

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ**  
**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTİEPİLEPTİK İLAÇ LAKOSAMİDİN**  
**DİPALMİTOİLFOSFATİDİL KOLİN LİPİDLERİ İLE**  
**ETKİLEŞMESİNDE KOLESTEROLÜN ETKİSİNİN**  
**BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**BURÇİN YAĞIŞ**

**KOCAELİ 2019**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ**  
**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTI-EPILEPTİK İLAÇ LAKOSAMİDİN**  
**DİPALMİTOİLFOSFATİDİL KOLİN LİPİDLERİ İLE**  
**ETKİLEŞMESİNDE KOLESTEROL ETKİSİNİN**  
**BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**BURÇİN YAĞIŞ**

**Dr.Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA**  
**Danışman, KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**Doç. Dr. Özlem AKSOY**  
**Jüri Üyesi, KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**Dr. Öğr. Üyesi Birsen ELİBOL**  
**Jüri Üyesi, BEZMİALEM ÜNİVERSİTESİ**

  
.....  
  
.....  
  
.....

**Tezin Savunulduğu Tarih: 27.12.2019**

## **ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR**

Epilepsi nöbetlerini baskılamada kullanılan Lakosamid ilacının hücre zarlarındaki etki mekanizmasının detaylandırıldığı bu tezde bilgi ve desteğiyle beni bu çalışmaya yönlendiren, çalışmalarım boyunca ilgi ve desteği ile bana birçok şey öğreten sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Sevgi TÜRKER-KAYA'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında manevi desteklerini eksiltmeyen dostlarım Bahar ÖZBÖLÜK, Volkan BİLGİN ve Serhan AKTAN'a sonsuz teşekkürler...

Tüm hayatım boyunca ellerinden gelen her fedakarlığı gösteren ve üzerimde büyük emekleri olan annem Yüksel YAĞIŞ'a ve ablam Burcu YAĞIŞ'a minnettarlığımı belirtir, tüm kabimle teşekkür ederim.

Aralık-2019

Burçin YAĞIŞ

## İÇİNDEKİLER

|  |     |
|--|-----|
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....  | i   |
| İÇİNDEKİLER .....  | ii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | iii |
| TABLolar DİZİNİ .....  | iv  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                             | v   |
| ÖZET.....  | vi  |
| ABSTRACT.....  | vii |
| GİRİŞ .....  | 1   |
| 1. GENEL BİLGİLER .....  | 3   |
| 1.1. Epilepsi nedir?.....  | 3   |
| 1.1.1. Epilepsi tedavisine yönelik yaklaşımlar .....             | 3   |
| 1.1.2. Antiepileptik İlaç (AEİ) nedir? .....                     | 5   |
| 1.1.3. Lakosamid.....  | 6   |
| 1.1.4. Kolesterol (KOL) .....                                    | 7   |
| 1.2. İlaç-Lipid Etkileşmeleri .....                              | 10  |
| 1.2.1. Çok tabakalı model membran sistemleri .....               | 11  |
| 1.2.2. Dipalmitoilfosfatidilkolin yapısı.....                    | 12  |
| 1.2.3. Lipozomların termotropik evreleri .....                   | 14  |
| 1.3. Biyofiziksel Yöntemler .....                                | 16  |
| 1.3.1. Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC).....              | 16  |
| 1.3.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi .....   | 17  |
| 2. MATERYAL VE METOT .....                                       | 19  |
| 2.1. Kimyasal Maddeler .....                                     | 19  |
| 2.2. Çok Tabakalı Model Membran Sistemlerinin Hazırlanması ..... | 19  |
| 2.3. Diferansiyel Tarama Kalorimetresi Çalışmaları .....         | 20  |
| 2.3.1. DSC ölçümleri için örneklerin hazırlanması .....          | 20  |
| 2.3.2. DSC ölçümlerinden termogramların eldesi .....             | 20  |
| 2.4. FTIR Çalışmaları.....                                       | 21  |
| 2.4.1. FTIR ölçümleri için örneklerin hazırlanması .....         | 21  |
| 2.4.2. FTIR ölçümlerinde spektrumların eldesi .....              | 21  |
| 3. BULGULAR.....   | 23  |
| 3.1 DSC Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular .....               | 23  |
| 3.2 FTIR Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular .....              | 25  |
| 3.2.1. CH <sub>2</sub> asimetric gerilme .....                   | 26  |
| 3.2.2. CH <sub>3</sub> simetric gerilme .....                    | 27  |
| 3.2.3. C=O simetric gerilme .....                                | 28  |
| 3.2.4. PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> simetric gerilme.....        | 29  |
| 4. TARTIŞMA .....  | 31  |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                    | 38  |
| KAYNAKLAR .....  | 39  |
| KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER .....                                   | 53  |
| ÖZGEÇMİŞ .....   | 54  |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Şekil 1.1. | Lakosamidin 3 boyutu ve 2 boyutlu gösterimi .....   | 5  |
| Şekil 1.2. | KOL yapısının 2 boyutlu ve 3 boyutlu görüntüsü. ....  | 7  |
| Şekil 1.3. | DPPC'den oluşan lipozom ve DPPC ve KOL'den oluşan lipozom.....  | 11 |
| Şekil 1.4. | DPPC'nin 2 boyutlu kimyasal yapısı.....   | 12 |
| Şekil 1.5. | Çift tabakalı fosfolipidlerin $T_m$ değerindeki değişimin şematik gösterimi.....  | 14 |
| Şekil 1.6. | Lipozomların faz çeşitleri .....  | 14 |
| Şekil 1.7. | Diferansiyel Taramalı Spektroskopisinin (DSC) şematik gösterimi.....  | 15 |
| Şekil 1.8. | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisinin şematik gösterimi.....   | 16 |
| Şekil 2.1. | %20 mol LCM içeren DPPC örneğinden elde edilen DSC termogramı .....   | 19 |
| Şekil 2.2. | LCM içermeyen DPPC FT-IR spektrumu .....  | 21 |
| Şekil 3.1. | Saf DPPC ve %1, %10, %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının DSC termogramları .....   | 22 |
| Şekil 3.2. | Saf DPPC ve %1, %10 mol KOL ve %1 KOL ile %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının DSC termogramları .....  | 23 |
| Şekil 3.3. | Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının $CH_2$ asimetrik gerilme bandındaki $28^\circ C$ ve $58^\circ C$ 'deki frekans değişimleri.....        | 25 |
| Şekil 3.4. | Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının $CH_2$ asimetrik gerilme bandındaki $28^\circ C$ ve $58^\circ C$ 'deki bant genişliği değişimleri..... | 26 |
| Şekil 3.5. | Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının $CH_3$ simetrik gerilme bandındaki $28^\circ C$ ve $58^\circ C$ 'deki frekans değişimleri.....         | 27 |
| Şekil 3.6. | Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının $C=O$ simetrik gerilme bandındaki $28^\circ C$ ve $58^\circ C$ 'deki frekans değişimleri.....          | 28 |
| Şekil 3.7. | Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının $PO_2^-$ simetrik gerilme bandındaki $28^\circ C$ ve $58^\circ C$ 'deki frekans değişimleri.....       | 29 |

## TABLULAR DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Tablo 3.1. Saf DPPC ve %1 mol, %10 mol, %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının $T_m$ ve $\Delta H$ değerleri.....   | 25 |
| Tablo 3.2. Saf DPPC'den oluşan lipozomların ve %1 mol, %10 mol KOL içeren DPPC ve %1 mol,%10 mol KOL ile sadece %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının $T_m$ ve $\Delta H$ değerleri..... | 26 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|            |                           |
|------------|---------------------------|
| $\Delta H$ | :Entalpi                  |
| $CaF_2$    | :Kalsiyum florür          |
| Ld         | :Sıvı-krisal düzensiz faz |
| Lo         | :Sıvı-kristal düzenli faz |
| $L\alpha$  | :Sıvı-kristal faz         |
| $L\beta$   | :Jel faz                  |
| Tm         | :Ana faz geçiş sıcaklığı  |

### Kısaltmalar

|       |   |
|-------|---|
| DPPC  | : Dipalmitoilfosfatidilkolin  |
| DSC   | : Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel Tarama Kalorimetresi) |
| FDA   | : Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi)          |
| FT-IR | : Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümü Kızılötesi)              |
| GBP   | : Gabapentin  |
| GUV   | : Dev Unilamellar Vezikül   |
| KOL   | : Kolesterol  |
| LCM   | : Lakosamid   |
| LEV   | : Levetirasetam   |
| LTG   | : Lamotrigin  |
| MLV   | : Polidispers Çok Lamelli Vezikül                                       |
| MSS   | : Merkezi Sinir Sistemi   |
| PA    | : Fosfotidik asit   |
| PB    | : Penobarbital  |
| PC    | : Fosfotidilkolin   |
| PE    | : Fosfotidiletanolamin  |
| PS    | : Fosfotidilserin   |
| SM    | : Sfingomyelin  |
| SUV   | : Küçük Tek Tabakalı Vezikül  |
| VPA   | : Valproik asit   |
| WHO   | : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)                       |

# ANTİEPİLEPTİK İLAÇ LAKOSAMİDİN DİPALMİTOİLFOSFATİDİLKOLİN LİPİDLERİ İLE ETKİLEŞMESİNDE KOLESTEROLÜN ETKİSİNİN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

## ÖZET

Lakosamid (LCM) nöronal zar stabilizasyonunu sağlayarak epilepsi nöbetlerini baskılamada kullanılır. Merkezi sinir sistemindeki aktivasyonunu gerçekleştirebilmesi için zar lipidleriyle etkileşmesi onun etkinliğini direkt olarak etkiler. Fakat LCM'nin zar lipidleriyle etkileşmesinin incelendiği bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) lipozomları ile LCM etkileşmesine kolesterolün (KOL) etkisi incelendi. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki (%1,10,20 mol) LCM'nin KOL varlığında ve yokluğunda DPPC ana faz geçiş sıcaklığı ( $T_m$ ) ve entalpi ( $\Delta H$ ) değerleri üzerindeki etkileri Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) ile,  $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$   $\text{CH}_2$  asimetric,  $\sim 2870 \text{ cm}^{-1}$   $\text{CH}_3$  simetric,  $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$  C=O simetric ve  $\sim 1230 \text{ cm}^{-1}$ 'deki  $\text{PO}_2^-$  asimetric bantlarının frekans değerlerine etkileriye Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisiyle incelendi.

Verilere göre DPPC lipozomlarına sadece LCM ve % 1 mol KOL eklemesi  $T_m$  değerini yüksek; %10 mol KOL eklemesi, düşük sıcaklığa kaydırıldı. Ayrıca %1 ve %10 mol KOL eklemesi sırasıyla  $\Delta H$  değerini azalttı.  $T_m$  artma ve  $\Delta H$ 'deki azalma LCM'nin KOL ile lipidlerin açıl zincirleri arasında konumlandığı anlamına gelir. FT-IR bulgularına göre, jel ve sıvı kristal fazda LCM eklenmesiyle  $\text{CH}_2$  asimetric frekans ve bant genişliğindeki azalma sistemin rijit hale geldiğini göstermektedir. Ayrıca C=O ve  $\text{PO}_2^-$  modlarındaki LCM eklenmesiyle frekanstaki azalma (C=O jel faz hariç), LCM'nin gliserol iskeleti ve fosfat kafa grupları veya etrafındaki su molekülleriyle hidrojen bağlandığı bulgusunu verirken KOL'un neden olduğu bu frekanslardaki artma bağlanmaların tekrar azaldığını belirtmektedir.

Elde edilen sonuçlar LCM'nin gerçek membran sistemlerinde ne tarz etkileşime girdiğiyle ilgili bilgiler sunmakla birlikte daha etkin ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Dipalmitoilfosfatidilkolin, Kolesterol, Lakosamid.

# THE INVESTIGATION OF CHOLESTEROL EFFECT ON THE INTERACTION OF ANTIPILEPTIC AGENT LACOSAMIDE WITH DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE LIPIDS BY BIOPHYSICAL TECHNIQUES

## ABSTRACT

Lacosamide (LCM) suppressed epilepsy seizures over neuronal membrane stabilization. Its interaction with lipids directly affects its activity in central nervous system. However, there is no study on this subject. In this study, the interaction of LCM with dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) lipids in presence and absence of cholesterol (KOL) was investigated. For this purpose, the effects of LCM at different concentrations (1, 10, 20 mol%) on main transition temperature ( $T_m$ ) and enthalpy ( $\Delta H$ ) values were measured by Differential Scanning Calorimetry. The frequency values of  $\text{CH}_2$  asymmetric ( $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_3$  symmetric ( $\sim 2870 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{C} = \text{O}$  symmetric ( $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$ ) and  $\text{PO}_2^-$  asymmetric ( $\sim 1230 \text{ cm}^{-1}$ ) bands were examined by Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy.

$T_m$  of DPPC was lower with only LCM and 1 mol% KOL but higher with 10 mol% KOL. Both 1% and 10% moles of KOL decreased the  $\Delta H$  value. The changes in  $T_m$  and  $\Delta H$  means that both LCM and KOL are located acyl chains of lipids. FT-IR findings revealed that, LCM led to a decrement in  $\text{CH}_2$  asymmetric frequency and bandwidth in gel and liquid phase, which may suggest rigid system. Furthermore, the decrease in frequency of  $\text{C} = \text{O}$  (except  $\text{C} = \text{O}$  gel phase) and  $\text{PO}_2^-$  may indicate binding of LCM with the glycerol and phosphate groups. The reduction in these parameters with KOL may reveal its decreasing effect on hydrogen bonding.

The results provide information about how LCM interacts in real membrane systems, indeed may contribute to more effective drug development studies.

**Keywords:** Dipalmitoylphosphatidylcholine, Cholesterol, Lacosamide.

## GİRİŞ

Epilepsi, beyindeki anormal aşırı veya senkronize nöronal aktiviteden kaynaklanan belirti ve/veya semptomların geçici durumu olarak tanımlanan epileptik nöbetin, en az bir defa gerçekleştiği durumlardır. Nöbet oluşumuna neden olan bu nöronal aktivitedeki bozukluk ise merkezi sinir sistemindeki (MSS) hücrelerin fonksiyonu üzerindeki etkiyi ifade etmektedir. Eski zamanlardan beri bilinen epilepsinin günümüzde hala tam bir tedavisi bulunmamaktadır. Epilepsiye tedavi yaklaşımları ancak nöbetleri baskılayıcı nitelikte olmaktadır. Şuanda nöbetleri baskılamada kullanılan en yaygın ve en etkili yaklaşım ise antiepileptik ilaçlardır (AEİ). Üretilen AEİ'ler MSS'deki hücrelerin zarlarındaki lipid ya da proteinlerle direkt bağlantı kurmaktadır. Zaten hücrelerde etkinlik gösterebilmesi için MSS'ndeki hedef hücrelerin zarlarıyla etkileşime girmesi mecburidir. Dolayısıyla tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların hücre zarlarıyla iletişimini incelemek, ilaç etkinliğini arttırmak ve moleküler mekanizmasını açıklamak açısından büyük önem taşımaktadır. Fakat biyolojik zarlar üzerinde bu incelemeler oldukça zordur. Çünkü biyolojik zarların yapısal içeriği oldukça karmaşıktır. Bu nedenle ilaçların ve diğer bileşenlerin lipidlerin üzerindeki etkilerini anlamak için içeriği kontrol edilebilen model zarlarla çalışmalar yapılmaktadır. Model zarlar üzerinde bu çalışmaları gerçekleştirmek yaygın bir yaklaşımdır (Kırkoçoğlu ve Türker-Kaya, 2019, Shestivska ve diğ., 2018, Lioffi ve diğ., 2017, Losada-Pérez ve diğ., 2015, Altunayar ve diğ., 2015).

Düşük protein bağlanması ve vücuttaki dağılım seviyesi göz önüne alındığında LCM'nin zar lipidlerine bağlanması gerekir. Bu sebeple biz de çalışmamızda, LCM'nin DPPC lipidleri ile oluşturulmuş yapay zarlarla etkileşmesini araştırdık. İlave olarak çalışmamızda MSS'ndeki nöronal hücre zarlarında bolca bulunan ve hücrelerin zarlarının faz geçişlerini etkileyen kolesterol (KOL) molekülünün de LCM-DPPC etkileşmesi üzerine etkisini inceledik. Bunun için KOL varlığında ve yokluğunda LCM'nin farklı konsantrasyonlardaki (%1, 10, 20 mol) DPPC lipozomlarındaki termotropik özellikleri ( $T_m$  ve  $\Delta H$ ) üzerindeki etkilerini inceledik.

Ayrıca KOL varlığında ve yokluğunda LCM (%20mol) içeren DPPC'nin hidrofilik ve hidrofobik bölgeleri arasındaki moleküler bağlanmalarının detayları hakkında bilgiler elde ettik. Lipidlerin bu tarz biyofiziksel özelliklerini inceleme avantajları nedeniyle Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) ve Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi kullanıldı. DSC, termotropik parametreler hakkında bilgi verirken ( $T_m$  ve  $\Delta H$ ); FT-IR spektroskopisi lipidlerin açıl zincirlerinin metilen ve metil gruplarının ( $CH_2$  ve  $CH_3$ ) titreşimleri, karbonil gruplarının ( $C=O$ ) ve fosfat gruplarının ( $PO_2^-$ ) titreşimlerinin gözlenmesiyle lipid dinamikleri (akışkanlık), açıl zincir esnekliği (düzeni) ve onların hidrasyon durumu hakkında veri sunar.

Bu veriler doğrultusunda LCM'nin DPPC lipozomları içinde olabilecek konumu, bu zar lipidleriyle ne tarz etkileşime girdiği ve KOL'ün bu konum ve etkileşim üzerindeki etkisine dair bilgiler edinildi. Elde ettiğimiz bilgiler LCM'nin etki mekanizmasının açıklığa kavuşturulması, biyoyararlılığının artırılması ve sonradan geliştirilecek ilaçların daha etkin olabilmesi için önem arz etmektedir.

## **1. GENEL BİLGİLER**

### **1.1. Epilepsi nedir?**

Epilepsi, beyindeki anormal aşırı veya senkronize nöronal aktiviteden kaynaklanan belirti ve/veya semptomların geçici durumu olarak tanımlanan nöbetin, en az bir defa gerçekleşmesi durumu ile ortaya çıkan semptomlara bağlı bir hastalıktır (Fisher ve diğ., 2018, Fisher ve diğ., 2005). Epileptik beyinler patolojik ve tekrarlayan nöbetlerin olmasına devamlı eğilim gösterirler (Fisher ve diğ., 2014). Bu nedenle tedavi öncesi hastanın nöbet tipi, epilepsi tipi ve epilepsi sendromu belirlenir. Epilepsi tekil bir hastalık değil, beyinde birçok farklı nedenden kaynaklanabilecek fonksiyon düzensizliklerini yansıtan çeşitli bozukluklardır (Fisher ve diğ., 2005). Epilepsi yapısal, genetik, enfeksiyon, metabolik, immün ve bilinmeyen nedenlerden kaynaklanmaktadır. Epilepsiye entelektüel yetersizlik, otizm spektrum bozuklukları, depresyon, psikososyal kaygılar, serebral felç, hareket ve uyku bozuklukları, skolyoz gibi öğrenme, cinsel, psikoloji ve hiperaktivite gibi davranış ile ilgili bozukluklar da eşlik etmektedir (Svalheim ve diğ. 2015, Lin ve diğ., 2012, Parisi ve diğ., 2010). Epilepsili kişilerde erken ölüm riski yüksektir ve bunun altında yatan nedenlerin çoğunun bedensel komorbiditelerle ilgili olduğu düşünülmektedir (Yuen A. ve diğ., 2018). Buna bağlı olarak tedavi öncesi teşhis aşamasında epilepsili her hasta için komorbidite varlığı göz önünde bulundurulması önemlidir (Scheffer ve diğ., 2017). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre dünya çapında yaklaşık 70 milyon insan epilepsi ile yaşamakta ve küresel olarak her yıl tahmini 2.4 milyon insana epilepsi teşhisi konmaktadır. Buna karşın epilepsi teşhisi konmuş hastalar için günümüzde kesin çözüm veren tedavi yöntemi bulunmamaktadır (McCorry ve diğ., 2004).

#### **1.1.1. Epilepsi tedavisine yönelik yaklaşımlar**

Epilepsi tedavisinde en önemli basamak epilepsi tanısı koymaktır ve bu aşamada hastanın hikayesi (nöbet öncesi, sırası ve sonrası) büyük önem taşır. Epilepside en



sık kullanılan tanı araçları Elektroensefelografi, Beyin Tomografisi veya Magnetik Rezonans'dır.

