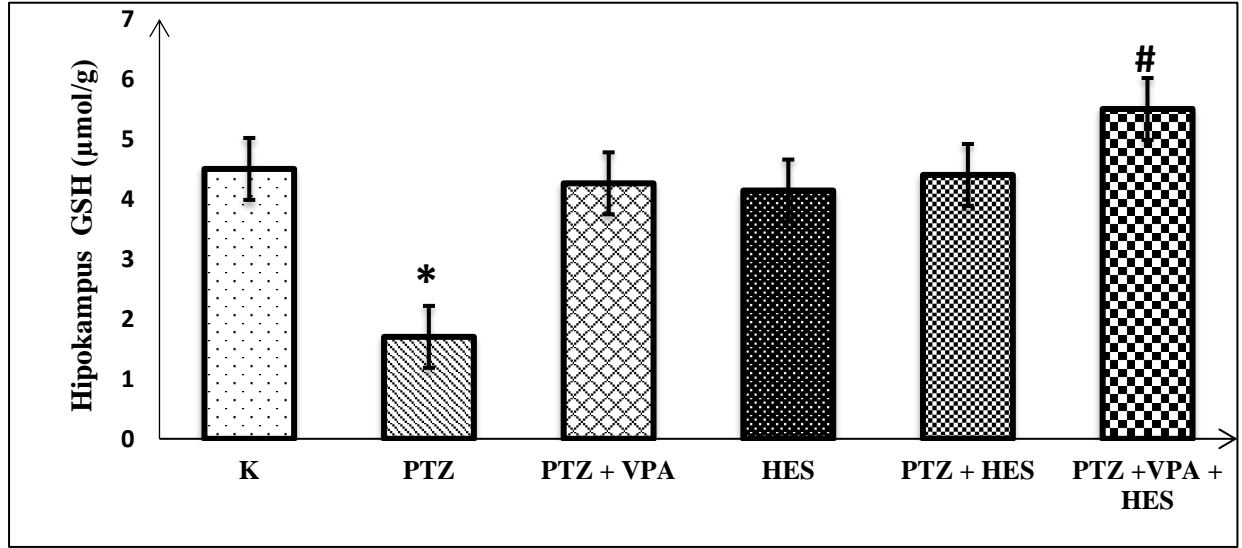
Süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene kataliz eden SOD en önemli antioksidan aktiviteye sahip enzimlerdendir. SOD aktivitesini belirlemek için bir takım direkt ve indirekt yöntemler geliştirilmiştir. Bu metotlar arasında kolay ve geleneksel olmasından dolayı en sık nitromavisi tetrazolium (NBT) kullanılan indirekt metottur [37]. Çalışmamızda SOD aktivitesi ticari kit kullanılarak belirtilen yöntemle ölçüldü.

2.11. İstatistiksel Analiz

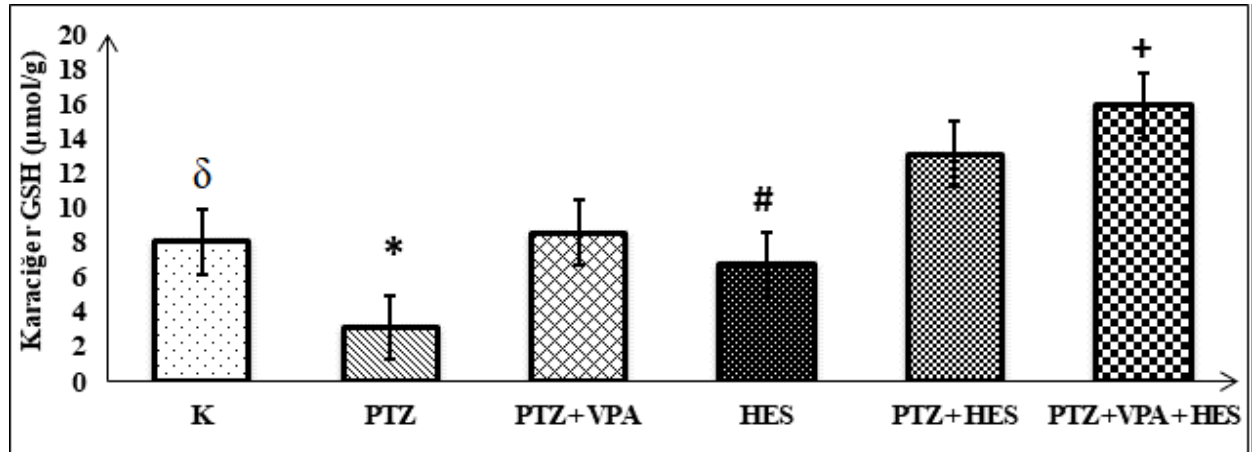
İstatistiksel analizlerde SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences Inc, IL, USA) versiyonu kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Kruskal Wallis-H testi uygulanarak belirlendi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3. SONUÇLAR

Çalışmamızda Şekil 2a'da görüldüğü gibi; *PTZ verilen grupta Kontrol grubuna kıyasla hipokampus GSH ($p=0.010$) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte #PTZ +VPA+ HES grubunda PTZ grubuna kıyasla hipokampus GSH düzeylerinde istatistiksel bir artış saptanmıştır ($p< 0.001$).