Nöbet tedavisinde transkraniyal manyetik stimülasyon ve transkraniyal doğru akım stimülasyonu gibi beyin stimülasyonları epileptik uyarılabilirliği azaltmak için kullanılan yöntemlerdendir (Nitsche ve Paulus 2009). Meiron ve arkadaşlarının son dönemde yaptıkları çalışmada da beyin sinirlerinin uyarılmasıyla yapılan bu tedavi çeşidiyle hala büyük oranda nöbetlerin baskılandığı gösterilmektedir (Merion ve diğ. 2019). Bunun yanı sıra vagus siniri stimülasyonu da yine epileptik nöbetlerin baskılanması için kullanılan farklı bir beyin uyarım tekniğidir. Bu yöntemde kalp piline benzer otomatik çalışan bir pil ile beynin vagus siniri aracılığıyla beyne elektrik akımı gönderilir. (González ve diğ. 2019). Hastaların yaşam kalitesini arttıran bu yöntem yine kesin bir tedavi sunmamaktadır.

Nöbet baskılayıcı bir tedavi yöntemi de ketojenik diyet, modifiye edilmiş Atkins diyeti gibi lezzetlendirilmiş diyetlerdir. Yağ oranı çok yüksek karbonhidrat oranı düşük olan bu diyetler ilaçlarla tedaviye devam etmesine rağmen nöbet geçirmeye devam eden çocuklar için kullanılmaktadır. Bu diyet tipleri infantil spazmlar, şiddetli miyoklonik epilepsi, tüberoz skleroz kompleksi, refraktor epileptikuslu çocuklarda nöbet azaltıcı olumlu etki oluşturmalarına rağmen hastalarda kısa vadede gastrointestinal, uzun vadede kardiyovasküler komplikasyonlara neden olmaktadır (Martin ve diğ. 2016, Reimers ve Brodtkorb 2012).

Epilepsi tanısı konmuş hastalarda bu yöntemlere karşın öncelikli olarak ilaçla tedavinin gerek olup olmadığına bakılarak kişiye özgü ilaç tedavisi uygulanır. En uygun antiepileptik ilaç (AEİ) seçimi için nöbet(ler)in tipleri, epileptik sendromun ne olduğu, doğal seyri ve prognozu; AEİ(ler)'in özellikleri, potansiyel farmokokinetik etkileşimleri, olası advers olayların profili (Kwan ve Brodie 2001); hastanın bireysel özellikleri (Santulli ve diğ., 2016) gibi birçok parametre dikkate alınması belirtilmektedir. Yanlış ilaç tedavisi hastayı daha zor süreçlere sürükleyebileceği için ilaç seçimi ve etkinliği oldukça önemlidir.

Özellikle ilaca dirençli epilepsili hastalarda AEİ epilepsi prevalansını azaltamazlar veya bazılarında epilepsi gelişimini önleyemezler. Bu nedenle AEİ'lerin geliştirilmesi daha etkin hale gelmelidir. Hatta risk altındaki hastalarda ilk nöbet

öncesi epilepsiyi önleyen antiepileptojenik ajanlara ihtiyaç vardır (Schmidt ve Schachter 2014). Bu çalışmamızda ilaç etkinliklerini arttırmaya yönelik ilaç konfügirasyonlarında olası değişimlere katkı sağlayacak moleküler düzeyde araştırma yapılmıştır.

### **1.1.2. Antiepileptik İlaç (AEİ) nedir?**

Epileptik nöbetlerin baskılanması için kullanılan ilaçlara AEİ denir. Epilepsinin semptomatik tedavisi (tedavi etmeden hastalık belirti ve bulgularını azaltma ya da ortadan kaldırma) amacıyla kullanılan AEİ'ler motor uyarılabilirliğini etkilemeden nöbet esnasında bilinç eşiğini arttırmalıdır. Terapötik (etkili) dozlarda sedatif ve ya hipnotik (merkezi sinir sistemini yavaşlatıcı veya uyutucu) olmamalıdır (Mula ve Sander 2007, Ortinski ve Meador 2004), kronik (sabit) dozlarda bile bu etki gözlenmemelidir.

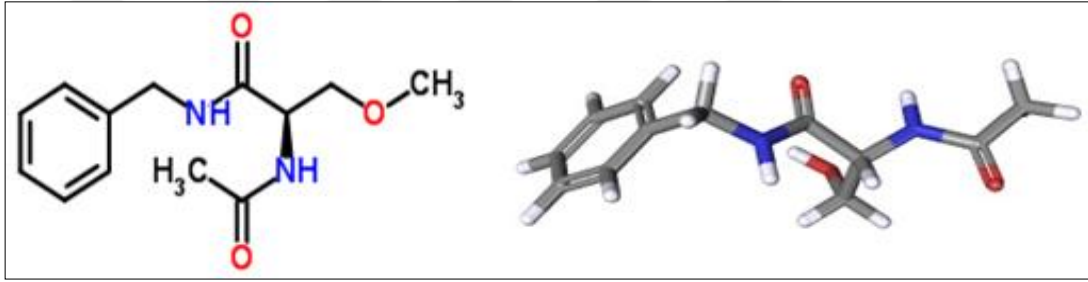
AEİ'lar epilepsi için ilk tercih edilen tedavi olup, epilepsili hastaların yaklaşık %60'ının nöbet kontrolünü etkili bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlar. Uyarıcı mekanizmaları bloke etme ya da inhibe edici olanların etkinliğini arttırmaya yönelik çok çeşitte AEİ üretilmiştir (Wang ve Chen 2019). AEİ uygulanması 20. yüzyılın son çeyreğine kadar monoterapi şeklinde tek ilaçla tedavi şeklinde yürütülürken etkinliklerinin yeterli olmaması sonucu daha sonraları iki ya da daha fazla ilaçla politerapi şeklinde uygulanmaya başlanmıştır (Santulli ve ark. 2016, Abou-Khalil B. 2008).

AEİ'ler üretimlerinin gerçekleştirildiği yıl aralıklarına göre birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon olarak üç gruba ayrılır. Birinci jenerasyon AEİ'ler 1857-1980, ikinci jenerasyon AEİ'ler 1980-2000, üçüncü jenerasyon AEİ'ler 2000-günümüz tarihleri arasında üretilen ilaçları temsil etmektedir (Singh ve Verma 2019, Löscher ve Schmidt 2011).

AEİ'ler MSS'deki nöronların uyarıcı sinapslarının, durdurucu sinapslarının, ekstrasinaptik zarının ya da talamus korteksindeki devreler üzerinde etkinliklerini göstermektedirler (Kobayashi ve diğ. 2019). Lamotrigin (LTG), Gabapentin (GBP), Fenobarbital (PB), Levetirasetam (LEV), Valproik asit (VPA), Lakosamid (LCM) gibi günümüzde yaklaşık 30 AEİ kullanılmaktadır.

### 1.1.3. Lakosamid

Lakosamid (LCM), acetamido-N-benzyl-3-methoxypropionamide formülüne sahip fonksiyonelleştirilmiş aminoasittir. Lipofilik olmasına izin vere amfilik özelliklere sahip d-serin analogudur (Cawello ve diğ., 2014).  $C_{12}H_{16}N_2O_3$  kimyasal formülüne, 236,271 g/mol moleküler ağırlığına sahip üçüncü jenerasyon AEİ'dir. Topolojik kutupsal yüzey alanı 67.4 Å<sup>2</sup>'dir. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından (FDA) 2007 yılında onaylanmıştır. Oral uygulamadan sonra bağırsaklarda tamamen absorbe edilir ve yarı ömrü 12-13 saattir (Chung ve diğ. 2010, Doty ve diğ., 2007). Plazma proteinlerine <%15 oranında bağlanır ve diğer AEİ'lere göre plazma konsantrasyonlarda büyük değişikliklere neden olmaz (Cawello W. 2015, Bialer ve diğ., 2007).



Şekil 1.1. Lakosamid'in 2 boyutlu ve 3 boyutlu gösterimi

Özellikle yaşlı bireylerde olmak üzere genellikle monoterapi şeklinde tercih edilir (Kalilani ve diğ., 2017). Üç dakika kadar sürebilen, şiddetli ağrı ve distoni eşlik eden lokalize kas spazmları şeklindeki paroksizmal tonik spazmların meydana geldiği hastalıklarda da kullanılabilirliği rapor edilmiştir (Baheerathan ve diğ. , 2017) . Bu araştırmalar LCM'in, MSS'ni etkileyerek ortaya çıkan, yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürebilen ve günlük yaşam aktivitelerini sınırlayabilen ve iyileşme sürecinde şiddetli nüksetmelere yol açabilen paroksizmal tonik spazmlar üzerine de iyileştirici etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Lacman ve arkadaşlarının (2016) yaptığı bir çalışmada LCM'nin 33 refrakter parsiyel epilepsili hastalarda yardımcı tedavi olarak nöbetleri baskılamada önemli ölçüde etkili olduğu gösterilmiştir (Lancman ve diğ., 2016). Ayrıca LCM, olumsuz bilişsel özelliklere neden olmadığı gibi bilişsel güçlendirici etki yaratıyor gibi görünmektedir (Verrotti ve diğ. , 2018, Moavero ve diğ. 2017, Helmstaedter ve Witt 2013).

LCM temelde voltaj-kapılı sodyum kanallarının inaktivasyonunu arttırarak nöronal membran stabilizasyonunu sağladığı için epilepsi nöbetlerini baskılamada kullanılır (Neal ve diğ. 2018, Chung ve diğ. , 2010, Łuszczki 2009). Antikonvülzan etkilere ek olarak iskemi ve hipoksinin neden olduğu nöron hasarına karşı nöroprotektif etkilerinin de olduğu gösterilmiştir (Beyreuther ve diğ. 2007, Stöhr ve diğ. 2006).

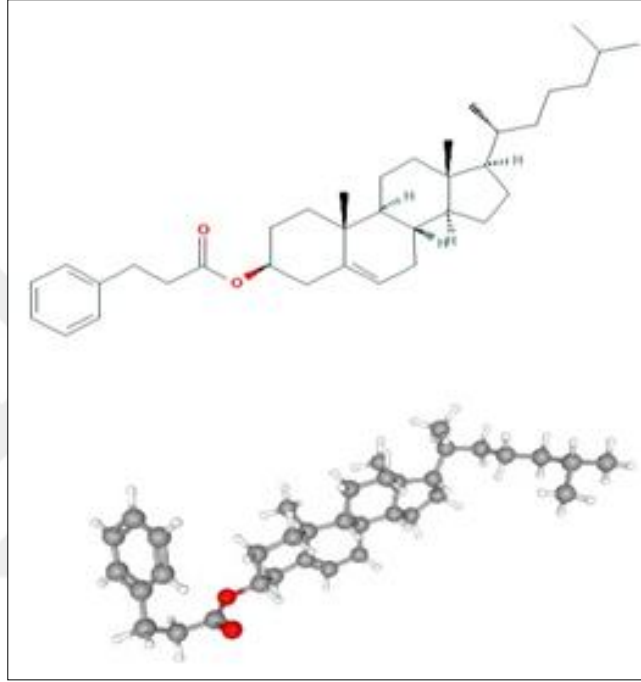
Ayrıca LCM ile ilgili en sık bildirilen advers olaylar; diplopi, baş dönmesi, bulantı ve baş ağrılarıdır (Rosenfeld ve diğ., 2014, Husain ve diğ., 2012, Halasz ve diğ., 2009, Perucca ve diğ., 2007). Buna karşın bazı çalışmalar yan etkilerinin LTG, GPB, LEV gibi diğer AEİ'lerden daha düşük seviyede olduğunu göstermektedir (Liguori ve diğ. 2018, Novy ve diğ. 2013)

Ampifilik özellikte olduğu için LCM yeterince suda çözünür (0.465mg/ml) ve kan-beyin bariyerini geçebilecek kadar lipofiliktir (May ve diğ. 2015, Stöhr ve diğ., 2007). Fakat kan-beyin bariyerinden geçişi düşük orandadır ve membrandaki P-glikoproteinler ile geçişi sağlanır. Elbette LCM voltaj kapılı sodyum kanallarını etkileyebilmek ve kan beyin bariyerini aşmak için nöronların membranlarıyla interaksiyon içinde bulunmalıdır. LCM'nin vücut boyunca yüksek dağılım şekli ve çok düşük protein bağlanma kapasitesi nedeniyle membrane lipidleri ile etkileşmesi beklense de LCM-lipid etkileşimi hakkında yayınlanmış bir veri yoktur. LCM'nin membran lipidlerine bağlanma yeteneği açısından değerlendirilmesi epilepsi tedavisinde etkin kullanımı için ek bilgi sağlayabilir (Yağış ve Türker-Kaya, 2018).

#### **1.1.4. Kolesterol (KOL)**

Kolesterol (KOL), halkasal bir steroid çeşididir. KOL hayvan hücre zarlarında %20-30 mol ve kırmızı kan hücrelerinde %50 mol kadardır (Lipowsky ve diğ., 1995). Çoğu memeli hücresinde KOL, endojen olarak sentezlenebilir ve lipoprotein taşıyıcılar aracılığıyla hücrelere verilebilir (Maxfield ve Meer 2010). Membran faz davranışlarının kontrolü (Halling ve diğ, 2008), membranda mekanik dayanıklılık sağlama (Miao ve diğ. 2002) gibi metabolizmadan hormon ve vitaminlere öncü olmaya kadar birçok işlevi vardır (Rog ve diğ., 2009). KOL'un mekanik açıdan en önemli görevi zarda mekanik gücü arttırma, su dahil küçük moleküller ve gazların geçirgenliğini azaltma (Chiu ve diğ.2001), membran akışkanlığı ve membran faz davranışını düzenleme yeteneğini azaltmaktır (Kel ve diğ. 2015, Haines 2001).

KOL'un halka sisteminde metil grupları bulunmaktadır. Rog ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışma metil gruplarının KOL'dan uzaklaştırılmasıyla oluşturulmuş KOL çeşitlerinin (lanosterol, dkolesterol gibi) membran düzenindeki görevini yeterli düzeyde yerine getiremediğini göstermiştir. Bu çalışma KOL'un yüzey düzgünlüğünün membran düzeni ve membran içinde kümeleşmeleri (yerleşmeleri) üzerinde önemli olduğunu göstermiştir (Rog ve diğ., 2009).



Şekil 1.2. KOL yapısının 2 ve 3 boyutlu görüntüsü

KOL halkasının hidroksil grubu ile fosfolipidlerin ara yüz grupları arasında hidrojen bağlanmaları gerçekleşir (Ramstedt ve Slotte 2002, McMullen ve McElhaney 1996). Böyle komşu hidrokarbon zincirlerine bağlanarak bu zincirlerin (yağ asit zincirleri) düzenini arttırarak açıl zincirlerin hareket etmesini engeller; Şekil 1.6.'da da görüldüğü gibi bu durum daha rijit bir faz değişimine tekabül eder. Yani KOL artışı ile sıvı kristal düzensiz fazdan (Lo) sıvı kristal düzenli faza (Ld) geçiş gerçekleşir (Şekil 1.6.) (Rosetti ve diğ. 2017, Kuo ve Chang 2014, London 2005, Halling ve Slotte 2004). Lo fazı, hem L $\beta$  hem L $\alpha$  fazlarının özelliklerine sahiptir (Marquardt ve diğ., 2016). Membran güçlendirici olarak nitelendirilen KOL, membranların alan yapısını korur (Bloom ve Mouritsen, 1988).

Fosfolipitler ve sfingolipitler ile etkileşimleri sayesinde, yağ açıl zincirlerinin termal hareketi tarafından oluşturulan serbest hacmi azaltarak iki tabakalı geçirgenliği

azaltır. Ekzotermik bir entalpi değişimi fosfolipidlerle KOL'un birleşmelerini yoğunlaştırır; yani zarların net hacminin ayrı bileşenlerinden daha az olmasına sebep olur (Lange ve Steck 2008). Bu nedenle KOL doymuş lipid kuyrukları ile etkileşime girdiğinde daha fazla trans bağ konformasyonları oluşturması ve van der Waals etkileşimleri arttırması nedeniyle entalpik olarak daha elverişlidir. Fakat entalpik kazanç, serbest enerji hesaplamaları ile belirlenen büyük ve elverişsiz bir entropik katkı ile dengelenir (Bennett ve diğ. 2018). Bۆylece çift katmanları yoğunlaştırır, akışkanlıklarını, sıkıştırılabilirliklerini ve uygunluklarını azaltır ve mekanik glerini arttırır.

Yüksek spontan mobilitesi ve biyolojik lipid karışımlarının faz davranışı üzerindeki dramatik etkileri, hücrelerdeki dinamik lipid organizasyonun modlatr olarak KOL' uygun bulur. Yani hcreysel lipid homeostasisini düzenlemek için merkezi lipid olarak kullanılır (Maxfield ve Meer 2010).

Arter dokusunda KOL birikmesinin arteriyal tıkanma ve arteroskleroz ile ilişkili lezyonlar veya plaklar oluşturur. E vitamini, KOL düzeyi yüksek olan hastalarda trombosit agregasyonunu anlamlı derecede azaltır; kardiyovasküler hastalıklarda serbest radikal birikimlerinin önlenmesinde ya da en aza idirilmesinde önemlidir. Severcan ve arkadaşları (1995) bu duruma açıklık getirmek adına KOL içeren lipozomlar üzerinde çalışma yapmışlardır. Çalışmada KOL içeren lipozomlara E vitamini ekleyerek E vitamininin KOL'lu membranlara etkisini araştırmışlardır (Severcan ve diğ., 1995).

KOL, plazma membran lipidlerinin peroksidasyonuna bağlı olarak vasküler düz kas hücrelerinde kristalli alanlar oluşumuna yani iltihaplanma ve plak instabilitesine neden olur (Self-Medlin ve diğ., 2009, Mason ve diğ., 2003). Lipid peroksidasyonu doymamış zar lipidlerini etkileyen dejeneratif bir işlemdir (Shestivska ve diğ., 2018, Gaschler ve Stockwell, 2017). Zarların moleküler organizasyonunu bozduğu için ve hayvansal zarlarda da KOL lipid peroksidasyonundan etkilendiği için KOL içeren model lipozomlarda bir çok çalışma yapılmıştır. Jacop ve Mason (2005) yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyonunun KOL organizasyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir (Jacop and Mason, 2005). Üstelik Jacop ve Mason'un yaptığı bu alışma E vitamininin KOL'lu lipidlerde peroksidasyon etkilerini azalttığını da

göstererek Severcan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı da destekler niteliktedir. Javonavić ve arkadaşları yine bu alanda %10 ve %50 mol konsantrasyonlarda KOL'un membranın akışkanlığı, stabilite, ısıl davranışı, lipozom büyüklüğü ve farklı geometri ve içerikteki lipozomlarda lipid peroksidasyon kinetiği üzerine etkilerini derinlemesine araştırmayı amaçlamışlardır (Javonavić ve diğ., 2018). Bu araştırmada ise lipid peroksidasyonunda %10 mol KOL düşüş sağlarken %50 mol KOL içeren lipozomlarda ters etki yarattığı görülmüştür.

Görüldüğü üzere memeli hücre zarlarındaki lipidler arasına kolayca yerleşen ya da aralarından çıkan biyofiziksel özelliklere sahip bu steroid çeşidi hücrede büyük organizasyon sağlayan görevler üstlenir (Maxfield ve Meer 2010). Zar çift katmanını mekanik olarak daha güçlü ve su ve polar çözünen maddelere karşı daha az geçirgen hale getirir (Lange and Steck 2008, Barenholz 2004). KOL'un zarlara kolay giriş çıkışı diğer zar bileşenlerindeki farklılıkların nasıl korunduğuna, membranlara nüfuz edecek diğer bileşenlerin yeterlilik düzeyinden ne kadar farklı giriş yaptığına dair soru işaretleri oluşturmaktadır. Zar mekanik dayanımını artırması ve membran geçirgenliğini azaltması ilaç gibi önemli kimyasalların zardan nüfusunu da azaltıcısını düşünmekteyiz. Bu nedenle bu çalışmada LCM etkinliğine, tüm memeli zarlarında bulunan kolesterolün azaltıcı ya da arttırıcı etkisi olup olmadığı da araştırıldı.

## **1.2. İlaç-Lipid Etkileşmeleri**

Hücre zarı temel olarak %50 lipid, %40 protein, %2-10 şeker çeşitlerinden oluşur; az miktarda su, inorganik tuzlar ve metal iyonlarını bir arada bulundurur (Albert 2005). Fosfolipidler, kolesterol ve glikolipidler, zar lipidlerinin ana fraksiyonunu oluşturur (Sonnino ve diğ., 2007). Zarın temel iskelesi gibi olan membran lipidleri zar proteinlerinin konformasyonunu sürdürme ve işlevlerini yerine getirmesi için de olanak sağlar. (Shi ve diğ. 2018). İlaçların ana hedefleri hücre içi oldukları için, farmakolojik aktivitelerini gerçekleştirmek için bu yapıya sahip plazma zarını ve nükleer zarfı geçmeleri gerekir. Ökaryotik hücrelerde ilaç molekülleri sitozol içine girdikten sonra endoplazmik retikulum, golgi, mitokondri gibi organellerin zarlarıyla dahi etkileşime girmektedir (Bourgauv ve Couvreur, 2014). Yani ilaçların hücre içinde etkinliklerini gösterebilmeleri yine ilaçların başta hücre zarı olmak üzere

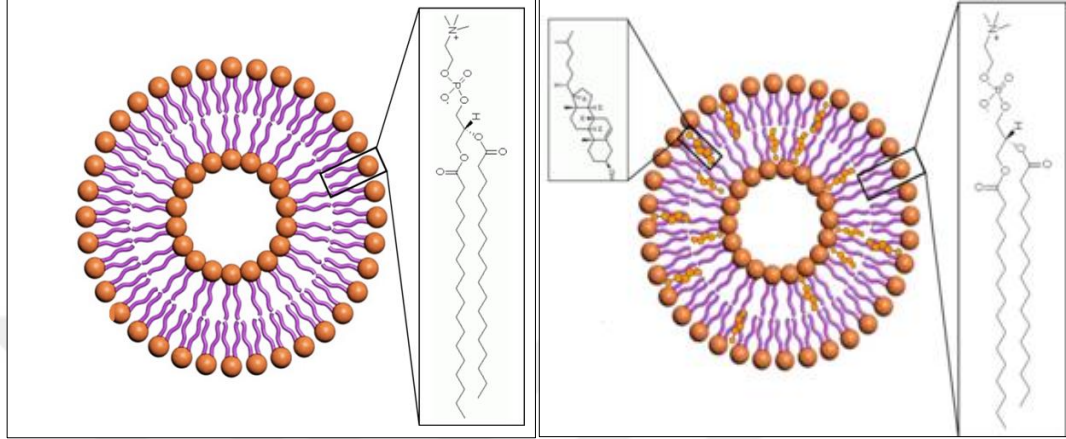
birçok zar lipidleriyle etkileşmesi sonucu gerçekleşir. Bu etkileşmesi sırasında hücre zarında yapısal ve dinamik olarak çok sayıda değişim meydana gelir. Bu değişimler hücre zarı lipid kalınlığı, faz geçiş eğrisi, faz geçiş sıcaklıkları, lipid dinamiği, lipid düzeni, açıl zincir esnekliği, lipid kafa grubu ve sulu kısma yakın gliserol iskelet üzerindeki hidrojen bağlanmasının şiddeti gibi parametrelerdir (Yağış ve Türker-Kaya 2018). Hücre zarının bu karmaşık işleyişi ve heterojen yapısı ilaçların çalışmalarda zorluklara sebep olmaktadır (Simons ve İkonen, 1997). Halbuki bir ilacın etkin kullanımını sağlamak için, moleküler seviyedeki membranlardaki etkileşim bölgesini bilmek çok önemlidir (Türker-Kaya ve diğ. 2011). Bu nedenle ilaç-lipid interaksiyonlarının araştırıldığı çalışmalarda ilaçların farmokinetik ve farmakolojik özelliklerini değerlendirebilmek için hücre zarı yapısına benzeyen model membran sistemleri kullanılmaktadır (Kırkoçoğlu ve Türker-Kaya 2019, Toyran ve Severcan 2007, Severcan ve diğ., 2001 ).

### **1.2.1. Çok tabakalı model membran sistemleri**

Model membran sistemleri, lipozomlar, ilk olarak 1965 yılında Bangham tarafından hücre zarlarının doğasını incelemesiyle tanımlanmıştır (Bangham 1993, Bangham ve diğ. 1965). Lipozom kelimesi köken olarak Yunanca'da yağ anlamına gelen lipos ve vücut anlamına gelen soma kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. İçte sulu bölmeyi çevreleyen lipid çift katmanlarının oluşturduğu küresel veziküllerdir (Anwekar ve diğ. 2011). Lipozomlar katman sayıları ve büyüklüklerine göre sınıflandırılırlar. Tek veya çok katmanlı olabilirler ve büyüklükleri hazırlanması için kullanılan işleme bağlı olarak ~20nm ile 10 mikron arasında değişebilir. Polidispers çok lamelli veziküller (MLV), genellikle hidratlanmış film lipidlerinin vortekslenmesiyle hazırlanır. Tanımlanmış ebatlarda küçük veya büyük tek tabakalı veziküller (küçük tek tabakalı veziküller=SUV veya büyük tek tabakalı veziküller=LUV'ler), seyreltilmiş lipid süspansiyonlarının sonikasyonu veya ekstrüzyonu ile elde edilebilir. Dev unilamellar veziküller (GUV'lar), elektroformasyon ile hazırlanır (Bourgaux ve Couvreur, 2014, Rongen ve diğ. 1997). Bu lipozom çeşitlerinde kullanılan lipidler nötr ya da -,+ yüklü olabilirler. Ayrıca fosfotidilkolin (PC), fosfotidik asit (PA), fosfotidiletanolamin (PE), fosfotidilserin (PS), spingomyelin (SM), KOL içeren kompozisyonlarda lipozomlar çalışmalarda kullanılabilir. Memeli hücrelerinin plazma zarında PC ve KOL bol bulunduğu için bu



tür çalışmalarda biyolojik zarları taklit etmek için PC, DPPC en yaygın kullanılan lipid çeşididir. KOL ise membran akışkanlığını azaltarak mekanik rijitliğe stabiliteyi arttırmak için çoğunlukla lipozomlara dahil edilir (Gharib ve diğ., Raffie and Teissie 1999, Bloom ve diğ. 1991).



Şekil 1.3. DPPC'den oluşan lipozom ve DPPC ve KOL'den oluşan lipozom

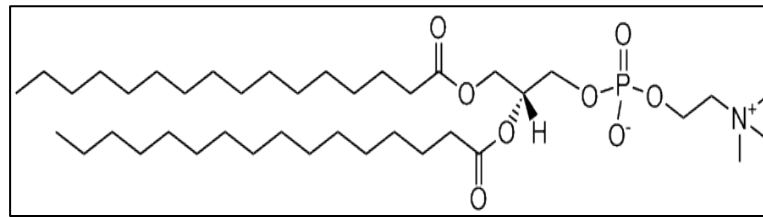
Biyolojik zar sistemleri lipid, protein, karbonhidratlardan oluşan karmaşık bir içeriğe sahiptir. Üstelik lipid tabakalarında dahi lipid kalınlığı ve konfügurasyon farklılığı bulunmaktadır (Stevens 2005). Bu nedenle ilaç-lipid etkileşimlerini incelemede büyük dezavantaj oluşturmaktadır. Model zar sistemleri, bileşenler ve bileşenlerin konsantrasyonları ayarlanabildiği için çok önemlidir ( Arslan ve diğ. 2019). Seçilen bu biyomimetik sistemi ve buna bağlı çalışma tekniğinin birleşimi, bize zarın içinde meydana gelen süreçleri güvenilir bir şekilde rapor edecek ölçümleri sağlamaktadır. Dolayısıyla özel ve güvenilir bilgi sağlayan model membran sistemlerinin kullanılması ilaç-lipid etkileşimlerini inceleyen çalışmalar için kullanılması genel bir yaklaşımdır (Handan ve Türker-Kaya, 2018, Lioffi ve diğ. 2017, Losada-Pérez ve diğ. 2015, Altunayar ve diğ. 2015).

### 1.2.2. Dipalmitoilfosfatidilkolin yapısı

Biyomembranlarda üç ana tip lipid vardır: fosfolipid, sterol (Müller ve diğ. 2008), glikolipid. Canlılarda trigliseritler depolanan lipid çeşitleriye yapıya katılanlar bu üç tip lipid çeşididir. Bazı lipidler ise elektron taşıyıcıları, ışık absorbe eden pigmentler, emülsifiye edici ajanlar, hormonlar, intrasellüler haberciler olarak (Pluhackova ve diğ 2015, Cascales ve diğ. 2006) önemli görevlere sahiptir.

Membranların yapısında en fazla bulunan lipid çeşidi olan fosfolipid moleküllerinin polar baş kısmı hidrofilik, yağ asit zincirleri hidrofobiktir. Böyle amfifilik özellik gösteren bu lipid çeşitleri sulu çözeltilerde kendiliğinden kümelenerek lipozom şeklinin oluşmasına neden olur (Stillwell 2016, Jämbeck ve Lyubartsev 2012). Biyolojik sistemlerde de hücre içinin de hücre dışınında sulu olması ve suda çözünmeme özelliğine sahip olmaları fosfolipidlerin yağ asit zincirleri birbirine bakacak şekilde çift tabaka haline gelmelerini ve öyle kalmalarını destekler. Kloroform, eter, benzen, aseton gibi organik çözücülerde çözülebilirler.

Hüresel membran çift katmanları, fosfolipidlerinin dağılımında karakteristik bir çapraz asimetriye sahiptir. Özellikle, plazma zarının dışa bakan katmanı fosfatidilkolin ve sfingolipidler açısından zenginken, sitoplazmaya bakan katmanı fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve diğer çoğunlukla anyonik fosfolipidler bakımından zengindir (Quinn 2002). Bu çalışmada tüm bu özelliklere sahip fosfolipid çeşidi olan PC kullanılmıştır. PC insan eritrosit plazma membranında %20, akciğer plazma membranında %18, golgi membranında %25 oranında bulunmaktadır. Genellikle 14-24 karbondan oluşan PC'lerin karbonları arasında doymuş ve/veya cis konfigürasyonunda bir ya da daha fazla çift bağ bulunur (Hyvönen ve Kovanen 2005). Bu çalışmadaki PC çeşidi ise iki adet on altı karbonlu sature yağ asit zincirlerinden oluşan ve nötr özellikteki DPPC'dir. Kolin baş grubundaki ( $N^+$ ) pozitif yük, fosfatın negatif yükünü ( $PO^-$ ), nötr bir kafa grubu oluşturacak şekilde nötrleştirir.



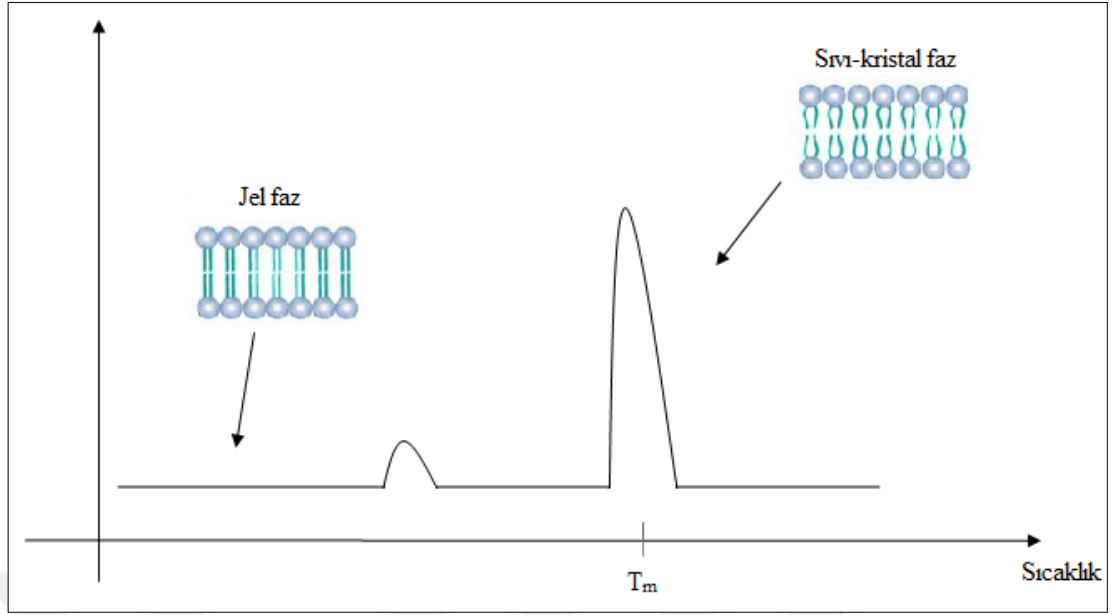
Şekil 1.4. DPPC'nin 2 boyutlu kimyasal yapısı

DPPC'nin,  $T_m$  sıcaklığı yaklaşık  $40^\circ C$ 'dir (Pluhackova ve diğ. 2016, Sonne ve diğ., 2007); bu ve daha üst sıcaklıklarda yağ asit zincirleri kırılmalara uğrayarak gauche konformasyonu denilen daha düzensiz bir forma geçer (Hyvönen ve Kovanen 2005). Bu formda lipidlerin arasındaki bağlar zayıfladığı için rotasyonel hareketleri çok hızlı gerçekleşir. Moleküler kesit alanındaki artışa uyum sağlamak için efektif zincir

uzunluğunda %8 lik bir düşüş gerçekleşir. Bu durum gauche konformerlerinin sayısı ve komşu moleküller arasındaki mesafenin artmasına, dolayısıyla sıvı fazda membran geçirgenliğinin artmasına neden olur (Högberg ve diğ. 2008). Yani DPPC çift tabakaları düşük ve yüksek sıcaklıklarda faz geçişi denilen durum değişikliklerine sahiptirler. Lipidlerin bu fiziksel özellikleri membran fonksiyonlarını belirlediği için hem model hem de biyolojik membranlarda ilaç-membran etkileşimlerinin incelenmesinde aktif araştırma molekülleri olarak tercih edilmesini sağlar (Konyakhina ve diğ., 2011).

### **1.2.3. Lipozomların termotropik evreleri**

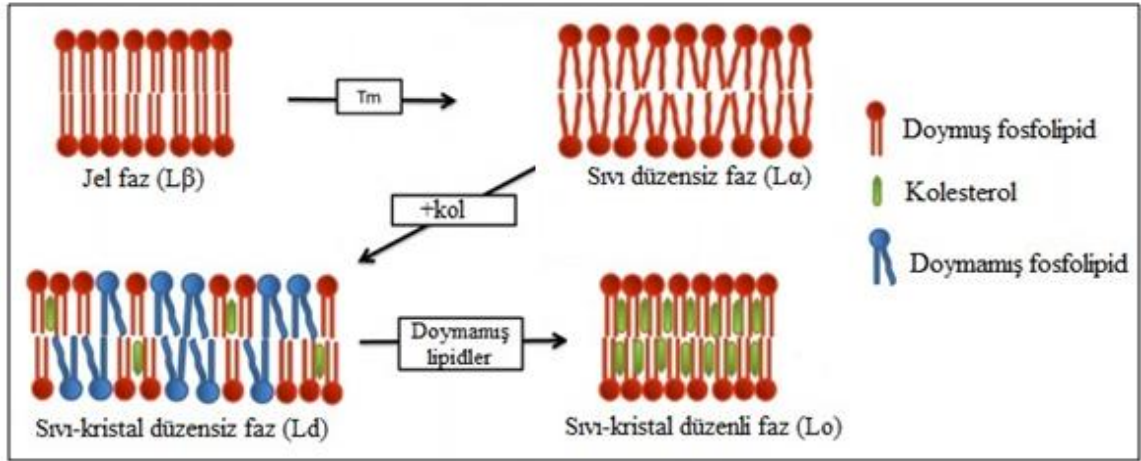
Fosfolipidlerin lipozomlardaki moleküler düzenlenişlerinde kristal jel, jel, dalgalı jel ve sıvı kristal faz olarak dört farklı durum gözlenir. Bunlardan ilk üçü düşük sıcaklıklarda gözlemlenen jel fazdır. Jel fazda lipidler arasında güçlü Van der Waals bağları olduğu için hareketleri kısıtlı, sıkıca paketlenmiş durumdadırlar. Kalan dördüncü 41°C'nin üstünde gözlemlenen sıvı kristal fazdır. Sıcaklık artışıyla membran lipidlerinin molekül içi ya da aralarında Van der Waals bağları sayısı değişikliğe uğrar. Hidrokarbon açil zincirlerinin düzenli olduğu jel fazdan ( $L\beta$ ), konformasyon değişikliğine uğramış daha akışkan sıvı kristal faza ( $L\alpha$ ) geçer (Ulmschneider ve diğ., 2009). Sıvı kristal fazda lipidlerin açil zincirleri arasındaki Van der Waals bağları zayıfladığı için fosfolipidler birbirlerine paralel konumlanır ve her lipid kendi eksenini etrafında ve zar katmanları arasında hareket edebilir duruma geçer. Lipidlerin bu şekilde jel fazdan sıvı kristal faza geçmeleri onların ana faz geçiş sıcaklığı ( $T_m$ , °C) olarak değerlendirilir ( Bultmann ve diğ., 1991, Cristani ve diğ., 2007), (Şekil 1.5.).



Şekil 1.5. Çift tabakalı fosfolipidlerin  $T_m$  değerindeki değişimin şematik gösterimi

Ayrıca trans-gauche izomerlerinin ve lipidlerdeki Van der Waals bağlarının bozulmasıyla oluşan enerji, ana faz geçiş entalpisi ( $\Delta H$ , kkal/mol) olarak değerlendirilir.

Hayvan hücre zarlarındaki KOL varlığı ise yüksek sıcaklıkta yağ asit zincirlerinde (hidrokarbon zincirlerinde) sıvı-kristal düzensiz faza ( $L_d$ ) geçişe sebep olur; bununla birlikte KOL artışı açıl zincirlerin daha düzenli sıralandığı sıvı-kristal düzenli faza ( $L_o$ ) geçişe sebep olur (Kuo ve Chang 2014, Almeida ve Joly 2014, London 2005), (Şekil 1.6.). Model fosfolipid çift katmanlarında, tipik ölçülen kalınlık farklılıkları sıvı düzenli ve sıvı düzensiz fazları ( $L_o$ ,  $L_d$ ) için ~0.2 ile ~1.6 nm arasındayken jel fazda biraz daha fazladır (Williamson ve Olmsted, 2015).



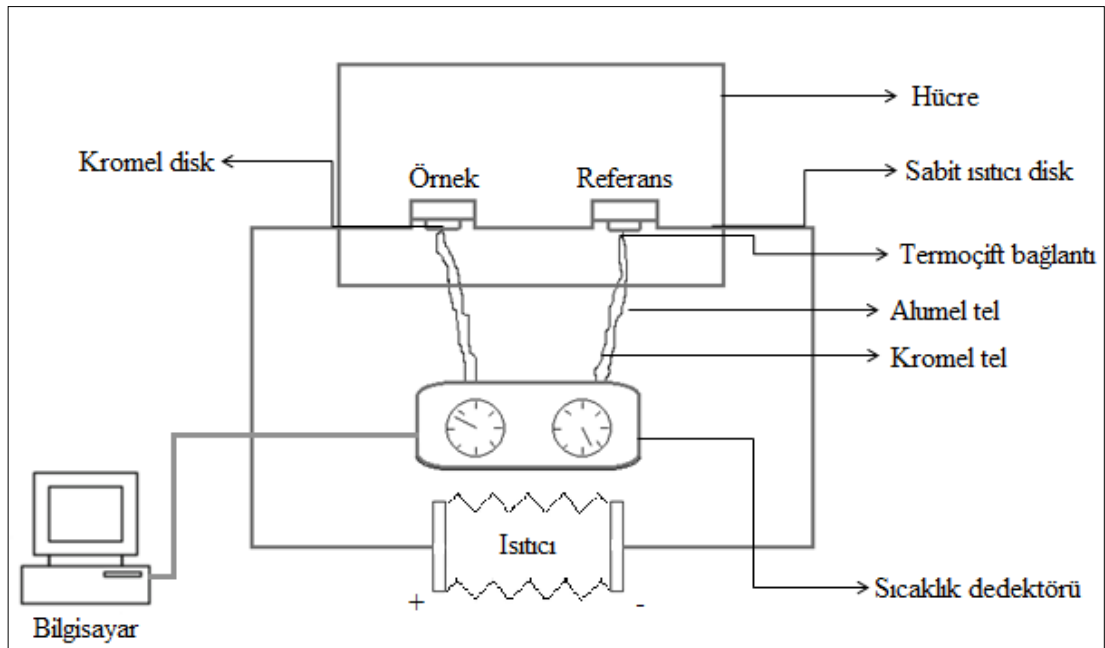
Şekil 1.6. Lipozomların faz çeşitleri (Zalba ve Hagen, 2017)

### 1.3. Biyofiziksel Yöntemler

Bu çalışmada FT-IR ve DSC yöntemleri kullanıldı.