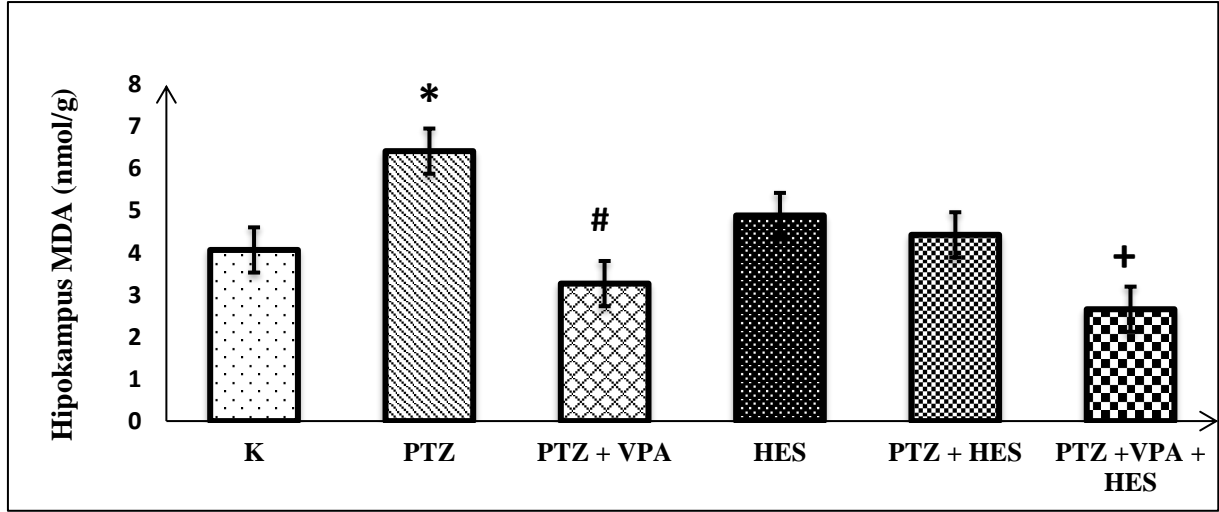


Şekil 2a. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 28 gün boyunca 60 mg/kg PTZ, 400 mg/kg VPA ve 100 mg/kg HES verilen gruplarda hipokampus glutatyon (GSH) düzeyleri



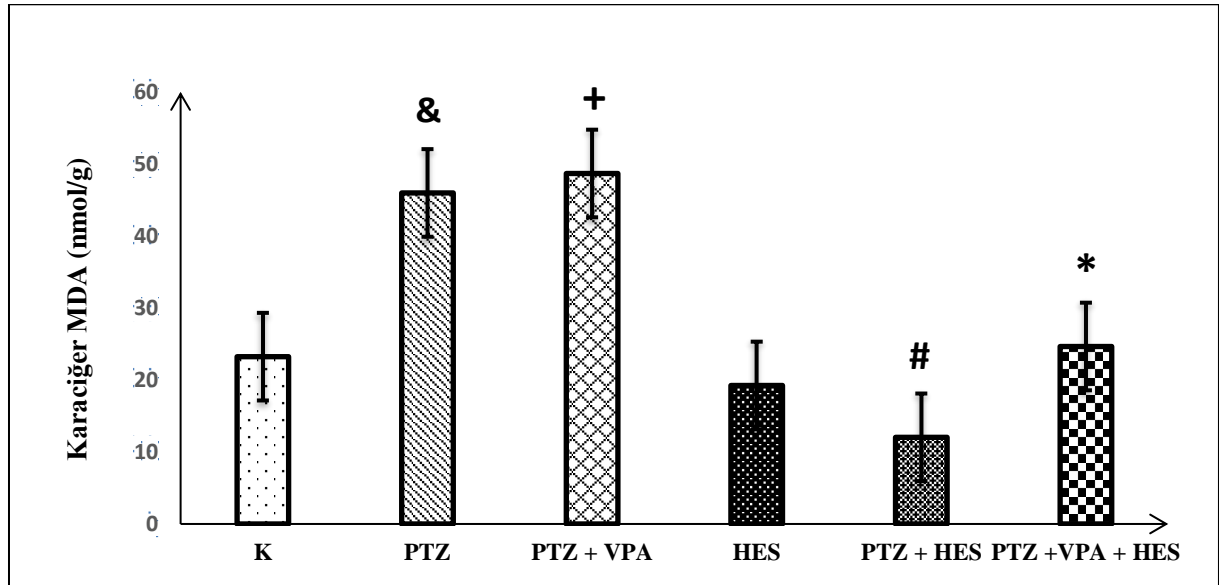
Şekil 2b. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 28 gün boyunca 60 mg/kg PTZ, 400 mg/kg VPA ve 100 mg/kg HES verilen gruplarda karaciğer glutatyon (GSH) düzeyleri

*PTZ grubuna kıyasla PTZ + VPA ($p=0.040$), PTZ+ HES ($p< 0.001$) ve PTZ +HES+ VPA ($p< 0.001$) gruplarında karaciğer GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. #HES grubuna kıyasla PTZ+ HES ve PTZ + VPA +HES grupları sırasıyla $p=0.011$ ve $p<0.001$ istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı zamanda +Kontrol grubuna kıyasla PTZ + VPA + HES grubunda Karaciğer GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0.033$). ^δKontrol grubuna kıyasla PTZ grubunda Karaciğer GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p=0.013$).



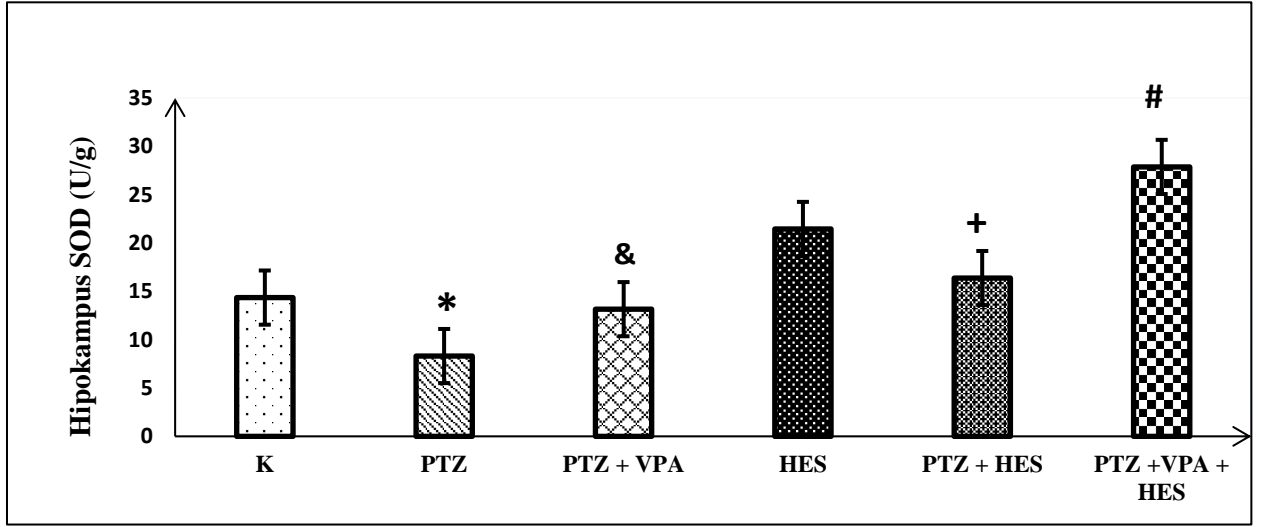
Şekil 3a. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 28 gün boyunca 60 mg/kg PTZ, 400 mg/kg VPA ve 100 mg/kg HES verilen gruplarda hipokampus malondialdehit (MDA) düzeyleri

*PTZ verilen grupta Kontrol grubuna kıyasla hipokampus MDA ($p=0.026$) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. #PTZ + VPA grubuna kıyasla HES grubu ($p=0.031$) ve PTZ grubu ($p<0.001$) hipokampus MDA düzeylerinde istatistiksel bir artış gözlenirken, benzer şekilde + PTZ + VPA + HES grubuna kıyasla PTZ, PTZ + HES ve HES grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir artış (sırasıyla $p<0.001$; $p=0.027$; $p=0.010$) saptanmıştır.



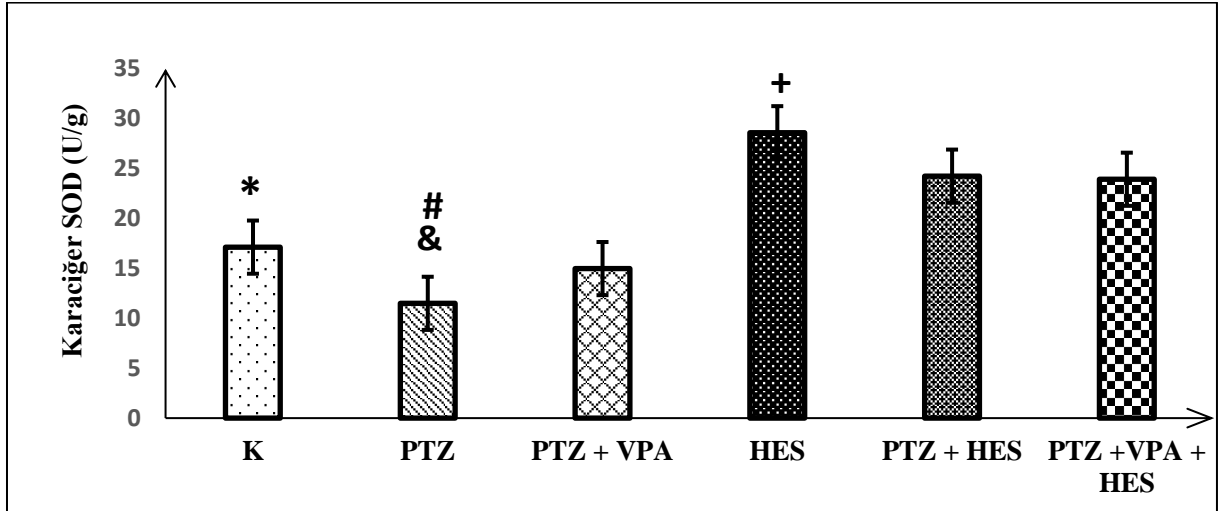
Şekil 3b. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 28 gün boyunca 60 mg/kg PTZ, 400 mg/kg VPA ve 100 mg/kg HES verilen gruplarda karaciğer malondialdehit (MDA) düzeyleri

*PTZ + VPA + HES grubuna kıyasla PTZ + HES grubunda karaciğer MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p=0.027$). +PTZ + VPA grubuna kıyasla HES grubu ve PTZ + HES gruplarında anlamlı bir azalma (sırasıyla $p<0.001$; $p<0.001$), #PTZ + HES grubuna kıyasla PTZ grubunda karaciğer MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.001$). &PTZ grubuna kıyasla HES grubunda ise anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p=0.004$).