#### 1.3.1. Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC)

DSC 1963'ten beri en yaygın kullanılan hızlı ölçüm yaptığı ve az miktarda örnek gerektirdiği için avantaj olan bir termal analiz tekniğidir. DSC terimi; basit bir şekilde, doğrusal bir sıcaklık skalası (rampası) sırasında, örnek üzerinde kantitatif kalorimetrik bilginin elde edilebileceğini ifade eder (Menczel ve diğ., 2014).



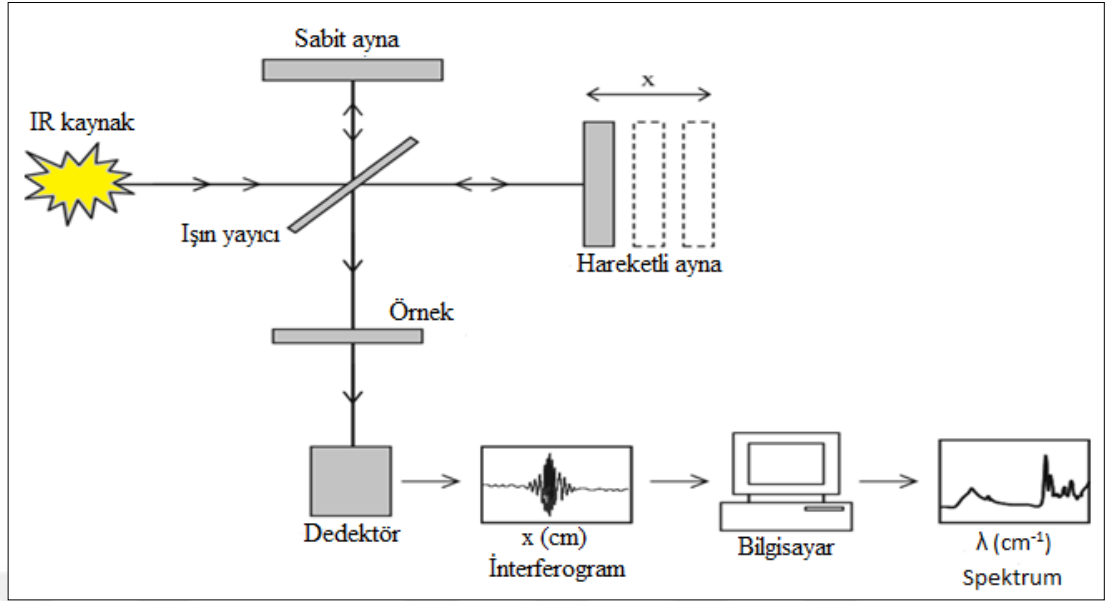
Şekil 1.7. Diferansiyel Taramalı Spektroskopisinin (DSC) şematik gösterimi

DSC örnekleri, en uygun termal iletkenliğe sahip, minimum reaksiyon için tasarlanmış küçük metal panlarda analiz edilir. Panlar açık, pim deliği kapalı ve ya sızdırmaz olabilir ve inert bir malzemeyle doldurulmuş bir özdeş konfigürasyona sahip referans pan ile birlikte kullanılır. Doğru kantitatif çalışma için, örneğin ve referans panların termal kütlesi eş hale getirilmelidir. Ayrıca yüksek saflık kalibrasyon standartlarına uygun ve temiz DSC fanlarının kullanımı da doğru sonuç için büyük önem taşımaktadır (Clas ve diğ., 1999). Ölçüm yapılırken referans ve örnek eş zamanlı bir şekilde sabit ısıtıcı disk aracılığıyla değişen sıcaklıklara maruz bırakılır. Değişen sıcaklıkla birlikte örnekte faz geçişi gerçekleştiğinde örnek tarafından absorbe edilen termal enerji referansa eklenir. Referansa eklenen bu enerji dengeleme enerjisi olarak tanımlanabilir ve kayıt altına alındığında örneğin faz geçiş enerjisinin ölçümünü (entalpi değişimini) verir (Menczel ve diğ., 2014; Yeagle ve diğ., 2011; Castelli ve diğ., 2003; Haines ve diğ., 1998).

DSC tekniğinin başlıca uygulamaları polimer ve farmasötik alanlardır. Özellikle yeni ilaç içeriğinin saflığındaki değişimleri(geçiş) saptamak veya yeni bir polimorfik formun erken tespiti gibi farmasötik uygulamalarda kullanılabilir. Farmasötik çalışmalara ışık tutacak ilaç lipid etkileşimlerinin araştırıldığı çalışmalarda da çokça tercih edilmektedir (Bilge D. ve diğ.,2013; Severcan ve diğ., 2001). DSC ile hücre membran lipidlerinin ilaçlar ile etkileşimi sonucu oluşan faz geçiş sıcaklığı ( $T_m$ , °C) ve ana faz geçiş entalpisi ( $\Delta H$ , kkal/mol) analiz edilir.

### **1.3.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi**

FT-IR, 1960'lı yıllardan beri kullanılan, farklı dalga boylarındaki moleküler titreşimleri ölçerek farklı titreşim gruplarını görüntüleyip onların karakterize edilmesini sağlayan biyofiziksel tekniktir (Whaley-Mayda ve diğ., 2019, Ali ve diğ., 2019, Griffiths ve diğ., 2007).



Şekil 1.8. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisinin şematik gösterimi

FT-IR analiz yaparken şu yolları izler; ışın kaynağından ayrılarak ışın yayıcıya gelir, burada ışın hem sabit hem de hareketli aynaya aynı anda gönderilir, daha sonra ışınlar aynalardan ayrılarak tekrar ışın yayıcıya gelir, buradan da örneğin bulunduğu yere ulaşır, örnek kimyasal özelliklerine bağlı olarak ışığı emer ve bu sırada emilen ışın sonucunda biriken radyasyon dedektör tarafından toplanır.

FT-IR hızlı, tahribatsız, tekrarlanabilir, kullanımı kolay ve düşük maliyetli olma yönünden avantajlı olduğu için biyokimya, sitoloji, nöroloji, farmakoloji, mikrobiyoloji gibi birçok alandaki çalışmalarda (Nazeer ve diğ., 2017; Shivanoor ve diğ., 2016; Barron 2011; Zoumpopoulou ve diğ., 2010; Mietke ve diğ., 2010; Al-Holy ve diğ., 2006) kullanılan bir araçtır. Biyolojik sistemlere zarar vermeden DSC'e göre moleküler düzeyde daha detaylı incelemeler yapılabilmesine imkan sağladığı için ilaç-lipid etkileşimleri çalışmalarında büyük önem taşır. Özellikle ilaç-lipid etkileşimleri sırasında moleküler yapıdaki farklı titreşim gruplarını görüntüleyerek lipid açıl zincirleri, kafa grupları ve hidrofilik kısma yakın gliserol grupları hakkında detaylı bilgi sunar. Bu bölgelere atıfta bulunan belirli frekanslardaki bant verileri ilaçların, lipid faz geçişi, lipid düzeni ve akışkanlığı üzerindeki etkileri ve lipid rafları içerisindeki konumu hakkında bilgiler verir (Larkin 2018; Mignolet ve diğ., 2016; Briuglia ve diğ., 2015).

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Kimyasal Maddeler

(R)-2-asetamido-N-benzyl-3methoxypropionamide (lakosamid, LCM), dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), kolesterol, triklorometan (kloroform), fosfat tampon tablet, etanol (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA); azot (N) (Hat Gaz, Türkiye). Bu çalışmada kullanılan kimyasallara saflaştırma işlemi uygulanmadı.

### 2.2. Çok Tabakalı Model Membran Sistemlerinin Hazırlanması

Çok tabakalı model membran sistemleri literatürdeki benzer çalışmalar baz alınarak (a göre demesem) hazırlandı (Türker ve diğ., 2011, Türker-Kaya ve diğ., 2017). Öncelikle 200 ml distile suda 1 fosfat tampon tuz tableti çözdürülerek fosfat tampon çözeltisi hazırlandı. (200 ml suda çözünen bir fosfat tampon tuz tableti, 0.137 M sodyum klorit, 0.0027 M potasyum klorit, 0.01M fosfat tamponu içerir, 25°C'de pH=7.4'tür). Çalışmada kullanmak için belirlenen LCM miktarları (%1, %10 ve %20 mol), kolesterol miktarları (%1 ve %10 mol) ve DPPC miktarları (%100, %99, %90 ve %80 mol) hesaplandı. Ayrı ayrı olacak şekilde DPPC ve kolesterol kloroformda, lakosamid ise etanolda çözdürülerek stok çözeltileri hazırlandı. Örnekleri oluşturmak için hazırlanan stok çözeltilerden mol yüzdelik değerlerine göre sırasıyla DPPC, LCM ve kolesterol ependorflara konuldu. Her oluşturulan karışımın bulunduğu ependorflar 2 dakika vorteks ile karıştırıldı. Ependorflarda ince film tabakası oluşturmak amacıyla çözelti içindeki organik çözücüler, önce azot gazı ile en düşük ayar kullanılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra örnekler dondurulup kurutma sisteminde (Labconco, Freeze Dry System) 18 saat boyunca vakuma maruz bırakıldı. İnce lipid tabakası oluşmuş ependorflara 75µl tampon çözelti eklendi. Elde edilen karışım, 2 dakika 60°C'de (DPPC Tm değerinin 20°C kadar üzerinde), 2 dakika vorteks karıştırıcıda döngüsel olarak işleme tabi tutularak süt renginde çok katlı model membran sistemleri (lipozomlar) elde edildi.

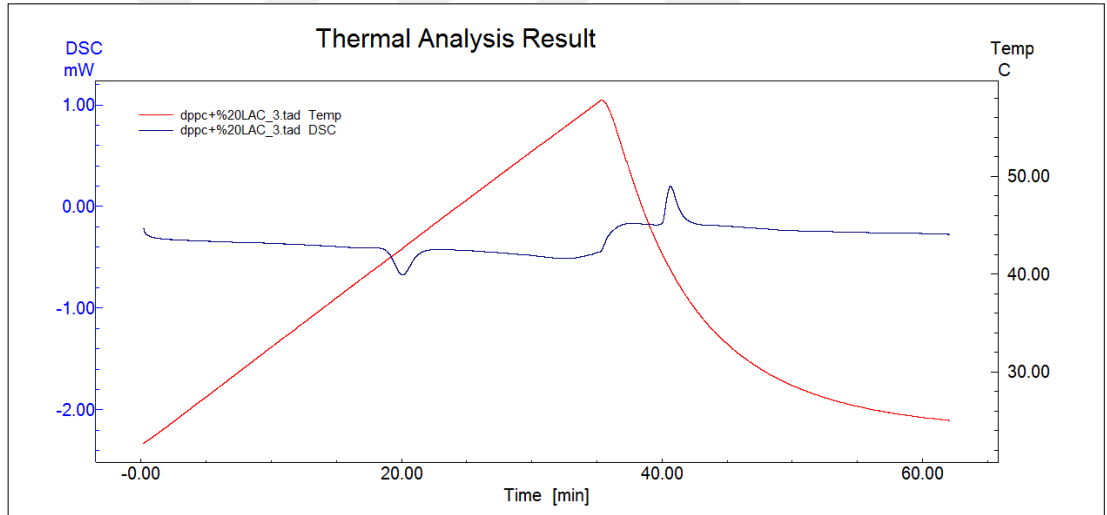


## 2.3. Diferansiyel Tarama Kalorimetresi Çalışmaları

### 2.3.1. DSC ölçümleri için örneklerin hazırlanması

DPPC membran sistemleri ilaç varlığı ve yokluğunda ve ayrıca kolesterollü ilaç varlığı ve yokluğunda olmak üzere iki düzenek olarak hazırlandı (Alsop R.J. ve diğ., 2015). Literatüre göre hazırlanan süt renginde çok katlı model membran sistemleri içeren ependorflardan 50 $\mu$ l alındı ve yalıtılmış standart alüminyum DSC panlarına yerleştirildi. Ayrıca 50 $\mu$ l'lik buffer diğer panlara konarak kontrol grubu oluşturuldu. Panlara yerleştirilmiş örneklerin ve beraberindeki kontrol gruplarının ölçümleri Shimadzu DSC-60 Plus Kalorimetresi (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japonya) ile gerçekleştirildi.

### 2.3.2. DSC ölçümlerinden termogramların eldesi



Şekil 2.1. %20 mol LCM içeren DPPC örneğinden elde edilen DSC termogramı

Ölçümler 25-60°C aralığında 1°C/dak sıcaklık artışı ve azalışı şeklinde yapıldı. Çekimler 3 kere tekrarlandı. Oluşan termogramlar (Şekil 2.1.) Shimadzu'da geliştirilmiş TA60 software programı ile analiz edildi. Böylece maksimum pik ile  $T_m$  belirlendi;  $\Delta H$  değeri hesaplandı.

## 2.4. FTIR Çalışmaları

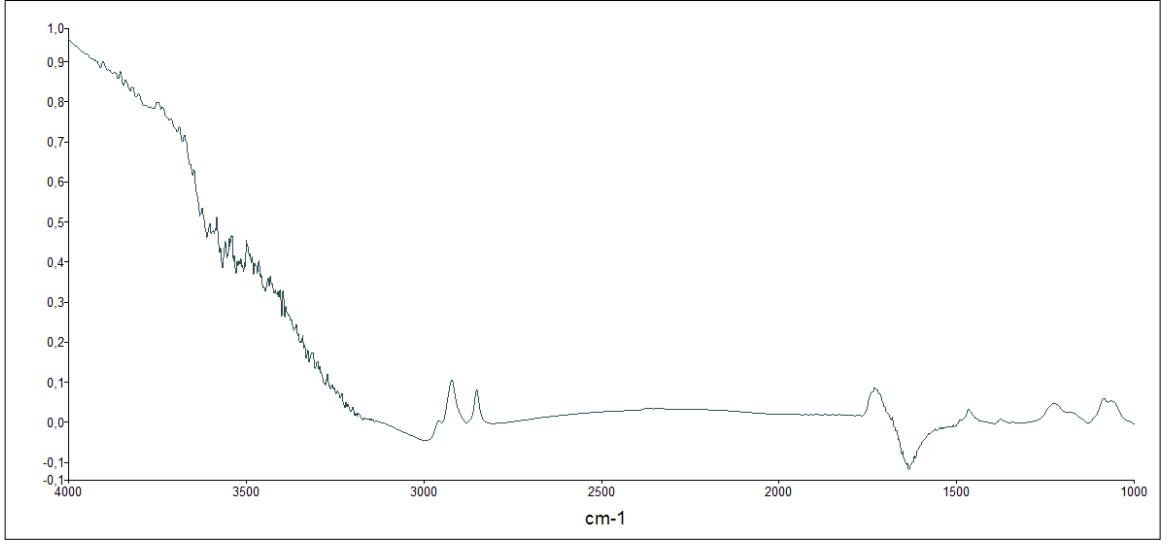
### 2.4.1. FTIR ölçümleri için örneklerin hazırlanması

%20 mol LCM içeren DPPC'li örneklerle, %20 mol LCM ve %10 mol kolesterolü birlikte içeren DPPC'li örnekler hazırlandı. Vakuma maruz bırakılmış LCM içeren ve içermeyen; kolesterollü LCM içeren ve içermeyen DPPC film tabakası olan örneklere 20µl fosfat tampon çözeltisi eklendi. Elde edilen karışım, 2 dakika 60-65°C'de (lipid T<sub>m</sub> değerinin yaklaşık 20°C kadar üzerinde), 2 dakika vorteks karıştırıcıda döngüsel olarak işleme tabi tutularak süt renginde çok katlı model membran sistemleri (lipozomlar) elde edildi. Ardından 20µl'lik lipozom örneklerinden alınarak 12µl kalınlıktaki kalsiyum florür (CaF<sub>2</sub>) quartz pencereler arasına örnek kaybı olmaması amacıyla spacer aracılığıyla sabitlendi. Örneklerin, her ölçümden önce her sıcaklıkta 5dk. inkübe edilerek 28 ve 52 °C larda spektrumları alındı. Her örnek ölçümü Perkin Elmer Spektrum One FT-IR Spektroskopisi (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) kullanılarak 2 tekrar halinde gerçekleştirildi.

### 2.4.2. FTIR ölçümlerinde spektrumların eldesi

Örnek spektrumlarından havanın spektrumu Perkin Elmer Spectrum One programı ile otomatik olarak çıkartıldı. Her örneğin spektrumu 1000 cm<sup>-1</sup> -4000 cm<sup>-1</sup> aralığında elde edildi ( Şekil 2. 2.) Ayrıca incelenen örnek sisteminin sulu olması örnek spektrumun bazı bantların görünümünü etkilediği için tampon çözelti spektrumu yine Perkin Elmer Spektrum One programı kullanılarak çıkartıldı.

Elde edilen spektrumlardaki CH<sub>2</sub> asimetric, CH<sub>2</sub> asimetric, CH<sub>3</sub> simetric, C=O simetric, PO<sub>2</sub><sup>-</sup> asimetric bantlarının her biri için spektral analiz yapıldı. Bantların frekans değerleri ve band genişlikleri Perkin Elmer Spektrum One spektral analiz programı ile tespit edildi. Bantların frekans değerleri ağırlık merkezindeki pik yüksekliğinin %80'i alınarak hesaplandı. CH<sub>2</sub> asimetric bandının band genişliğinin hesaplanmasında %80'lik hesaplamadaki ağırlık merkezi genişliğinin cm cinsinden değeri cm<sup>-1</sup> birimine dönüştürüldü.

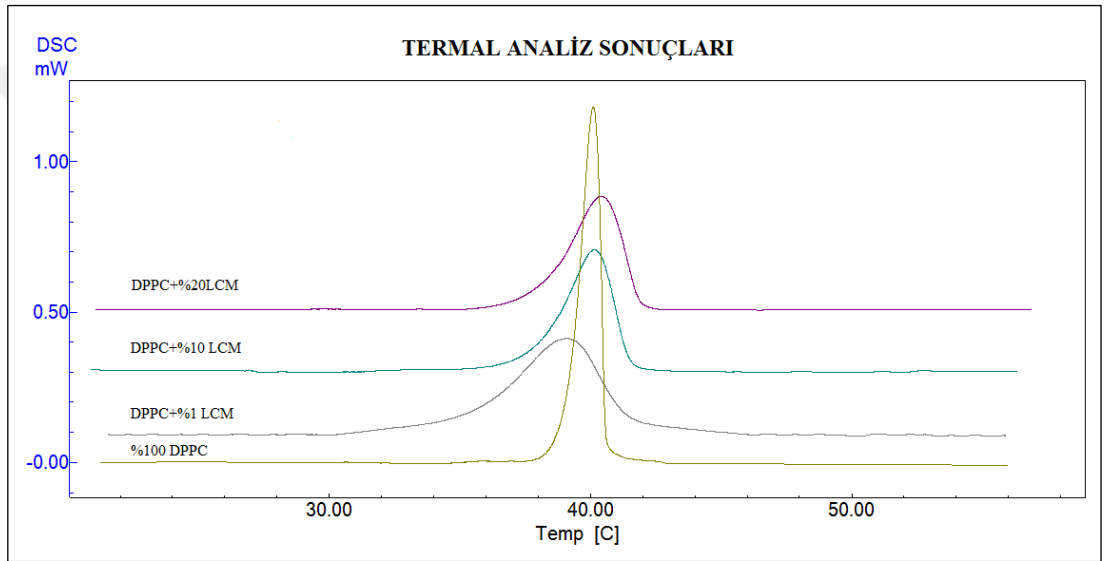


Şekil 2.2. LCM içermeyen DPPC FT-IR spektrumu

### 3. BULGULAR

#### 3.1 DSC Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular

Bu çalışmada DSC ile farklı konsantrasyonlardaki (%1, 10, 20 %mol) LCM'nin kolesterol varlığında ve yokluğunda DPPC lipozomlarındaki  $T_m$  ve  $\Delta H$  değerleri üzerindeki değişimleri incelendi.