Şekil 4a. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 28 gün boyunca 60 mg/kg PTZ, 400 mg/kg VPA ve 100 mg/kg HES verilen gruplarda hipokampus süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesix

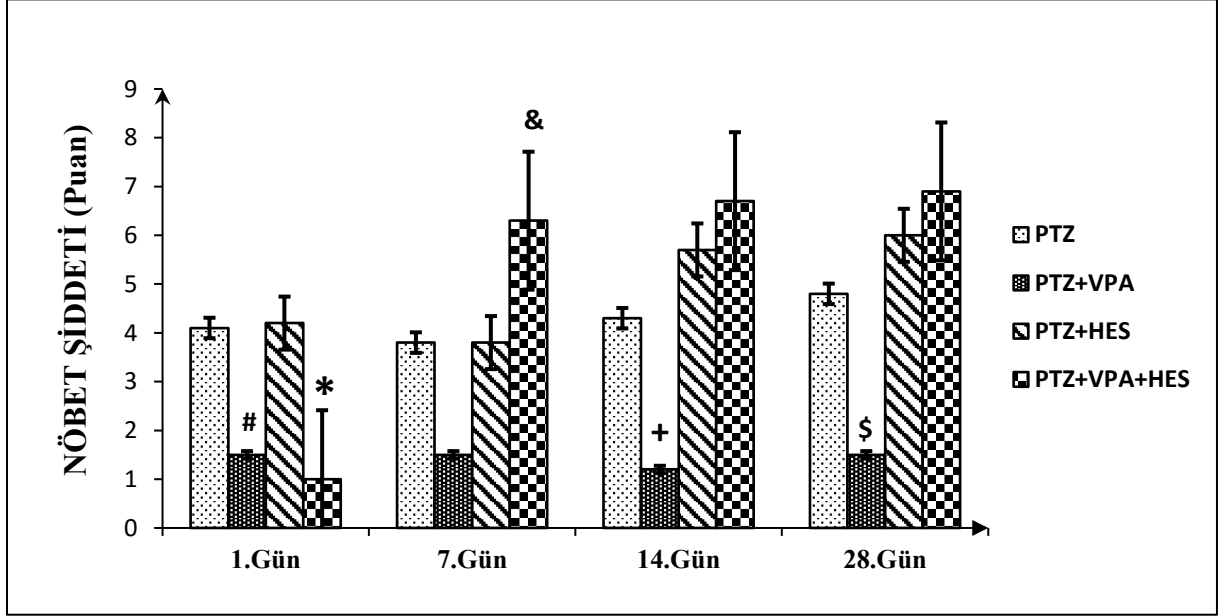
*PTZ grubuna kıyasla HES ve PTZ+VPA+HES gruplarında SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.001$; $p<0.001$). +PTZ + HES grubuna kıyasla PTZ grubunda istatistiksel olarak bir azalma ($p=0.027$), &PTZ + VPA grubuna kıyasla HES ve PTZ+VPA+HES gruplarında anlamlı bir artış (sırasıyla $p=0.042$; $p=0.001$) saptanmıştır. #PTZ + VPA + HES grubuna kıyasla Kontrol grubunda SOD aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.008$).



Şekil 4b. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 28 gün boyunca 60 mg/kg PTZ, 400 mg/kg VPA ve 100 mg/kg HES verilen gruplarda karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

*Kontrol grubuna kıyasla HES grubunda SOD aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0.009$). +HES grubuna kıyasla PTZ+VPA grubunda SOD aktivitesi istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0.001$). #PTZ grubuna kıyasla PTZ+VPA+HES ve HES gruplarında SOD aktivitesinde anlamlı bir artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0.001$; $p<0.001$). &PTZ grubuna kıyasla PTZ+HES grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0.001$).

Çalışmamızda PTZ enjeksiyonu ile oluşturulan epilepsi modelinde nöbet şiddeti ve nöbet eşiği değerlerine ilişkin elde ettiğimiz veriler Şekil 5a ve 5b’de verilmiştir.



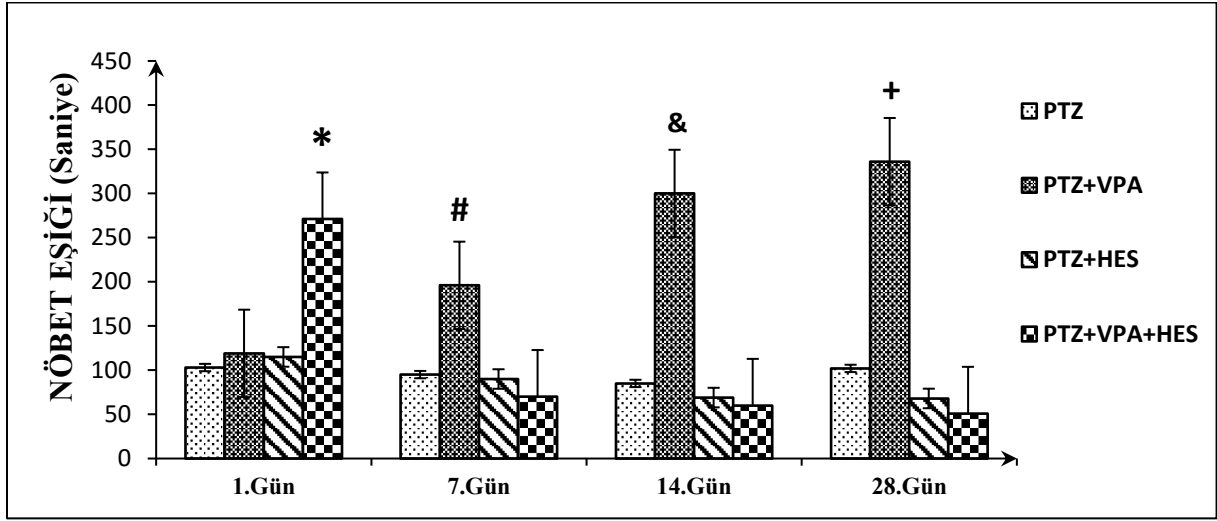
Şekil 5a. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 1,7,14 ve 28. günlerde epilepsi modelinde deney gruplarına ilişkin puan cinsinden nöbet şiddeti değerleri

Çalışma gruplarının 1.gündeki nöbet şiddeti verileri incelendiğinde; *PTZ+VPA+HES grubu PTZ+HES ve PTZ gruplarına göre nöbet şiddetini istatistikçe anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür (sırasıyla $p=0.001$; $p=0.001$). Ayrıca #PTZ+VPA grubu da 1.günde nöbet şiddetini PTZ grubuna göre istatistikçe anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür ($p=0.042$).

Çalışma gruplarının 7.gündeki nöbet şiddeti verileri incelendiğinde, &PTZ+VPA+HES grubu 1.gündeki etkisinin aksine 7.günde PTZ+VPA grubuna göre nöbet şiddetini istatistikçe anlamlı ölçüde arttırmıştır ($p<0.001$).

Çalışma gruplarının 14.gündeki nöbet şiddeti verileri incelendiğinde, +PTZ+VPA grubu PTZ, PTZ+HES ve PTZ+VPA+HES gruplarına göre nöbet şiddetini istatistikçe anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür (sırasıyla $p=0.043$; $p=0.001$; $p<0.001$).

Çalışma gruplarının 28.gündeki nöbet şiddeti verileri incelendiğinde, \$PTZ+VPA grubu PTZ+HES ve PTZ+VPA+HES gruplarına göre nöbet şiddetini istatistikçe anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür (sırasıyla $p=0.001$; $p<0.001$).



Şekil 5b. K: Kontrol, PTZ: Pentilentetrazol, VPA: Valproik asit, HES: Hesperidin. 1,7,14 ve 28. günlerde epilepsi modelinde deney gruplarına ilişkin saniye cinsinden nöbet eşiği değerleri

Çalışma gruplarının 1.gündeki nöbet eşiği süreleri incelendiğinde *PTZ+VPA+HES grubunun PTZ+HES ve PTZ gruplarına göre nöbet eşiği süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselttiği görülmüştür (sırasıyla $p=0.004$; $p=0.021$).

Çalışma gruplarının 7.gündeki nöbet eşiği süreleri incelendiğinde, #PTZ+VPA grubu PTZ+VPA+HES grubuna göre nöbet eşiği süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselttiği görülmüştür ($p=0.002$). Çalışma gruplarının 14.gündeki nöbet eşiği süreleri incelendiğinde, &PTZ+VPA grubu PTZ+VPA+HES grubuna göre nöbet eşiği süresini 7.gündeki etkisinden daha fazla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselttiği görülmüştür ($p=0.002$).

Çalışma gruplarının 28.gündeki nöbet eşiği süreleri incelendiğinde, +PTZ+VPA grubu PTZ+VPA+HES, PTZ+HES ve PTZ gruplarına göre nöbet eşiği süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselttiği görülmüştür (sırasıyla $p=0.001$; $p=0.047$; $p=0.044$).

4. TARTIŞMA

Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nde oksidatif stresin rolü amigdala kindling modeli, PTZ kindling modeli ve akut PTZ-uyarılmış nöbetler gibi bir takım deneysel epilepsi modellerinde gösterilmiştir. PTZ uygulanmasını takiben, serbest radikaller çok hızlı bir şekilde üretilmektedir, bunlar arasında özellikle hidroksil serbest radikali yer almaktadır, bu radikal en reaktif ve tehlikeli olanıdır. Hidroksil serbest radikallerinin oluşumu ile uyarılmış erken nöbetlerin varlığı epilepsinin patofizyolojisinde oksijen kaynaklı serbest radikallerin varlığını gözler önüne sermektedir. Bu aşamada antioksidanlar oksidatif yangı ile birlikte nöbet oluşumunu da önlemektedirler [38-40].