Şekil 3.1. Saf DPPC ve %1, %10, %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının DSC termogramları

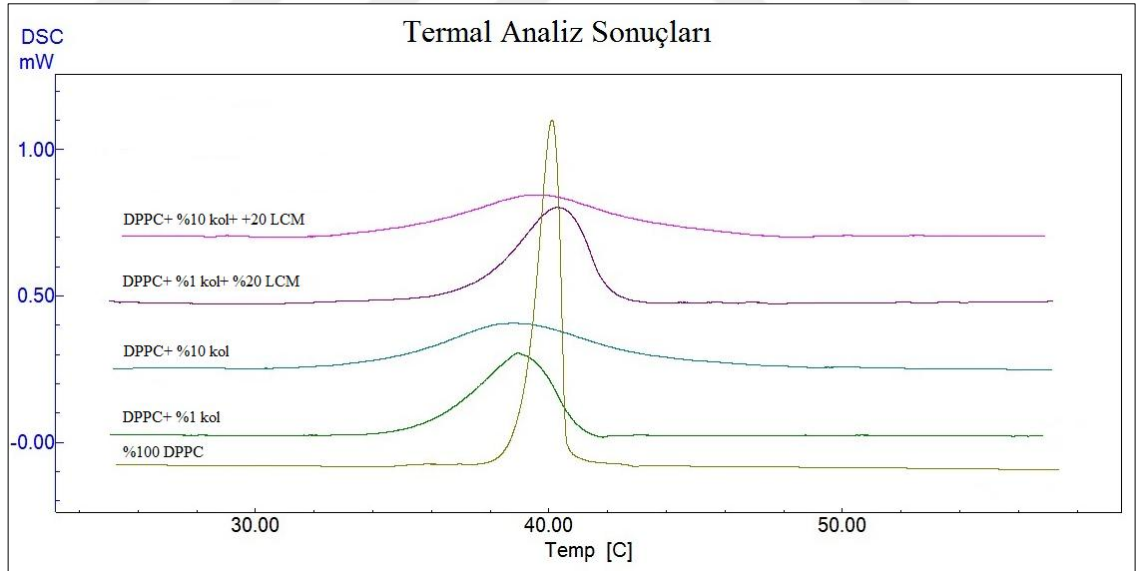
Şekil 3.1. KOL yokluğunda farklı konsantrasyonlarda LCM içeren ve içermeyen DPPC lipozomlarına ait termogramları göstermektedir. Elde edilen termogramlara ait  $T_m$  ve entalpi değerleri ise Tablo1.1'de gösterilmektedir. Şekil ve tablodan görüldüğü saf DPPC'nin  $T_m$  değeri yaklaşık 40°C olarak belirlendi. Bu değer, literatürle (Gharib ve diğ., 2018, Türker ve diğ., 2011, Leekumjorn ve Sum, 2007) uyum içerisindedir. Ayrıca saf DPPC örneğinin ana faz geçiş pikinin dar bir şekilde olması DPPC moleküllerinin uygun şekilde lipozom formunu aldıklarını ve 40 °C'de tüm lipidlerin aynı anda faz değişimi gösterdiklerini işaret etmektedir. Bir başka deyişle saf DPPC'nin keskin entalpi geçişi açıl zincirlerinin hareketliliğine bağlıdır. Ve lipid zincirlerinin arasındaki yüksek iş birliğini ifade eder (Gardikis ve diğ.,

2006). Artan LCM konsantrasyonu ile birlikte ise ana faz geçiş pikinde genişleme eğilimi tespit edildi. (Şekil 3. 1.).

Tablo 3.1.Saf DPPC ve %1mol, %10mol, %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının Tm ve ΔH değerleri

| ÖRNEK              | Tm (°C) | ΔH (j/g) |
|--------------------|---------|----------|
| % 100 DPPC         | 40.11   | 31.72    |
| DPPC+ % 1mol LCM   | 39.35   | 26.05    |
| DPPC+ % 10mol LCM  | 40.15   | 25.58    |
| DPPC+ % 20 mol LCM | 40.42   | 24.57    |

Saf DPPC lipozomlarına %1mol LCM eklenmesiyle, DPPC lipozomlarının Tm değerini daha düşük sıcaklığa kaydıracağı gözlemlendi. Bunun aksine DPPC lipozomlarına %10 ve %20 mol oranlarında LCM eklenmesiyle Tm değerinin daha yüksek sıcaklıklara kaydığı saptandı (Tablo1.1). Aynı zamanda DPPC lipozomlarına %1, %10 ve %20mol LCM eklenmesi ΔH sırasıyla kademeli olarak azalttığı belirlendi (Tablo3.1.).



Şekil 3.2. Saf DPPC ve %1, %10 mol KOL ve %1 KOL ile %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının DSC termogramları

Şekil 3.2. farklı konsantrasyonlarda KOL ve KOL ile birlikte LCM içeren DPPC lipozomlarına ait termogramları göstermektedir. Elde edilen termogramlara ait Tm ve entalpi değerleri ise Tablo 3.2.'de gösterilmektedir. Şekil ve tablodan görülen DPPC lipozomlarına LCM eklendiğinde ΔH ve Tm değerlerindeki en etkin sonuç %20mol

olarak belirlendi. Bu nedenle KOL'un varlığının LCM-DPPC etkileşmesine etkisini değerlendirmek için çalışmanın sonraki aşamasında sadece %20 mol LCM oranıyla deneylere devam edildi. Saf DPPC lipozomlarına %1 ve %10 mol KOL eklenmesiyle, DPPC lipozomlarının ana faz geçiş pikinde sırası ile artan genişleme, bununla birlikte %20 mol LCM içeren lipozomlara %1 ve %10 mol konsantrasyonlarında KOL eklenmesiyle de benzer genişlemeler tespit edildi (Şekil 3.2.).

Tablo 3.2.Saf DPPC'den oluşan lipozomların ve %1mol, %10 mol KOL içeren DPPC ve %1mol, %10 mol KOL ile sadece %20 mol LCM içeren DPPC lipozomlarının T<sub>m</sub> ve ΔH değerleri

| ÖRNEK                    | T <sub>m</sub> (°C) | ΔH (j/g) |
|--------------------------|---------------------|----------|
| DPPC                     | 40.11               | 31.72    |
| DPPC+ %1mol KOL          | 38.93               | 25.73    |
| DPPC+%10 mol KOL         | 38.81               | 17.16    |
| DPPC+%1mol KOL+ %20 LCM  | 40.31               | 24.85    |
| DPPC+%10mol KOL+ %20 LCM | 39.60               | 22.08    |

Buna bağlı olarak saf DPPC lipozomlarına %1 ve %10 mol KOL eklenmesiyle T<sub>m</sub> değerinin daha düşük sıcaklıklara kaydığı gözlemlendi. Bu saf lipozomlara %1 mol KOL birlikte %20 mol LCM eklendiğinde ise T<sub>m</sub> değerinin daha yüksek değerlere kaydığı gözlenirken KOL miktarı %10 mol'e çıkarıldığında %1 mol'e göre düşüş saptandı. Ayrıca DPPC lipozomlarına KOL eklenmesiyle ters orantılı olarak entalpi değeri azaldı. Bu durum KOL artışına bağlı olarak LCM eklendiğinde de belirlendi.

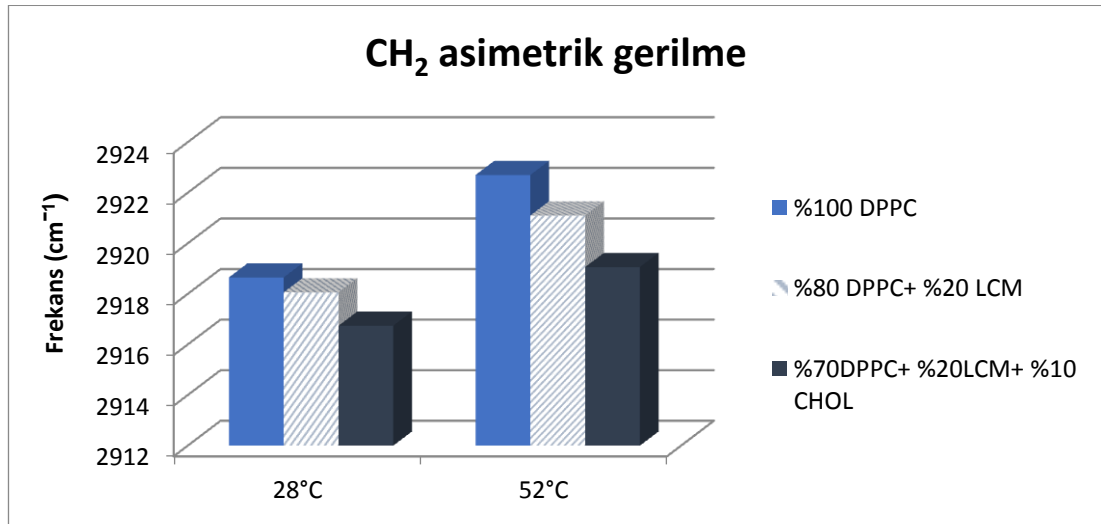
### 3.2 FTIR Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular

DSC tekniği ile DPPC'nin T<sub>m</sub> değeri yaklaşık 40°C olarak belirlendiği için FT-IR çalışmalarında DPPC jel ve sıvı kristal fazında LCM'nin etkisini incelemek amacıyla örneklerde iki fazı temsil etmesi amacıyla iki sıcaklık değerlerinde spektrumların frekans ve bant genişliğinde incelemeler yapıldı; 28°C (jel faz) ve 52°C (sıvı kristal faz). Belirlenen bu sıcaklıklarda FT-IR spektroskopisi ile lipid düzeni, lipid dinamiği ve hidrojen bağlanma durumu detaylandırılmak amacıyla hidrokarbon kuyruğu temsil eden 3100-2800 cm<sup>-1</sup> spektral aralığındaki karbon-hidrojen (C-H) gerilme bantlarının bölgeleri ile gliserol baş grubu temsil eden 1750-1700 cm<sup>-1</sup> ve 1250-1200

cm<sup>-1</sup> spektral aralıktaki karbonil titreşim bantları bölgeleri incelendi. İncelemeler saf DPPC lipozomları, %20 mol LCM içeren lipozomlar, %20 mol LCM ile %10 mol ya da %1 mol KOL içeren lipozomlar kullanılarak gerçekleştirildi. Bu konsantrasyon ve aralıklarda yer alan CH<sub>2</sub> asimetrik, CH<sub>3</sub> simetrik, C=O simetrik, PO<sub>2</sub><sup>-</sup> asimetrik frekans değerlerinde ve CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bandındaki genişlikte oluşan spektral değişimler tespit edildi. DPPC lipozomlarına DSC örneklerinde LCM eklendiğinde ΔH ve T<sub>m</sub> değerlerindeki en etkin sonuç %20mol olarak belirlendiği ve bu nedenle KOL'un varlığının LCM-DPPC etkileşmesine etkisini değerlendirmek için DSC çalışmalarının sonraki aşamasında sadece %20 mol LCM oranıyla deneylere sürdürüldüğü için FT-IR örneklerinde de bu oranlarla deney süreci devam ettirildi.

### 3.2.1. CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme

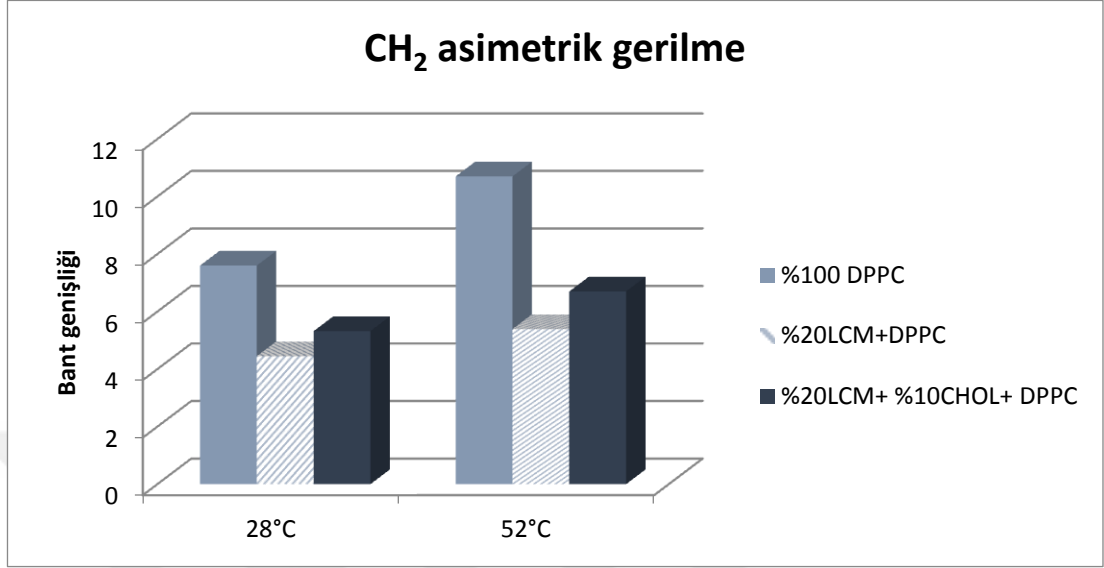
Şekil 3. 3. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren DPPC ve %20 mol LCM ile birlikte %10 mol KOL içeren lipozomların jel ve sıvı kristal faza denk gelen sıcaklıklardaki CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bantlarını içeren frekans spektrumlarını göstermektedir. Şekil 3. 4. ise aynı konsantrasyonlardaki bant genişliğini içeren spektrumları göstermektedir.



Şekil 3.3. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bandındaki 28°C ve 52°C'deki frekans değişimleri

Şekillerde görüldüğü gibi saf DPPC lipozomlarına %20 mol LCM ve daha sonra LCM ile %10 mol KOL eklenmesiyle jel ve sıvı kristal fazda CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme

bantlarının her ikisinin de frekans değerlerinde kademeli bir şekilde azalma belirlendi (Şekil3.3).



Şekil 3.4. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının CH<sub>2</sub> asimetric gerilme bandındaki 28°C ve 52°C'deki bant genişliği değişimleri

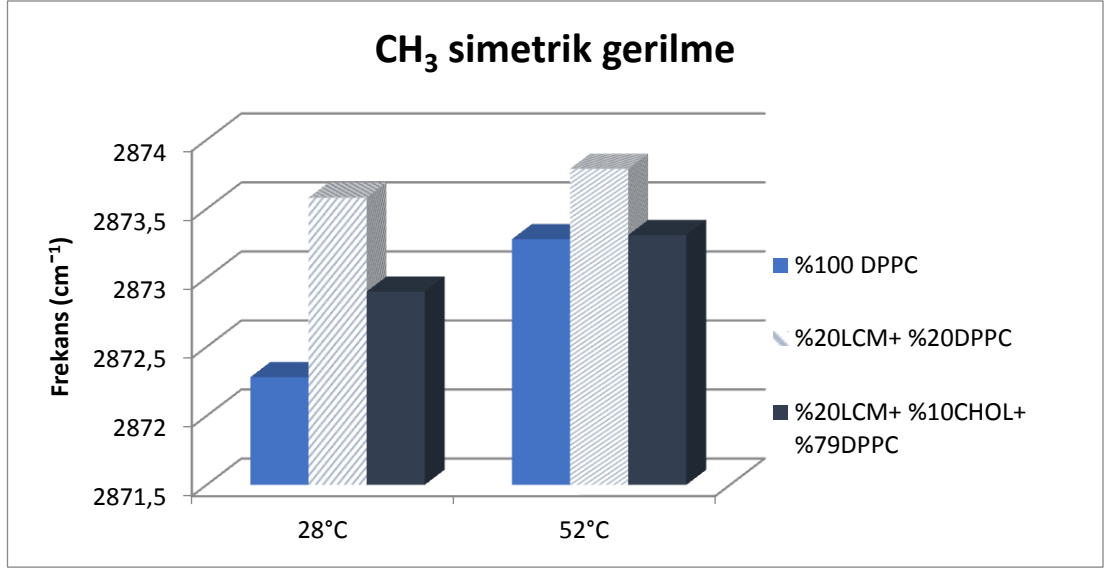
Buna karşın iki farklı fazda DPPC lipozomlarına %20 mol LCM eklenmesiyle CH<sub>2</sub> asimetric gerilme bandının bant genişliklerinde azalma gözlenirken %20 mol LCM ile %10 KOL eklenmesiyle bant genişliklerinde tekrar bir artış tespit edildi (Şekil 3.4).

### 3.2.2. CH<sub>3</sub> simetrik gerilme

Şekil 3. 5. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren DPPC ve %20 mol LCM ile birlikte %10 mol KOL içeren lipozomların jel ve sıvı kristal faza denk gelen sıcaklıklardaki CH<sub>3</sub> simetrik gerilme bantlarını içeren frekans spektrumlarını göstermektedir.

Şekilde görüldüğü gibi DPPC lipozomlarına %20 mol LCM eklenmesiyle jel ve sıvı kristal fazın her ikisinde CH<sub>3</sub> simetrik gerilme bandının frekans değerinde artma gözlenirken %20 mol LCM ile %10 mol KOL eklenmesiyle değerlerde tekrar bir azalma tespit edildi. Üstelik sıvı kristal fazda bu azalış neredeyse saf DPPC'nin sıvı kristal fazındaki frekans değerine döndürecek kadardır (Şekil3.5).



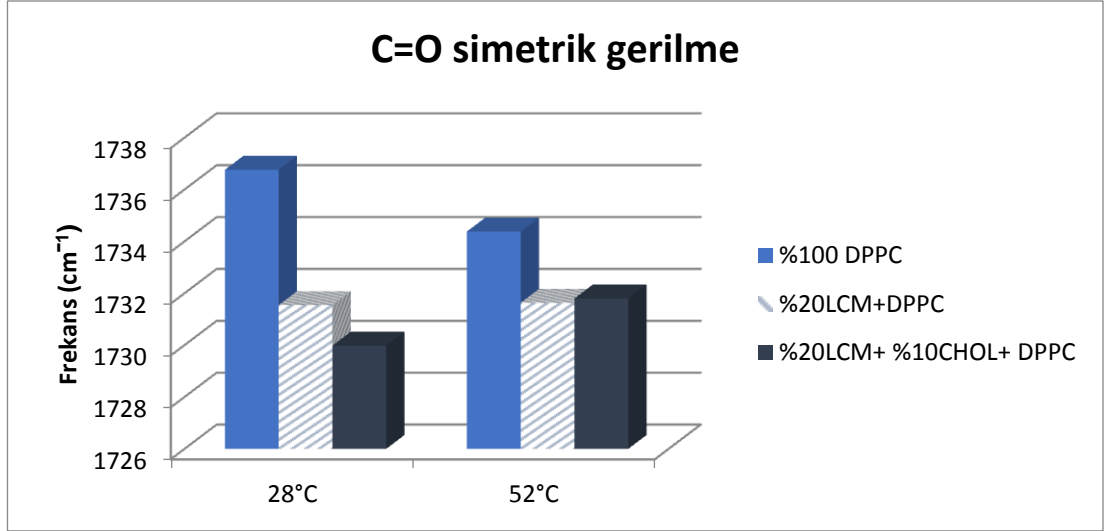


Şekil 3.5. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 mol LCM ile %10 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının CH<sub>3</sub> simetrik gerilme bandındaki 28°C ve 52°C'deki frekans değişimleri

### 3.2.3. C=O simetrik gerilme

Şekil 3. 6. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren DPPC ve %20 mol LCM ile birlikte %10 mol KOL içeren lipozomların jel ve sıvı kristal faza denk gelen sıcaklıklardaki C=O simetrik gerilme bantlarını içeren frekans spektrumlarını göstermektedir.