Pek çok çalışmada belirtildiği üzere subkronik PTZ uygulamasının sıçan beyninde MDA düzeylerinde artışa yol açtığı gözlenmiştir. Aynı zamanda kasılmaların süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak hipokampus ve karaciğer örneklerinde GSH düzeylerinde azalmaya, MDA düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir [18, 41,42]. Yapılan çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda hipokampus ve karaciğer örneklerinde kontrol grubuna kıyasla PTZ verilen grupta GSH düzeylerinin azaldığı, MDA düzeylerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. (Şekil 2a, 2b, 3a ve 3b).

VPA ve onun tuzları, sodyum ve magnezyum valproat, geniş spektrumlu aktivite gösteren etkili antiepileptiktir [41,43-46]. Fakat hayvan modellerindeki etkilerinin çelişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin Gasior ve ark. bir çalışmada kindled farelerde PTZ'nin lethal etkilerini ve kasılmaları azaltmada başarısız olduğu gösterilmiştir [26]. Benzer şekilde İlhan ve ark. yaptığı bir çalışmada *Nigella sativa* yağının PTZ ile uyarılmış kindling fare modelinde VPA tedavisinden daha etkili olduğu gösterilmiştir [42]. Kumar ve ark.'nın yaptığı çalışmaya benzer şekilde çalışmamızda VPA ve HES kombine uygulamasının PTZ ile oluşturulan epilepsi modelinde hipokampus ve karaciğer GSH düzeylerini anlamlı düzeyde artırdığı, MDA düzeylerini ise azalttığı saptandı [18] (Şekil 2a, 2b, 3a ve 3b).

Bununla birlikte çalışmamızda PTZ+VPA+HES grubunda sadece karaciğer dokusunda GSH miktarının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda GSH seviyelerindeki bu artışın flavonoidlerin bir antioksidandan ziyade bir pro-oksidan olarak etki edebildiği de gösterilmiştir [47-49]. Bazı antioksidanlar (örneğin; polifenoller ve askorbat) pro-oksidan etkiler sergileyebilirler çünkü mide ve ince bağırsak içeriğinde mevcut olan oksidan reaksiyonları katalizleyebilen demir ve bakır gibi geçiş metallere içerirler. Ayrıca, bu hafif pro-oksidan etkilerin, gastrointestinal kanal hattındaki hücrelerde indirgenmiş glutatyon gibi antioksidan savunmaların düzeylerini artırarak belki de daha yararlı olabileceği belirtilmektedir [47,48].

Yapılan çalışmalarda Akdeniz tipi beslenme tarzı diyet ile uyarılmış gut mikrobiyotasının beyin kimyası ve bilişsel fonksiyonlar üzerinde olumlu etkiler sergilediği de gösterilmiştir [49]. Bu literatür bilgileri doğrultusunda çalışmamızda fenolik bir bileşik olan hesperidinin hem pro-oksidan etki hem de valproik asit ile kombine etki sergileyerek PTZ grubunda GSH seviyelerini artırdığı görüşündeyiz (Şekil 2a, 2b).

Bununla birlikte günümüzde kullanılan antiepileptik ilaçların merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve endokrin sistem üzerine olan yan etkilerine yönelik pek çok çalışma da bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda dozdan bağımsız olarak özellikle VPA'nın karaciğer enzim düzeylerinde artış, dozla ilişkili olarak da tremor, uyuşukluk, ataksi, saç dökülmesi ve saç renginin değişmesi gibi bir takım yan etkileri olduğu gösterilmiştir. Antiepileptik ilaçların uzun süre etkin dozlarda veya birlikte kullanımları önemli yan etkileri de beraberinde getirmektedir [50, 51].

Poorrostami ve ark.'nın zencefil ekstraktı üzerine yaptıkları çalışmaya benzer şekilde çalışmamızda karaciğer örneklerinde PTZ+HES grubuna kıyasla PTZ+VPA+HES kombine uygulamasının MDA düzeylerini düşürmede daha etkili olduğu görülmektedir [52] (Şekil 3a, 3b). Aynı zamanda hipokampus ve karaciğer örneklerinde PTZ verilen grupta SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (Şekil 4a, 4b). Kumar ve ark.'nın HES'in nöroprotektif etkilerine ilişkin çalışmasına benzer şekilde hipokampus örneklerinde HES'in gerek tek başına gerekse VPA ile birlikte verildiğinde PTZ ve PTZ+ VPA gruplarına kıyasla SOD aktivitesini anlamlı derecede artırdığı gözlemlendi (Şekil 4a). Karaciğer örneklerinde kontrol grubuna kıyasla HES'in SOD aktivitesini anlamlı derecede artırdığı, benzer şekilde hipokampus ve karaciğer örneklerinde PTZ grubuna kıyasla HES grubunda da SOD aktivitesinin anlamlı derecede arttığı görülmektedir (Şekil 4a, 4b).

Çalışmamızda akut olarak uygulanan VPA'nın tek başına PTZ ile oluşturulan nöbetlerin nöbet eşiği sürelerini düşürerek sedatif etkisinin aksine nöbetlere girişte hızlandırıcı bir etki yaptığı görülmüştür. Ancak akut olarak uygulanan VPA ve HES kombinasyonu PTZ ile oluşturulan nöbetlerin, nöbet eşiği süresini anlamlı ölçüde yükseltmiş ve nöbet şiddetini ise anlamlı ölçüde azaltmıştır. VPA ve HES kombinasyonunun akut uygulamada nöbet eşiği süresi ve nöbet şiddeti üzerindeki bu olumlu etkisi oldukça önemlidir. VPA ve HES kombinasyonunun akut kullanımının aksine kronik kullanımda PTZ ile oluşturulan nöbetlerin nöbet eşiği sürelerini anlamlı ölçüde düşürmüş ve nöbet şiddetlerini anlamlı ölçüde arttırmıştır. Nöbet eşiğinde ve nöbet şiddetinde akut kullanımın aksine görülen bu etki HES'in uzun süreli verilmesi uyarıcı etkisinin VPA'nın sedatif etkisini baskılıyor olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir (Şekil 5a, 5b).

5. SONUÇ

HES'in antioksidan savunma sistemi üzerindeki olumlu etkisinin mekanizması henüz tam olarak tespit edilememiştir. Fakat çalışmamızın sonuçları HES'in antiepileptik tedavi ile birlikte kullanıldığında antioksidan aktiviteyi artırabileceğini ve VPA'nın kısmi olası yan etkilerini en aza indirebileceğini göstermektedir. Ancak bu aşamada flavanoidlerin MSS ile ilişkili hastalıkların ilaç tedavisine ek olarak kullanılabilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Üsküdar Üniversitesi Nöropsikofarmakoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne katkılarından ötürü teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- [1] Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. N Engl J Med 2003; 349: 1257-1266.
- [2] Ciger A. Erişkinlerde Epilepsi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Ders Notları. Ankara, Türkiye, 2002.
- [3] Seino M. Classification criteria of epileptic seizures and syndromes. Epilepsy Res 2006; 70: 27-33.
- [4] Lipson SE, Montes JA, Devinsky O. Epilepsy in the alienist and neurologist 1880-1920. Epilepsia 2002; 43: 912-919.
- [5] Bambal G, Cakıl D, Ekici F. Models of experimental epilepsy. J Clin Exp Invest 2011; 2: 118-123.
- [6] Karaagac N, Yeni SN, Senocak M, Bozluolcay M, Savrun FK, Ozdemir H. Prevalence of epilepsy in Silivri, a rural area of Turkey. Epilepsia 1999; 40: 637-642.
- [7] Calisir N, Bora I, Irgil E, Boz M. Prevalence of epilepsy in Bursa city center, an urban area of Turkey. Epilepsia 2006; 47: 1691-1619.
- [8] Zupec-Kania BA, Spellman E. An overview of the ketogenic diet for pediatric epilepsy. Nutr Clin Pract 2009; 23: 589-596.
- [9] Avoli M, Louvel J, Pumain R, et al. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. Prog Neurobiol 2005; 77: 166-200.
- [10] Wendling F, Bartolemei F, Bellanger JJ, et al. Epileptic fast activity can be explained by a model of impaired GABAergic dendritic inhibition. Eur J Neurosci 2002; 15: 1499-1508.
- [11] Wilson WA, Stasheff S, Swartzwelder S, et al. The role of NMDA receptors in in vitro epileptogenesis. Epilepsy Res Suppl 1992; 8: 157-165.
- [12] Kumar BH, Kumar BD, Diwan PV. Hesperidin, a citrus flavonoid, protects against L-methionine-induced hyperhomocysteinemia by abrogation of oxidative stress endothelial dysfunction and neurotoxicity in Wistar rats. Pharmaceutical Biology 2016; 55: 146-155.

- [13] Tüfekçi A, Koyuncuoğlu HR, Kırbaş S, Yılmaz HR, Kırbaş A. The effects of pregabalin on cerebral cortical oxidative stress of rats on pentylenetetrazole induced epileptic seizure. *Epilepsi* 2013;19: 7-14.
- [14] Poorrostami A, Farokhi F, Heidari R. Effect of hydroalcoholic extract of *ginger* on the liver of epileptic female rats treated with lamotrigine. *Avicenna J Med* 2014; 4: 276-286.
- [15] Halliwell BSC. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 71S-72S.
- [16] Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
- [17] Cho J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Arch Pharmacol Res* 2006; 29: 699-706.
- [18] Kumar A, Lalitha S, Mishra J. Hesperidin potentiates the neuroprotective effects of diazepam and gabapentin against pentylenetetrazole-induced convulsions in mice: Possible behavioral, biochemical and mitochondrial alterations. *Indian J Pharmacol* 2014; 46: 309-315.
- [19] Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chem Acta* 2001; 303: 19-24.
- [20] Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 877-885.
- [21] Dimpfel W. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus *in-vitro*. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 375-379.
- [22] Cui SS, Yang CP, Bowen RC, Bai O, Li XM, Jiang W, Zhang X. Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats. *Brain Res* 2014; 975: 229-236.
- [23] Jeavons PM. Non-dose-related side effects of valproate. *Epilepsia* 1984; 25: S50-55.
- [24] Serdaroglu Kasikci E, Aksoy A, Cevreli B, Gozler T, Kulaksiz H, Midi A. The effect of hesperidin on oxidative stress in an experimental obstructive jaundice. *Fresenius Env Bull* 2017; 26: 6760-6764.
- [25] Shaaban AA, El-Agamy DS. Cytoprotective effects of diallyl trisulfide against valproate-induced hepatotoxicity: new anticonvulsant strategy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2017; 390: 919-928.
- [26] Gasior M, Ungard JT, Beekman M, Carter RB, Witkin JM. Acute and chronic effects of the synthetic neuroactive steroid, ganaxolone, against the convulsive and lethal effects of pentylenetetrazol in seizure-kindled mice: comparison with diazepam and valproate. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1184-1196.
- [27] Abdel-Dayem MA, Elmarakby AA, Abdel-Aziz AA, Pye C, Said SA, El-Mowafy A. Valproate-induced liver injury: Modulation by the omega-3 fatty acid DHA proposes a novel anticonvulsant regimen. *Drugs R D* 2014; 14: 85-94.