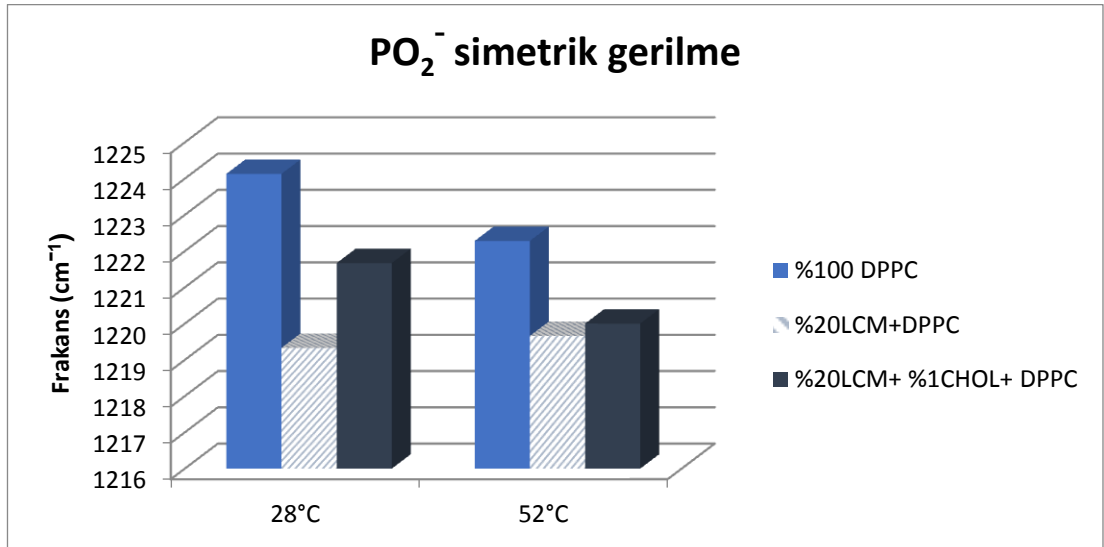
Şekilde görüldüğü üzere DPPC lipozomlarına %20 mol LCM eklenmesiyle jel ve kristal fazın her ikisinde C=O simetrik gerilme bandının frekans değerlerinde belirgin bir azalma belirlendi. Fakat %20 mol LCM ile %10 mol KOL eklenmesiyle jel fazdaki bu bandın frekans değerinde azalma devam etmesine rağmen sıvı kristal fazdaki bandın frekans değerinde tekrar bir artma tespit edildi (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20mol LCM ile %10mol KOL içeren DPPC lipozomlarının C=O simetrik gerime bandındaki 28°C ve 52°C'deki frekans değişimleri

### 3.2.4. PO<sub>2</sub><sup>-</sup> simetrik gerilme

Şekil 3. 7. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren DPPC ve %20 mol LCM ile birlikte %1 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının jel ve sıvı kristal faza denk gelen sıcaklıklardaki PO<sub>2</sub><sup>-</sup> simetrik gerilme bantlarını içeren frekans spektrumlarını göstermektedir.



Şekil 3.7. Saf DPPC, %20 mol LCM içeren ve %20 LCM ile %1 mol KOL içeren DPPC lipozomlarının PO<sub>2</sub><sup>-</sup> simetrik gerime bandındaki 28°C ve 52°C'deki frekans değişimleri

Bu şekilde de görüldüğü üzere DPPC lipozomlarına %20 mol LCM eklenmesiyle jel ve sıvı kristal fazın her ikisinde  $PO_2^-$  simetrik gerilme bandının frekans değerinde belirgin azalma belirlendi; fakat %20mol LCM ile %1 mol KOL eklenmesiyle değerlerde tekrar bir artma tespit edildi (Şekil 3. 7.).



#### 4. TARTIŞMA

Hücrelerin yapısal bütünlüğünü koruması, kararlı iç dengesini sürdürmesi ve kontrollü işleyiş gerçekleştirmesi hücre zarları aracılığıyla gerçekleşir. Hücre zarlarını oluşturan lipidlerin yapı ve faz geçiş davranışları bu durumun temel kontrol mekanizmalarındandır. Bu fonksiyonel yapının bozulması belirli hastalıklara sebep olmaktadır. Epilepsi bu hastalıklardan biridir. Epilepsi, beyindeki anormal aşırı veya senkronize nöronal aktiviteden kaynaklanan belirti ve/veya semptomların geçici durumu olarak tanımlanan epileptik nöbetin, en az bir defa gerçekleşmesidir. Nöbet oluşumuna neden olan bu nöronal aktivitedeki bozukluk ise MSS'deki hücrelerin fonksiyonu üzerindeki etkiyi ifade etmektedir. Bunun için üretilen ilaçların MSS'deki hücrelerde etkinlik göstermesi dolayısıyla o hedef hücrelerin zarlarıyla etkileşime girmesi mecburidir. Çünkü ilaçlar hücre zarlarındaki lipidlerden oluşmuş tabakalardaki porlardan pasif taşıma ya da bu tabakalara yerleşmiş kanal proteinleri aracılığıyla geçer. Dolayısıyla tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların hücre zarlarıyla iletişimini incelemek ilaç etkinliğini arttırmak ve moleküler mekanizmasını açıklamak açısından büyük önem taşımaktadır. İlaçların ve diğer bileşenlerin lipidlerin üzerindeki etkilerini anlamak için içeriği kontrol edilebilen model zarlarla çalışmalar yapmak yaygın bir yaklaşımdır (Jacobson ve diğ., 2019, Kırkoçoğlu ve Türker-Kaya, 2019, Shestivska ve diğ., 2018, Lioffi ve diğ., 2017, Losada-Pérez ve diğ., 2015, Altunayar ve diğ., 2015).

Düşük protein bağlanması ve vücuttaki dağılım seviyesi göz önüne alındığında LCM'nin membran lipidlerine bağlanması gerekir. Bu sebeple biz de çalışmamızda, LCM'nin DPPC lipidleri ile oluşturulmuş yapay zarlarla ilişkisini araştırdık. Bunun için KOL varlığında ve yokluğunda LCM'nin farklı konsantrasyonlardaki (%1, 10, 20 mol) DPPC lipozomlarındaki termotropik özellikleri ( $T_m$  ve  $\Delta H$ ) üzerindeki etkilerini inceledik. Ek olarak KOL varlığında ve yokluğunda LCM (%20mol) içeren DPPC lipozomlarının hidrofilik ve hidrofobik bölgeleri arasındaki moleküler bağlanmalarının detayları hakkında bilgiler elde ettik. Lipidlerin bu tarz biyofiziksel özelliklerini inceleme avantajları nedeniyle DSC ve FT-IR spektroskopisi kullanıldı.

DSC, termotropik parametrelerin ölçümünü sunarken ( $T_m$  ve  $\Delta H$ ); FT-IR lipidlerin açıl zincirlerinin metilen ve metil gruplarının ( $CH_2$  ve  $CH_3$ ) titreşimleri, karbonil gruplarının ( $C=O$ ) ve fosfat gruplarının ( $PO_2^-$ ) titreşimlerinin gözlenmesiyle lipid dinamikleri (akışkanlık), açıl zincir esnekliği (düzeni) ve onların hidrasyon durumu hakkında veri sunar.

Tablo 3.1. ve Şekil 3.1'de görüldüğü üzere %10mol ve %20 mol konsantrasyonlarındaki LCM'nin eklenmesiyle DPPC'nin  $T_m$  değerlerindeki artış lipidlerin açıl gruplarındaki bazı trans izomerlerinin gauche izomerlerine değişiminin daha yüksek sıcaklıklarda meydana gelmesi demektir. Yani, lipid bilayerların dış hidrofobik bölgedeki yani C1-C8 atomlarının konumundaki LCM'nin varlığını yansıtır olabilir. %1mol LCM eklenmesiyle ise DPPC lipozomlarının  $T_m$  değerinin %10 ve 20 mol eklenmesiyle çok daha düşük olması LCM'nin fosfolipidler arasına girerek çift tabakadaki lipidlere bağlandığını gösterir. Bu durum LCM'nin %1 kadar düşük konsantrasyonda dahi DPPC lipozomlarının termotropik parametreleri üzerinde çok etkili olduğunu açıklayabilir. Böylece LCM'nin termotropik davranış üzerine etkisi artan konsantrasyonuna bağlı olmadığı belirtilmelidir. %1mol , %10mol ve %20mol LCM eklenmesiyle oluşan  $\Delta H$  değerindeki kademeli azalış ise LCM'nin, açıl zincirler arasındaki van der Waals etkileşimlerini değiştirerek bilayerlardaki paketlenmenin artmasına neden olduğu şeklinde yorumlanabilir. (Ezer ve diğ., 2017, Altunayar ve diğ., 2015, Ceckler ve Cunningham, 1997).

Tablo 3.2.'deki sadece verilere göre saf DPPC lipozomlarına KOL eklenmesiyle (%1, 10 mol)  $T_m$  değerinin daha düşük sıcaklığa kaydırmış olması da lipid açıl zincirleriyle KOL'un etkileşime girdiğini göstermektedir (Meyer ve Smit, 2009). Bu durum KOL'un lipidlerle kimyasal yapısından dolayı daha fazla bağlanmalar yapıp zarın daha rijit hale gelerek lamel aralığının azaldığını gösteriyor olabilir (Alsop ve diğ., 2015). Bu da DPPC lipozomlarına KOL'un nüfus etme kapasitesinin daha yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. LCM içeren DPPC lipozomlarına %1mol KOL eklemesi  $T_m$  değerini yüksek sıcaklığa; %10mol kolesterol eklemesi, düşük sıcaklığa kaydırması ve ayrıca %1 ve %10mol KOL eklemesinin sırasıyla  $\Delta H$  değerini azaltması heterojen bir sistemin indüklendiğini gösterir (Gardikis ve diğ., 2006). Yani bu durum LCM'nin kolesterol ile lipidlerin açıl zincirleri arasındaki

van der Walls etkileşimlerini arttırdığını göstermektedir (Elger ve diğ., 2016). Yüksek sıcaklıkta jel fazına geçiş, işbirliği davranışı ve büyük entalpi değişimi ile karakterize edilir (Kodama ve Kawasaki, 2010). Ayrıca %20 mol LCM'e %10 mol KOL eklenmesiyle  $T_m$  değerinin daha düşük sıcaklığa kayması (Şekil 3.1., Şekil 3.2.) KOL'un ilacın etkinliğini değiştirdiğini gösterebilir.

Ana geçiş zirvesi yağ açıl zincirlerinin hareketliliği ile ilişkili olduğu için  $\Delta H$  ve  $T_m$  gibi parametreler lipid-lipid bağlanmalarının egemen olduğu zarlarda onların faz davranışlarını ve ayrıca LCM'nin KOL ile DPPC lipidlerine ayrılması olarak adlandırılabilir herhangi bir molekülün bağlanmasını yansıtır. Bu bağlamda DSC sonuçlarından elde edilen bulgulara göre LCM ve KOL molekülleri lipozomlardaki hidrofilik bölgelerle etkileşime girmiştir; bunun yanı sıra LCM'nin tek başına lipozomlarda etkinliği yüksekken KOL ile tek başına olduğu kadar etkinliğinin yüksek olmadığı yönünde bir değişim gözlenmiştir. LCM ve KOL'un arasında fosfolipidlere bağlanmak için oluşan rekabetinden kaynaklandığı söylenebilir. Bu durumları moleküler düzeyde detaylandırmak adına yaptığımız FT-IR spektroskopisi bulgularına göre, DPPC lipozomlarına LCM ve daha sonra KOL eklenmesiyle Şekil 3.3.'de görüldüğü gibi jel ve sıvı kristal fazda  $CH_2$  asimetrik gerilme bandının frekansındaki azalmanın tespiti DSC sonuçlarını destekleyerek sistemin daha rijit hale geldiğini göstermektedir (Altunayar ve diğ., 2015). Çünkü ana faz geçişi ( $\sim 41^\circ C$ ) sırasında gerçekleşen DPPC'nin  $CH_2$  gerilme modlarının tepe frekansındaki kayma tüm fosfolipidlerdeki gauche konformerlerinden transa doğru yapılan değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Kazancı ve diğ. 2001, Cameron ve Charette 1981). Diğer bir deyişle, bu bandın frekans değerleri fosfolipidlerin açıl zincirlerinin yapısal durumu yani düzenine bağlı olarak değişir. Frekansın yüksek değerlere kayması, gauche konformasyonlarının sayısının artışı (düzensizliği), düşük değerlere kayması ise trans konformasyonlarının sayısının artışı (düzeni) ifade eder (Ergün ve diğ., 2014, Yeagle 2004). Jel ve sıvı kristal fazdaki frekans azalması, lipozomlardaki gauche konformerlerinin sayıca azaldığını yani sistemin açıl zincir düzeninin arttırıldığını göstermektedir (Garip ve Severcan, 2010).

DPPC lipozomlarının dinamikleri hakkındaki bilgi  $CH_2$  asimetrik gerilme bandındaki bant genişliğinden elde edilir (Ezer ve diğ., 2017, Şahin ve diğ., 2013, Lopez-Garcia ve diğ., 2013). Şekil 3.4.'de tespit edilen  $CH_2$  asimetrik gerilme

bandındaki bant genişliğindeki LCM eklenmesi ile oluşan azalış yine membran dinamiğini arttırıcı yönde etki ettiğini göstermektedir. LCM'nin lipozomlar üzerindeki bu davranışı, aksiyon potansiyeli oluşması üzerindeki önleyici etkileri ile ilgili olabilir. Bu nöropatik ağrıya kullanımı ile de ilişkilendirilebilir (Beyreuther ve diğ., 2006). Üstelik aynı şekilde gösterilen LCM'li lipozoma KOL eklenmesi ile CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bandındaki bant genişliğinde oluşan daha az azalış ise membran dinamiğinde sadece LCM içeren lipozomlara göre daha az arttırıcı etki olduğunu destekler niteliktedir. Prensipte olarak KOL, saf DPPC lipozomlarına eklendiğinde jel fazdaki akışkanlığı azaltırken sıvı kristal fazda arttırır (Altun ayar ve diğ., 2015, López- García ve diğ.,1993). Bununla birlikte çalışmamızda CH<sub>2</sub> asimetrik gerilme bant genişliğindeki azalışın KOL ilavesiyle gözlenen artışı, yani KOL eklenmesiyle rijitlik artışı LCM'nin de akışkanlık azaltıcı etkisinden kaynaklanabilir. Bu bağlamda DPPC+ %10 mol KOL+ %20 mol LCM örneğinde T<sub>m</sub> ve bant genişliğinde diğer örneklerden daha yüksek olduğu belirtilmelidir. Her ne kadar bu bulgunun tüm örnekler arasında bir fark olmadığı şeklinde yorumlanması beklense de, modern zar çalışmaları için bu tür değişiklikler hala LCM, DPPC lipideri ve KOL arasında etkileşim olduğu anlamına gelebilir. Bu aynı zamanda FT-IR çalışmasının verilerinin yanı sıra ΔH değerindeki belirgin değişimleri yansıtabilir. (Yağış ve Türker-Kaya, 2018)

Şekil 3.5.'de görülen CH<sub>3</sub> simetrik gerilme bandının jel ve sıvı kristal fazın her ikisinde frekans değerinde DPPC lipozomlarına %20 mol LCM eklenmesiyle gözlenen artma membranın iç kısımlarındaki açıl zincirlerinin gauche konformerlerinin arttığını yani membran düzensizliğinin arttığını göstermektedir(REF?). %20 mol LCM ile %10 mol KOL eklenmesiyle değerde tekrar bir azalma gözlenmesi; üstelik sıvı kristal fazda bu azalış neredeyse saf DPPC'nin sıvı kristal fazındaki değere döndürecek kadar olması KOL eklenmesiyle LCM ile oluşan bu düzensizliğin azaldığını ifade eder. Bu da KOL molekülünün LCM ile karşılaştırıldığında zar lipidlerinin daha iç kısımlarına yerleşebildiğini göstermektedir. Benzer şekilde DSC bulgularına göre LCM'nin DPPC termotropik özellikleri üzerine yaptığı değişiklikler KOL eklenmesiyle daha etkin hale dönüşmüştür. Bu durum yukarıda bahsedilen KOL'un lipidler arasına penetrasyon kabiliyetinin daha yüksek olduğunu desteklemektedir.

Şekil 3.6’da ayırt edilen C=O gerilme bantlarındaki %20 mol LCM eklenmesiyle jel ve kristal fazlarda oluşan frekanstaki azalma, jel ve kristal fazlarda LCM’nin gliserol iskeleti ve fosfat kafa grupları veya etrafındaki su molekülleriyle hidrojen bağlanmaları yaptığını gösterirken KOL’un neden olduğu bu frekanslardaki artma hidrojen bağlanmalarında azaltıcı etki yarattığını göstermektedir (Bilge ve diğ., 2014, Kazancı ve diğ., 2001). Yani sıvı-kristal fazda KOL, fosfolipidlerde serbest C=O gruplarının artışına sebep olmuştur. Şekil 3.7.’de de jel ve sıvı-kristal fazdaki PO<sub>2</sub><sup>-</sup> gerilme bandındaki %20 mol LCM ile oluşan azalışlar ilacın fosfolipidlerin kafa grupları ile kuvvetli hidrojen bağları yaptığını, KOL’un ise bu bağlanmaları azalttığını da gösterir. LCM ve KOL’un hem karbonil hem de DPPC lipidlerinin kafa grupları ile hidrojen bağlanmaları yapması, hem KOL’un hem de LCM’nin, Altunayar ve diğ. tarafından bildirildiği gibi lipid açil zincir esnekliğini ve lipid dinamiklerini değiştirme gücüne sahip olduğuna işaret edebilir (Barroso ve diğ., 2015, Altunayar ve diğ., 2015). Çift tabakada KOL, lipid dolgusunu etkilemektedir (Wang ve London, 2018). Bennett ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma KOL molekülü, bilayerlerde fosfolipit komşularına kabaca paralel bir şekilde hizalandığını ve KOL’un 3-β-hidroksil grubunun, sulu ara yüze yakın olan açil karbonil gruplarının yakınında bulunduğunu gösterir (Bennett ve diğ., 2018). C=O ve PO<sub>2</sub><sup>-</sup> gerilme bantlarındaki ulaştığımız veriler, LCM ve KOL’un DPPC lipidlerinin hidrofilik kısımları ile etkileşime girme eğilimini göstererek bu çalışmayı destekler niteliktedir. Ayrıca yapılan bu çalışmalarda, KOL’un lipid açil zincirleriyle etkileşime girdiğinde, daha fazla trans konformasyonları ve van der Waals etkileşimleri oluşturması nedeniyle oluşan alanın entaljik açıdan elverişli olduğunu ifade etmektedir. Zaten KOL ve LCM’nin kimyasal formülü nedeniyle bu tür gruplarla hidrojen bağı yapması beklenmektedir. LCM, 2 hidrojen bağı alıcı ve 3 verici gruba sahipken KOL, 1 hidrojen alıcı ve 1 verici gruba sahiptir. LCM ve KOL’un sahip oldukları hidrojen bağı yapabilen gruplarının bulunması nedeniyle fosfolipidlerdeki PO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve C=O grupları LCM ve KOL’un bu gruplarına bağlanacak bir alan olmuş olabilir. Daha detaylandırmak gerekirse LCM için hidrojen bağı, DPPC lipidlerinin C=O ve PO<sub>2</sub><sup>-</sup> grupları arasında ve birbirlerinin lipid gruplarından ziyade LCM’nin N-H ve O grupları veya su molekülleri ile meydana gelebilir. Bildiğimiz kadarıyla LCM’nin çözünürlüğü bilinmesine rağmen LCM’nin lipidler üzerindeki bu yeteneği daha önce bildirilmemiştir. LCM ve KOL içeren örneklerde,



C=O ve PO<sub>2</sub><sup>-</sup> gerilme bandlarının frekans değerlerinde hala azalma olsa da bu düşüşün derecesi LCM'nin kendisindeki düşüşten daha az görünüyordu. Bu LCM ve KOL arasındaki rekabetten kaynaklanmış olabilir. Özellikle KOL'un kutupsal OH grupları ve sudaki PC'lerin oksijen atomlarıyla hidrojen bağı yapacaktır. Ek olarak, LCM ve KOL arasında bir ilişki olması da muhtemeldir. Ancak, bu tür KOL etkisinin olasılığı çok düşüktür. Çünkü hidrojen bağı alıcı ve kabul eden gruplarının sayısı sırasıyla 1 ve 1'dir.

Ayrıca bahsedilen bu bantlardaki bulgulara göre KOL eklenmesi ile oluşan LCM hidrojen bağlanmalarındaki azalma LCM'nin de KOL'un de aynı bölgelere bağlanma gerçekleştirdiği için aralarında rekabet oluşturduğundan meydana geldiği söylenebilir (Yağış ve Türker-Kaya, 2018).

Biyolojik zarlarda heterojen yapıyı oluşturan moleküllerden biri de proteinlerdir (Lingwood ve Simons, 2010). Lipidlerin arasına boydan boya yerleşmiş proteinler (periferel) ile tek tabakada gömülü proteinler (integral) bulunur. İntegral ve periferel proteinler lipidlerin hidrofobik ve hidrofilik bölgelerindeki konformasyonel değişikliklerinden etkilenirler (Johnson ve Cornell, 2009, Lomize ve diğ., 2007, Agasøster ve diğ., 2003). LCM'nin biyolojik sistemlerde meydana getirebileceği değişikliklerden birisi, lipidlerin hidrofilik kısımlarında meydana getirdiği değişikliktir. Bu lipidlerin etrafındaki integral proteinlerin de yapısında değişiklik oluşturabileceği şeklinde yorumlanabilir (REF). Eğer yapısal değişikliğe uğrattığı proteinler hücrenin dışı bakan kısmında bulunan glikoprotein molekülleri ise LCM'nin dolaylı olarak hücrenin özgülüğünü değiştirebildiği söylenebilir. Ya da yapısal değişikliğe uğrattığı protein sinyal iletimi ya da madde taşınmasında görevli bir protein (Newcomer ve diğ., 1998, Escibá ve diğ., 1997) ise proteinlerin bu görevleri üzerinde olumlu ya da olumsuz etki oluşturabileceği söylenebilir. Literatürde bulunan birkaç çalışma LCM etkisinin hücre bağlantı noktalarında elektriksel bağlantıyı arttırması üzerinde durmuş olması söz konusu yorumu destekler niteliktedir (Hebeisen ve diğ., 2015, Licko ve diğ., 2013, Doty ve diğ., 2007). Bunun yanı sıra bazı proteinlerin biyolojik membranları kavisli şekillerde iskeletleme potansiyeline sahip olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur (Stachowiak ve diğ., 2012, Baumgart ve diğ., 2011, Daumke ve diğ., 2007, Antony, 2006, Shibata ve diğ., 2006, Praefcke ve McMahon, 2004, Peter ve diğ., 2004, Bremser ve

diğ., 1999). Gerçek zar sistemlerinde özelleşmiş proteinlerin zardaki lipidlere bağlanarak zar yüzeyinde kavislenmeler ile eğrilikler yarattığı bilinmektedir. Membran eğriliğinin oluşmasına katkıda bulunan bu proteinler hidrofobik ve/veya amfipatik parçalar içerdiği için membranın belirli bir derinliğine nüfus ederek etkinliğini gösterir (Campelo ve diğ., 2008). Bu bağlamda LCM'nin zar lipidlerinin konfigürasyonunda değişiklik yaratması zar proteinlerinin fosfolipidlere bağlanmalarını değiştirerek hücre zar eğriliğini de değiştirebileceği yorumu getirilebilir. Armstrong ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, KOL moleküllerinin de lipid matriksinde düzgün şekilde dağıldığını ve KOL'un lipid başına düşen alanı azalttığını ifade etmektedir (Armstrong ve diğ., 2013, Roher ve diğ., 2002). Bu da Lo fazını tercih eden KOL'un, zarda maksimum ölçüde uzamalara neden olduğunu yani Ld alanlarından daha kalın olduğunu gösterir (Lingwood ve Simons, 2010, Hurley ve diğ., 2010). Hücre zar kalınlığını ve lipidler arası bağlanmaları değiştirdiği için KOL için de zar eğriliği oluşumu üzerine etkilere meydana getirebileceği de söylenebilir.

Ayrıca lipozomlar kompozisyon değişkenliği ve yapısal özellikleri nedeniyle tıp, eczacılık, kozmetik ve gıda endüstrilerinde kullanılmaktadır (Laouini ve diğ., 2012). Toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen ilaç dağılım sistemleri olarak kullanılabilir. Özellikle hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçlar kapsülenererek hedef hücrelere gönderilebilir (Trucillo ve diğ., 2017, Laouini ve diğ., 2013). Bu çalışma bu tarz uygulamaların geliştirebilmesi için de LCM gibi ilaçların moleküler uygunluğunun tespit edilmesine önayak olabilir.

LCM gibi yeni kuşak AEİ'ler diğer ilaçlarla daha az etkileşime girecek şekilde üretilmiştir. Ve bir AEİ'den beklenen en önemli özelliklerden biri de iyi bir biyoyararlanma oranı olmasıdır. Bu sebeple bu çalışmada yapılan moleküler düzeyde araştırma LCM'nin zarlardaki etkinliğini arttırarak biyoyararlanımının arttırılması yönünde yapılacak çalışmalara da ışık tutacaktır.

Bu tarz modelleme sistemleri gerçek hücre zarlarının karmaşıklığının modüle edilmesinde de büyük önem taşımaktadır (Armstrong ve diğ., 2013, Meyer ve diğ., 2008).

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bir ilacın etkinliği, onun hücre zarlarındaki moleküler etkileşimi ile belirlenir. Bu nedenle bir ilacın geliştirilmesi ve daha işlevli hale getirilebilmesi için o ilacın hücre zarlarında yarattığı konumsal ve konformasyonel farklılıklar ortaya çıkarılmalıdır. Bu bağlamda bu çalışmada LCM'nin, DPPC lipid çeşitlerinden oluşturulmuş lipozomlardaki etkileşimine bakıldı. Üstelik memeli hücre zarlarında bol bulunan ve hücre zarlarını daha rijit hale getirerek madde giriş çıkışlarını değiştirebilen KOL molekülleri de lipozomlara eklenerek biyolojik membranlara daha yakın bir çalışma sunulmuştur. Çalışmada DSC tekniği ile KOL içeren ve içermeyen lipozomların LCM ile termotropik değişimleri incelendi. Ayrıca FT-IR ile ilaç, lipid ve KOL'un bağlanmaları üzerine detaylı araştırma yapıldı. Elde edilen bulgular sayesinde, LCM ve KOL'un membranlardaki olası etkileri moleküler düzeyde araştırıldı. Böylece LCM ve KOL'un etki mekanizması ile ilgili fayda sağlayacak bilgiler elde edildi. Buna karşın saf lipidlerden oluşmuş veziküllerde aynı  $T_m$ 'e sahip iki lipid farklı bağlanma derecesi sergileyebilir (Wang and London, 2018). Bu nedenle de daha detaylı bağlanma bilgisi ve hücre içi konumu hakkında Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Nötron Triple-axis Spektroskopisi (TAS) gibi daha spesifik incelemeler yapan biyofiziksel yöntemlerle çalışmalara devam edilmelidir.

Uzun süreli nöbetleri ve ciddi nöbetle ilişkili yaralanma ve komplikasyonların kontrolü, hastalar ve toplum için ağır bir yüküdür (Keezer, Sisodiya, & Sander, 2016). Bu nedenle, epilepsinin kesin mekanizması hakkında daha derin veya alternatif bir anlayışa sahip olmak ve bu nedenle ilaca dirençli epilepsiyi kontrol etmek için daha umut verici terapötik yaklaşımlar veya ilaç hedefleri geliştirmek için önemli derecede bir ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu yapılan çalışma, LCM gibi epileptik ilaçların hastalık tedavisindeki rolünü anlamak için yapılan çalışmalara ve ihtiyaçlara kaynak olacaktır.

## KAYNAKLAR

A. Baheerathan, W. J. Brownlee, F. Rug-Gunn, D. T. Chard, S.A., Trip Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder Related Tonic Spasms Responsive to Lacosamide. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2017, **13**, 73-74.

Abou-Khalil B., Levetiracetam in the treatment of epilepsy. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2008, **4**, 507-523.

Agasøster A.V., Halskau Ø., Fuglebakk E., Frøystein N. Å., Muga A., Holmsen H., Martínez A., The Interaction of Peripheral Proteins and Membranes Studied with  $\alpha$ -Lactalbumin and Phospholipid Bilayer of Various Composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(24), 21770-21797.

Al-Holy M.A, Lin M., Cavinato A.G., Rasco B.A., The Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Differentiate Escherichia coli O127:H7 From Other Bacteria Inoculated Into Apple Juice. *Food Microbiology*, 2006, **23**, 162-168.

Ali S.S., Zia M.K., Siddiqui T., Ahsan H., Khan F.H., Biophysical Analysis Of Interaction between Curcumin And Alpha-2-Macroglobulin. *International Journal Of Biological Macromolecules* 2019, 385-390.

Almeida R.F.M., Joly E., Crystalization Around Solid-Like Nanosized Docks Can Explain The Specificity, Diversity And Stability Of Membrane Microdomains. *Frontiers in Plant Science* 2014.

Alsop R.J., Topozini L., Marquardt D., Kučerka N., Harroun T.A., Rheinstädter M.C., Aspirin Inhibits Formation of Cholesterol Rafts in Fluid Lipid Membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 2015, **1848**, 805-812.

Altunayar C., Şahin İ., Kazancı N., A Comparative Study of The Effects of Cholesterol and Desmosterol on Zwitterionic DPPC Model Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2015, **188**, 37-45.

Antonny B., Membrane deformation by protein coats. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, **18**(4), 368-394.

Anwekar H., Patel S., Singhai A. K., Liposomes and drug carries. *International Journal of Pharmaceutical And Life Sciences* 2011, 945-951.

Armstrong L. C., Marquardt D., Dies H., Kucerka N., Yamani Z., Harroun T. A., Katsaras J., Shi A., Rheinstadter M.C., The Observation of Highly Ordered Domains in Membranes with Cholesterol. *Plos ONE*, 2013.

Bangham A.D., Liposomes: The Babraham Connection. *Chemistry And Physics Of Lipids*, 1993, 275-285.

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C., Diffusion Of Univalent Ions Across The Lamellae Of Swollen Phospholipids. *Journal Of Molecular Biology*, 1965, 238-252.

Barenholz Y., Sphingomyelin And Cholesterol: From membrane Biophysics And Rafts To Potential Medical Applications. *Membrane Dynamics And Domains*, 2004, **37**, 167-215.

Barroso R., Basso G., Costa-Filho A., Interactions of the antimalarial amodiaquine with lipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2015, **186**, 68-78.

Barron C., Prediction of Relative Tissue Proportions In Wheat Mill Streams by Fourier Transform Mid-infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 10442-10447.

Baumgart T., Capraro B.R., Zhu C., Das S.L., Thermodynamics and Mechanics of Membrane Curvature Generation and Sensing by Proteins and Lipids. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2011, **62**, 483-506.

Ben-Menachem E., Biton V., Jatuzis D., Abou-Khalil B., Doty P., Rudd G.D., Efficacy and Safety of oral Lacosamide As Adjunctive Therapy In Adults With Partial-Onset Seizures. *Epilepsia*, 2007, 1308-1317.

Bennett W.F.D., Shea J.E., Tieleman D.P., Phospholipid Chain Interactions With Cholesterol Drive Domain Formation In Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, 2018, **114**, 2595-2605.

Beyreuther B., Callizot N., Stöhr T., Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. *European Journal of Pharmacology*, 2006, **539**(1-2), 64-70.

Beyreuther B.K., Freitag J., Heers C., Krebsfänger N., Scharfenecker U., Stöhr T., Lacosamide: A Review Of Preclinical Properties. *CNS Drug Reviews*, 2007, 21-42.

Bialer M., Johannessen S. I., Kupferberg H. J., Levy R. H., Perucca E., Tomson T., Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eight Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Research*, 2007, **73**, 1-52.

Bilge D., Kazancı N., Severcan F., Acyl chain length and charge effect on Tamoxifen-lipid model membrane interactions. *Journal of Molecular Structure*, 2013, **1040**, 75-82.

Bilge D., Şahin İ., Kazancı N., Severcan F., Interactions of Tamoxifen with Distearoyl Phosphatidylcholine Multilamellar Vesicles: FTIR and DSC Studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **130**, 250-256.

Biton V., Rosenfield W.E., Whitesides J., Fountain N.B., Vaiciene N., Rudd G.D., Intravenous Lacosamide As Replacement For Oral Lacosamide In Patients With Partial-Onset Seizures. *Epilepsia* 2008, 418-424.

- Bloom M., Evans E., Mouritsen O.G., Physical Properties Of The Fluid-blayer Component Of Cell Membranes: A Perspective. *Quarterly Reviews Of Biophysics* 1991: 293-397.
- Bloom M., Mouritsen M., The Evolution Of Membranes. *Canadian Journal Of Chemistry*, 1988, 706-712.
- Bremser M., Nickel W., Schweikert M., Ravazzola M., Amherdt M., Hughes C.A., Söllner T.H., Rothman J.E., Wieland F.T., Coupling of Coat Assembly and Vesicle Budding to Packaging of Putative Cargo Receptors. *Cell*, 1999, **96**(4), 495-506.
- Briuglia M., Rotella C., McFarlane A., Lamprou D.A., Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Reserch*, 2015, **5**, 231-242.
- Bultmann T., Lin H., Wang Z., Huang C., Thermotropic and Mixing Behavior of Mixed-Chain Phosphatidylcholines with Molecular Weights Identical with That of L- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemistry*, 1991, **30**, 7194-7202.
- C. Bourgaux, P. Couvreur, Interactions of Anticancer Drugs With Biomembranes: What Can We Learn From Model Membranes. *Journal of Controlled Release*, 2014, **190**, 127-138.
- Cameron P.G., ve Charette G.M., Automation Of Fourier-transform Infrared Of Temperature Induced Phenomena. *Applied Spectroscopy*, 1981, **35**, 224-225.
- Campelo F., McMahon H.T., Kozlov M.M., The Hydrophobic Insertion Mechanism of Membrane Curvature Generation by Proteins. *Biophysical Journal*, 2008, **95**(5), 2325-2339.
- Cascales J.J.L., Otero T.F, Smith B.D., Gonzalez C., Marquez M., Model Of An Asymmetric DPPC/DPPS Membrane: Effect Of Asymmetry On The Lipid Properties. A Molecular Dynamics Simulation Study. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 2006, 2358-2363.
- Castelli F., Caruso S., Uccella N. Biomimesis of Linolenic Acid Transport Through Model Lipidic Membranes by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 851-855.
- Cawello W., Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile Of Lacosamide. *Clinical Pharmacokinetics* 2015:901-914.
- Cawello W., Stockis A., Andreas J.O., Dimova S., Advances In Epilepsy Treatment: Lacosamide Pharmacokinetic Profile. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 2014, **1329**, 18-32.
- Ceckler T.L., Cunningham B.A., Transition State Thermodynamics of Lipid Bilayers Characterized by Differential Scanning Calorimetry. *The Chemical Educator*, 1997, **2**, 1-17.
- Chiu S.W., Jakobsson E., Scott .L., Combined Monte Carlo And Molecular Dynamics Simulation Of Hydrated Lipid-Cholesterol Lipid Bilayers At Low Cholesterol Concentration. *Biophysical Journal*, 2001, **80**, 1104-1114.

Chung S., Ben-Menachem E., Sperling M.R., Rosenfeld W., Fountain N.B., Benbadis S., Hebert D., Isojärvi J., Doty P., Examining the Clinical Utility of Lacosamide. *CNS Drugs*, 2010, **24**, 1041-1054.

Chung S., Sperling M.R., Biton V., Krauss G., Hebert D., Rudd G. D., Doty P., Lacosamide as adjunctive therapy for partial-onset seizures: A Randomized controlled trial. *Epilepsia*, 2010, **51**, 958-967.

Class S.D., Dalton C.R., Hancock B.C., Differential Scanning Calorimetry: applications in drug development. *Research Focus*, 1999, 311-320.

Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta D., Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**, 6300-6308.

Daumke O., Lundmark R., Vallis Y., Martens S., Butler P.J.G., McMahon H.T., Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature*, 2007, **449**, 923-927.

Doty P., Rudd G. D., Stoehr T., Thomas D.: Lacosamide. *Neurotherapeutics*, 2007, **4**, 145-148.

Elger C.E., Rademacher M., Brandt C., Elmoufti S., Dedeken P., Eckhardt K., Tennigkeit F., Backer M., Changes in hormone and lipid levels in male patients with focal seizures when switched from carbamazepine to lacosamide as adjunctive treatment to levetiracetam: A small phase IIIb, prospective, multicenter, open-label trial. *Epilepsy&Behavior*, 2016, **62**, 1-5.

Errington A.C., Stöhr T., Heers C., Lees G., The Investigational Anticonvulsant Lacosamide Selectively Enhances Slow Inactivation of Voltage-Gated Sodium Channels. *Molecular Pharmacology*, 2008, **73**, 157-169.

Ezer N., Şahin İ., Kazancı N., Allin interacts with DMPC model membranes to modify the membrane Dynamics: FTIR and DSC Studies. *Vibrational Spectroscopy*, 2017, **89**, 1-8.

Falco-Walter J.J., Scheffer I.E., Fisher R.S., The New Definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Research*, 2018, **139**, 73-79

Fisher R.S., Acevedo C., Arzimanoglou A., Bogacz A., Cross J.H., Elger C.E., Engel J., Forsgren L., French J.A., Glynn M., Hesdorffer D.C., Lee B.I., Mathern G.W., Moshé S.L., Perucca E., Scheffer I.E., Tomson T., Watanabe M., Wiebe S. ILAE Official Report: A Practical Clinical Definition Of Epilepsy. *Epilepsia* 2014, **55**, 475-482.

Fisher S .R. ,Van Emde Boas W. ,Bluem W. ,Elger C. ,Genton P. ,Lee P. ,Engel J. 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.

G.C. Arslan, F. Severcan, The Effects Of Radioprotectant Potential Antioxidant Agent Amifostine On The Structure And Dynamics Of DPPC And DPPG Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2019, **1861**, 1240-1251.

Gardikis K., Hatziantoniou S., Viras K., Demetzos, Effect Of A Bioactive Curcumin Derivative On DPPC Membrane: A DSC And Raman Spectroscopy Study. *Thermochimica Acta*, 2006, **477**, 1-4.

Garip Ş. Ve Severcan F., Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2010, **52**, 580-588.

Gaschler M.M., Stockwell B.R., Lipid Peroxidation In Cell Death. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 2017, **15**, 419-425.

Gharib R., Auezova L., Charcosset C., Greige-Gerges H., Effect Of Series Of Essential Oil Molecules On DPPC Membrane Fluidity: A Biophysical Study. *Journal Of The Iranian Chemical Society*, 2018, **15**, 75-84.

Gharib R., Greige-Gerges H., Fourmentin S., Charcosset C., Auezova L., Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 175-186.

González H.F.J., Yengo-Kahn A., Englot D.J., Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Epilepsy. *Neurosurgery Clinics of North America*, 2019, **30**, 219-230

Griffiths P.R., Haseth J.A., *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, second edition. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2007.

Haines P.J., Reading M., Wilburn F.W., *Handbook Of Thermal Analysis And Calorimetry*, Elsevier, England, 1998.

Haines T.H., Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Progress In Lipid Research*, 2001, 299-324.

Halász P., Kälviäinen R., Mazurkiewicz-Beldzińska M., Rosenow F., Doty P., Hebert D., Sullivan T., Adjunctive lacosamide for partial-onset seizures: Efficacy and safety results from a randomized controlled trial. *Epilepsia*, 2009, **50**, 443-453.

Halling K.K., Ramstedt B., Nyström J.H., Slotte J.P., Nyholm T.K.M., Cholesterol Interactions With Fluid Phase Phospholipids: Effect On The Lateral Organization Of The Bilayer. *Biophysical Journal*, 2008, 3861-3871.

Halling K.K., Slotte J.P., Membrane Properties Of Plant Sterols In Phospholipid Bilayers As Determined By Differential Scanning Calorimetry, Resonance Energy Transfer And Detergent Induced Solubilization. *Biochimica At BioPhisica Acta (BBA)- Biomembranes*, 2004, 161-171.

Hebeisen S., Pires N., Loureiro A.I., Bonifacio M.J., Palma N., Whyment A., Spanwick D., Soares-Silva P., Eslicarbazepine and the enhancement of slow



inactivation of voltage-gated sodium channels: A comparison with carbamazepine, oxcarbazepine and lacosamide. *Neuropharmacology*, 2015, **89**,122-135.

Helmstaedter C., Witt J.A., The Longer-term Cognitive Effects Of Adjunctive Antiepileptic Treatment With Lacosamide In Comparison With Lamotrigine And Topiramate In A Naturalistic Outpatient Setting. *Epilepsy & Behavior*, 2013, **26**, 182-187.

Högberg C.J, Nikitin A.M., Lyubartsev A.P., Modification Of The CHARMM Force Field For DMPC Lipid Bilayer. *Journal Of Computational Chemistry*, 2008, 2359-2369.

Hurley J.H., Boura E., Carlson L.A., Rozycki B., Membrane Budding. *Cell*, 2010, **143**(6), 875-887.

Husain A., Chung S., Faught E., Isojarvi J., McShea C., Doty P., Long-term safety and efficacy in patients with uncontrolled partial-onset seizures treated with adjunctive lacosamide: Results from a phase III open-label extension trial. *Epilepsia*, 2012, **53**, 521-528.

Hyvönen M.T., Kovanen P.T., Molecular Dynamics Simulations Of Unsaturated Lipid Bilayer: Effects Of Varying The Numbers Of Double Bonds. *European Biophysics Journal*, 2005, 294-305.