- [28] Marangoz C. Deneysel epilepsi modelleri. On dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1997; 14: 147-186.
- [29] Osonoe K, Mori N, Suzuli K, Osonoe M. Antiepileptic effects of inhibitors of nitric oxide synthase examined in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. Brain Res 1994; 663: 338-340.
- [30] Snyder-Keller A, Sam C, Kellr RW. Enhanced susceptibility to cocaine- and pentylenetetrazol-induced seizures in prenatally cocaine-treated rats. Neurotoxicol Teratol 2000; 22: 231-236.
- [31] Zhao D, Leung LS, Boon F, Cain DP. Persistent physiological effects caused by a single pentylenetetrazol induced seizure in neonatal rats, Brain Research. Dev Brain Res 1994; 15: 190-198.
- [32] Citraro R, Navarra M, Leo A, Donato Di Paola E, Santangelo E, Lippiello P, Aiello R, Russo E, De Sarro G. The anticonvulsant activity of a flavonoid-rich extract from orange juice involves both NMDA and GABA-Benzodiazepine receptor complexes. Molecules 2016; 21: piiE 1261.
- [33] Uzbay IT. Epilepsi araştırmalarında kullanılan hayvan modelleri, Türk Nöroloji Dergisi 2003; 8: 45-54.
- [34] Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia 2005; 46: 470-472.
- [35] Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 1963; 61: 882-888.
- [36] Coban J, Dođan-Ekici I, Aydın AF, Betül-Kalaz, E, Dođru-Abbasođlu S, Uysal M. Blueberry treatment decreased D- galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. Metab Brain Dis 2015; 30: 793-802.
- [37] Paoletti F, Mocali A. Changes in CuZn-superoxide dismutase during induced differentiation of murine erythroleukemia cells. Cancer Res 1988; 48: 6674-6677.
- [38] Akula KK, Dhir A, Kulkarni SK. Effect of various antiepileptic drugs in a pentylenetetrazol-induced seizure model in mice. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2009; 31: 423-432.
- [39] Celikyurt IK, Mutlu O, Ulak G, Akar FY, Erden F. Gabapentin, A GABA analogue, enhances cognitive performance in mice. Neurosci Lett 2011; 492: 124-128.
- [40] İlhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylenetetrazol-induced kindling in mice. Neuropharmacology 2005;49: 456-464.
- [41] Akbas SH, Yegin A, Ozben T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. Clin Biochem 2005; 38: 1009-1014.
- [42] Erakovic V, Zupan G, Varljen J, Simonic A. Pentylenetetrazol-induced seizures and kindling: Changes in free fatty acids, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity. Neurochem Int 2003; 42: 173-178.

- [43] Chapman A, Keane PE, Meldrum BS, Simiand J, Vernieres JC. Mechanism of anticonvulsant action of valproate. *Prog Neurobiol* 1982; 19: 315-359.
- [44] El-Azad FM, Moustafa MY. Influence of calcium channel blockers on anticonvulsant and antinociceptive activities of valproic acid in pentylenetetrazole-kindled mice. *Pharmacol Rep* 2012; 64: 305-314.
- [45] Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005; 81:268S-276S.
- [46] Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *B J Clin Pharmacol* 2012;75:3:637-644.
- [47] Mattson MP, Cheng A. Neurohormetic phytochemicals: low dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci* 2006; 29: 632-639.
- [48] Halliwell B, Zhao K, Whiteman ML. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2000; 33: 819-830.
- [49] Caracciola B, Xu W, Collins S, Fratiglioni L. Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mech Ageing Dev* 2014; 136-137; 59-69.
- [50] Cetinkaya Y, Sezikli H, Ekmekci D, Gul ZB, Tutkavul K, Tireli H. Epilepsi hastalarında karbamazepin veya valproik asit kullanımının kemik metabolizmasına etkisi. *Epilepsi* 2014; 20: 29-34.
- [51] Balfour AJ. Valproic acid a review of its pharmacology and therapeutic; potential in indications other than epilepsy. *CNS Drugs* 1994; 2: 144-173.
- [52] Poorrostami A, Farokhi F, Heidari R. Effect of hydroalcoholic extract of *ginger* on the liver of epileptic female rats treated with lamotrigine. *Avicenna J Med* 2014; 4: 276-286.