Jacobson K., Liu P., Lagerholm B.C., The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. *Cell*, 2019, **177**(4), 806-819.

Jacop R.F. ve Mason R.P., Lipid Peroxidation Induces Cholesterol Domain Formation In Model Membranes. *Journal Of Biological Chemistry*, 2005, **280**, 39380-39387.

Jambeck J.P.M., Lyubartsev A.P., An Extension and Further Validation of an All-Atomistic Force Field For Biological Membranes. *Journal of Chemical Theory And Computation*, 2012, **8**(8), 2938-2948.

Johnson J.E., Cornell R.B., Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions. *Molecular Membrane Biology*, 2009, **16**(3), 217-235.

Jovanović A.A., Balanč B.D., Ota A., Grabnar P.A., Djordjević V.B., Šavikin K.P., Bugarski B.M., Nedović V.A., Ulrih N.P., Comparative Effects Of Cholesterol And  $\beta$ -Sitosterol On The Liposome Membrane Characteristics. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, 2018, **120**, 1-11.

K. Simons, E. Ikonen, Functional Rafts In Cell Membranes. *Nature*, 1997, **387**, 569-572.

Kalilani L., Chao L., Louis-Pierre B., Gold M., Lacosamide And Concomitant Use Of Antiepileptic And Other Medication In A US Population-A Retrospective Cohort Study. *Epilepsy&Behavior*, 2017, **72**, 51-57.

Kazancı N., Toyran N., Haris P. I., Severcan F., Vitamin D2 At High And Low Concentrations Exert Opposing Effects on Molecular Order And Dynamics of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Membranes. *Spektroskopi: An International Journal*, 2001, **15**, 47-55.

Kırkoçoğlu H., Türker-Kaya S., The investigation of the interaction of armodafinil with membrane lipids by using DPPC model Membrane System. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2019, 41-52.

Kobayashi K., Endoh F., Ohmori I., Akiyama T., Action of Antiepileptic Drugs on Neurons. *Brain and Development*, 2019.

Kodama M., Kawasaki Y., Structural Role Of Mismatched C-C Bonds In A Series Of D-erythro-spingomyelins As Studied By DSC And Electron Microscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2010, **163**, 514-523.

Konyakhina T.M., Goh S.L., Amazon J., Heberle F.A., Wu J., Feigenson G.W., Control Of A Nanoscopic-to-Macroscopic Transition: Modulated Phases In Four-Component DSPC/DOPC/POPC/Chol Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal*, 2011, **101**, L8-L10.

Kuo A.-T., Chang C.-H., Cholesterol Induced Condensing And Disordering Effects On A RigidCatanionic Bilayer: A Molecular Dynamics Study. *Langmuir*, 2014, 55-62.

Kwan P., Brodie M. J., Neuropsychological Effects of Epilepsy And Antiepileptic Drugs. *THE LANCET*, 2001, **357**(951), 216-222.

Lancman M.E., Fertig E.J., Trobliger R.W., Perrine K., Myers L., Iyengar S.S., Malik M., The Effects Of LAcosamide On Cognition, quality-of-life Measures, And Quality Of Life In Patients With Refractory PArTial Epilepsy. *Epilepsy&Behavior*, 2016, **61**, 27-33.

Lange Y., Steck T.L., Cholesterol Homeostasis And The Escape Tendency(Activity) Of Plasma Membrane Cholesterol. *Progress And Lipid Research*, 2008, **47**, 319-332.

Laouini A., Charcosset C., Fessi H., Holdich R.G., Vladislavljevic G.T., Preparation Of Liposomes: A Novel Application Of Microengineered Membranes-From Laboratory Scale To Large Scale. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, **112**, 272-278.

Laouini A., Maalej-Jaafar C., Limayem-Blouza I., Sfar S., Charcosset C., Fessi H., Preparation, Characterization And Applications of Liposomes: State of The Art. *Journal of Colloid Science And Biotechnology*, 2012, **1**, 147-168.

Larkin P.J., Infrared and Raman Spectroscopy: *Principles and Spectral Interpretation*, 2nd ed., Elsevier, United Kingdom, 2018.

Leekumjorn S., Sum A.K., Molecular Studies of The Gel to Liquid-Crystalline Phase Transition for Fully Hydrates DPPC and DPPE Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 2007, **1768**, 354-365.

Licko T., Seeger N., Zellinger C., Russmann V., Matagne A., Potschka H., Lacosamide treatment following status epilepticus attenuates neuronal cell loss and alterations in hippocampal neurogenesis in a rat electrical status epilepticus model. *Epilepsia*, 2013, **54**(7), 1176-1185.

Liguori C., Izzi F., Manfredi N., Mercur, N.B., Placidi F., Lacosamide may Improve Cognition in Patients With Focal Epilepsy: EpiTrack to Compare cognitive Side Effects Of Lacosamide and Carbamazepine. *Epilepsy&Behavior Case Reports*, 2018, 35-37.

Lin J.J., Mula M., Hermann B.P., Uncovering The Neurobehavioural Comorbidities Of Epilepsy Over The Lifespan. *THE LANCET*, 2012, 380, 1180-1192.

Lingwood D., Simons K., Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 2010, **437**(5961), 46-50.

Lioffi A, Ntountaniotis D., Kellici T.F., Chatziathanasiadou M.V., Megariotis G., Mania M., Becker-Baldus J., Kriechbaum M., Krajnc A., Christodoulou E., Glaubitz C., Rappolt M., Amenitsch H., Mali G., Theodorou D.N., Valsami G., Pitsikalis M., Iatrou H., Mavromoustakos T., Exploring the interactions of irbesartan and irbesartan-2-hydroxylpropylbeta-cyclodextrin complex with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2017, 1089-1098.

Lipowsky R., Sackmann E., Biological membranes architecture and function. *Structure and Dynamics of Membranes*, 1995, 1-64.

Lomize A.L., Pogozheva I.D., Lomize M.A., Mosberg H., The role of hydrophobic interactions in positioning of peripheral proteins in membrane. *BMC Structural Biology*, 2007, **44**(7), 1-30.

London E., How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*, 2005, **1746**, 203-220.

López-García F., Micol V., Villalain J., Gomez-Fernandez G.C.. Infrared spectroscopic studies of interaction of diacylglycerols with phosphatidylserine in the presence of calcium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*, 1993, **1169**, 264-272.

Losada-Pérez P., Khorshid M., Yongabi D., Wagner P., Effects Of Cholesterol On the Phase Behavior Of SolidSupported Lipid Vesicle Layers. *The Journal Physical Chemistry B*, 2015, 4985-4992.

Löscher W., Schmidt D., Modern Antiepileptic Drug Development Has Failed To Deliver: Ways Out Of Current Dilemma. *Epilepsia*, 2011, 657-678.

Łuszczki J.J., Third-generation Antiepileptic Drugs: mechanisms Of Action, Pharmacokinetics And Interactions. *Pharmacological Reports*, 2009, 197-216.

Marquardt D., Kučerka N., Wassall S.R., Horroun T.A., Katsaras J., Cholesterols Location In Lipid Bilayers. *Chemistry And Physics Of Lipids*, 2016, 17-25.

Martin K., Jackson C.F., Levy R.G., Cooper P.N., Ketogenic Diet and Other Dietary Treatment for Epilepsy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016

Mason R.P., Tulenko T.N., Jacob R.F., Direct Evidence For Cholesterol Crystalline Domains In Biological Membranes: Role In Human Pathobiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2003, 1610, 198-207.

Maxfield F.R., Meer van G., Cholesterol, The Central Lipid OF Mammalian Cells. *Current Opinion In Cell Biology*, 2010, 22, 422-429.

May T.W., Brandt C., Helmer R., Bien C.G., Cawello W., Comparison of Lacosamide Concentrations In Cerebrospinal Fluid and Serum In Patient With Epilepsy. *Epilepsia*, 2015, 1134-1140.

McMullen T. P.W., McElhaney R.N., Physical Studies Of Cholesterol-Phospholipid Interactions. *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 1996, 83-90

Meiron O., Gale R., Namestnic J., Bennet-Back O., Gebodh N., Esmailpour Z., Mandzhiyev V., Bikson M., Antiepileptic Effects of a Novel Non-invasive Neuromodulation Treatment in a Subject With Early-Onset Epileptic Encephalopathy: Case Report With 20 Sessions of HD-tDCS Intervention. *Frontiers in Neuroscience*, 2019.

Menczel J.D., Prime R.B., *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2014.

Meyer F., Smit B., Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *PNAS*, 2009, **106**(10), 3654-3658.

Miao N., Nielsen M., TheWalt J., Ipsen J.H., Bloom M., Zuckermann M.J., Mouritsen O.G., From Lanosterol ToCholesterol: Structural Evolution And Differential Effects On Lipid Bilayers. *BioPhysical Journal*, 2002, 1429-1444.

Mietke H., Beer W., Schleif J., Schabert G., Reissbrodt R., Differentiation Between Probiotic And Wild-type Bacillus cereus Isolates By Antibiotic Susceptibility Test and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). *International Journal of Food Microbiology*, 2010, **140**, 57-60.

Mignolet A., Derenne A., Smolina M., Wood B.R. Goormaghtigh E., FTIR spectral signature of anticancer drug. Can drug mode of action be identified? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2016, **1864**, 85-101.

Moavero R., Santarone M.E., Galasso C., Curatolo P., Cognitive and behavioral effects of new antiepileptic drugs in pediatric epilepsy. *Brain and Development* 2017, **39**, 464-469.

Mula M., Sander J.W., Negative Effects of Antiepileptic Drugs on Mood in Patients with Epilepsy. *Drug Safety*, 2007, **30**(7), 555-567.

Müller D.J., Wu N., Palczewski K., Vertebrate Membrane Proteins: Structure, Function, And Insights From Biophysical Approaches. *Pharmacological Reviews*, 2008, 43-78.

Nazeer S. S., Sreedhar H., Varma V. K., Martinez-Marin D., Massie C., Walsh M. J., Infrared Spectroscopic Imaging: Label-free Biochemical Analysis of Stroma And Tissue Fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2017, **92**, 14-17.

Neal A., D'Sozua W., Hepworth G., Lawn N., Cook M., Nikpour A., Efficacy and tolerability of adjuvant lacosamide: The role of clinical characteristics and mechanisms of action of concomitant AEDs. *Epilepsy & Behavior* 2018, **80**, 25-32.

Newcomer M.E., Jamison R.S., Ong D.E., Structure and Function of Retinoid-Binding Proteins. *Subcellular Biochemistry*, 1998, **34**, 53-80.

Nitsche M.A., Paulus W., Noninvasive Brain Stimulation Protocols in The Treatment of Epilepsy: Current State And Perspectives. *Neurotherapeutics*, 2009, **6**, 244-250.

Novy J., Bartolini E., Bell G.S., Duncan J.S., Sander J.W., Long-term Retention of Lacosamide in A Large Cohort of People With Medically Refractory Epilepsy: A Single Center Evaluation. *Epilepsy Research*, 2013, 250-256.

Ortinski P., Meador K.J., Cognitive Side Effects Of Antiepileptic Drugs. *Epilepsy & Behavior*, 2004, **5**(1), 60-65.

P. Alpert, The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, **45**, 685-695.

Parisi P., Moavero R., Verrotti A., Curatolo P., Attention Deficit Hyperactivity Disorder In Children With Epilepsy. *Brain And Development*, 2010, **32**, 10-16.

Perucca E., French J., Bialer M., Development Of New Antiepileptic Drugs: Challenges, Incentives, And Recent Advances. *The Lancet Neurology*, 2007, 793-804.

Peter B.J., Kent H.M., Mills I.G., Vallis Y., Butler J.G., Evans P.R., McMahon H.T., BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science*, 2004, **303**(5657), 495-499.

Pluhackova K., Kirsch S.A., Han J., Sun L., Zhenyan J., Unruh T., Böckmann R.A., A Critical Comparison Of Biomembrane Force Field: Structure And Dynamics Of Model DMPC, POPC and POPE Bilayers. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 2016, 3888-3903.

Pluhackova K., Wassenaar T.A., Kirsch S., Böckmann R.A., Spontaneous Adsorption Of Coiled-Coil Model Peptides K And E To A Mixed Lipid Bilayer. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 2015, 4396-4408.

- Praefcke G.J.K., McMahon H.T., The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, **5**, 133-147.
- Quinn P.J., Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry. *Phospholipid Metabolism In Apoptosis*, 2002, **36**, 39-60.
- Raffie S., Teissie J., Control Of Lipid Membrane Stability By Cholesterol Content. *Biophysical Journal*, 1999, 2072-2080.
- Ramstedt B., Slotte J.P., Membrane Properties Of Sphingomyelins. *Febs Letters*, 2002, 33-37.
- Reimers A., Brodtkorb E., Second-generation Antiepileptic Drugs And Pregnancy: A Guide For Clinicians. *Expert Review Of Neurotherapeutics*, 2012, 707-717.
- Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M., Ordering Effect Of Cholesterol And Its Analogues. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2009, 97-121.
- Roher A.E., Weiss N., Kokjohn T.A., Kuo Y., Kalback W., Anthony J., Watson D., Luehrs D.C., Sue L., Walker D., Emmerling M., Goux W., Beach T., Increased A $\beta$  Peptides and Reduced Cholesterol and Myelin Proteins Characterize White Matter Degeneration in Alzheimer's Disease. *Biochemistry*, 2002, **41**(37), 11080-11090.
- Rongen H., Bult A., Van Bennekom W.P., Liposomes And Immunoassays. *Journal Of Immunological Methods*, 1997, 105-133.
- Rosenfeld W., Fountain N.B. Kaubry G., Ben-Menachem E., McShea C., Isojarvi J., Doty P., Safety And Efficacy Of Adjunctive Lacosamide Among Patient With Partial-Onset Seizures In A Long-Term Open-Label Extension Trial Of Up To 8 Years. *Epilepsy&Behavior*, 2014, 164-170.
- Rosetti C.M., Mangiarotti A., Wilke N., Sizes Of Lipid Domains: What Do We Know From Artificial Lipid Membranes? What Are The Possible Shared Features With Membranes Rafts In Cell? *Biochimica Et Biophysica Acta Biomembranes*, 2017, **1859**, 798-802.
- Santulli L., Coppola A., Balestrini S., Striano S., The Challenges of Treating Epilepsy with 25 Antiepileptic Drugs. *Pharmacological Research*, 2016, **107**, 211-219.
- Scheffer I.E., Berkovic S., Capovilla Giuseppe, Connolly M.B., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Mathern G.W., Moshé S.L., Nordli D.R., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y., Zuberi S.M., ILAE Classification Of The Epilepsies: Position Paper Of The ILAE Commission For Classification and Terminology. *Epilepsia*, 2017, **58**, 512-521.
- Schmidt D., Schachter S.C., Drug Treatment of Epilepsy in Adults. *State of The Art*, 2014, **348**, 1-18.

Self-Medlin Y., Byun J., Jacob R.F., Mizuno Y., Mason R.P., Glucose Promotes Membrane Cholesterol Crystalline Domain Formation By Lipid Peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2009, **1788**, 1398-1403.

Severcan F., Kazanci N., Baykal Ü., Süzer Ş., IR And Turbidity Studies Of Vitamin-E Cholesterol –Phospholipid Membrane Interactions. *Bioscience Reports*, 1995, **15**, 221-229.

Shestivska V., Olšinová M., Sovová K., Kubišta J., Smith D., Cebecauer M., Španěl P., Evaluation Of Lipid Peroxidation By The Analysis Of Volatile Aldehydes In The Headspace Of Synthetic Membranes Using Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 2018, **32**, 1617-1628.

Shibata Y., Voeltz G.K., Rapoport T. A., Rough Sheets and Smooth Tubules. *Cell*, 2006, **126**(3), 435-439.

Shivanoor S.M., David M., Reversal of Deltamethrin-induced Oxidative Damage In Rat Neural Tissues by turmeric-diet: Fourier transform-infrared And Biochemical Investigation. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2016, **77**, 55-68.

Singh K. P., Verma N., Teratogenic Potential of Third-generation Antiepileptic Drugs: Current Status and Research Needs. *Pharmacological Reports*, 2019, **71**, 491-502.

Sonne J., Jensen M.Ø., Hansen F.Y., Hemmingsen L., Peters G.H., Reparameterization Of All-Atom Dipalmitoylphosphatidylcholine Lipid Parameters Enables Simulation Of Fluid Bilayers At Zero Tension. *Biophysical Journal*, 2007, 4157-4167.

Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A., Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 2006, **17**(1), 1R-13R.

Stachowiak J.C., Schmid E.M., Ryan C.J., Ann H.S., Sasaki D.Y., Sherman M.B., Geissler P.L., Fletcher D.A., Hayden C.C., Membrane bending by protein-protein crowding. *Nature Cell Biology*, 2012, **14**, 944-949.

Stevens M.J., Complementary Matching In Domain Formation Within Lipid Bilayers. *Journal Of The American Chemical Society*, 2005, **127**, 15330-15331.

Stillwell William, *An Introduction To Biological Membranes Composition, Structure And Function*, 2nd ed., United Kingdom, 2016.

Stöhr T., Krause E., Selve N., Lacosamide Displays Potent Antinociceptive Effects In Animal Models For Inflammatory Pain. *European Journal Of Pain*, 2006, 241-249.

Stöhr T., Kupferberg H.J., Stables J.P., Choi D., Harris R.H., Kohn H., Walton N., White H.S., Lacosamide, a novel anti-convulsant drug, shows efficacy with a wide safety margin in rodent models for epilepsy. *Epilepsy Research*, 2007, 147-154.

Svalheim S., Sveberg L., Mochol M., Tauboll E., Interactions between Antiepileptic Drugs And Hormones. *Seizure*, 2015, **28**, 12-17.

The Influence Of Cholesterol On Fast Dynamics Inside OF Vesicle And Planar Phospholipids Blayers Measured With 2D IR Spectroscopy. *The Journal Physical Chemistry B*, 2015, 8852-8862.

Toyran N., Severcan F., Interaction between vitamin D2 and Magnesium In Liposomes: Differantial Scanning Calorimetry And FTIR Spectroscopy Studies. *Journal Of Molecular Structure*, 2007, 19-27.

Trucillo P., Campardelli R., Reverchon E., Supercritical CO2 Assisted Liposomes Formation: Optimization Of The Lipidic Layer For An Effecient Hydrophilic Drug Loading. *Journal Of CO2 Utilization*, 2017, **18**, 181-188.

Türker S., Wassall S., Stillwell W., Severcan F., Convulsant Agent Pentylene-tetrazol Does Not Alter The Structural And Dynamical Properties of Dipalmitoylphosphatidylcholine Model Membranes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, **54**, 379-386.

Ulmschneider J.P., Ulmschneider M.B., United Atom Lipid Parameters For Combination With The Optimized Potentials For Liquid Simulations All-Atom Force Field. *Journal Of Chemical Theory And Computation*, 2009, 1803-1813.

Verrotti A., Moavero R., Panzarino G., Paolantonio C.D., Rizzo R., Curatolo P., The Challenge Of Pharmacotherapy In Children And Adolescents With Epilepsy-ADHD Comorbidity. *Clinical Drug Investigation*, 2018, **38**, 1-8.

Wang Q., London E., Lipid Structure And Composition Control Consequences Of Interleaflet Coupling In Asymmetric Vesicles. *Biophysical Journal*, 2018, **115**, 664-678.

Wang Y., Chen Z., An Update for Epilepsy Reserch And Antiepileptic Drug Development: Toward Precise Circuit Therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 2019, **201**, 77-93.

Whaley-Mayda L., Penwell S.M., Tokmakoff A., Fluorescence-Encoded Infrared Spectroscopy: Ultrafast Vibrational Spectroscopy On Small Ensembles Of Molecules In Solution. *The Journal Of Physical Chemistry Letters*, 2019, 1962-1972

Williamson J.J., Olmsted P.D., Registered And Antiregistered Phase Separation Of Mixed Amphiphilic Bilayers. *Biophysical Journal*, 2015, **108**, 1963-1976.

Y. Shi, M. Cai, L. Zhou, H. Wang, The structure and function of cell membranes studies by atomic force microscopy. *Seminars in cell & Devalopmental Biology*, 2018, **73**, 31-44.

Yeagle P.L., The Structure of Biological Membranes, 3rd ed. Focuses on lipids, CRC Press, New York, 2011.



Yuen A.W.C., Keezer M.R., Sander J.W., Epilepsy is a Neurological and Systemic Disorder, *Epilepsy & Behavior*, 2018, **78**, 57-61.

Zalba S., Hagen T.L.M., Cell Membrane Modulation As Adjuvant In Cancer Therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 2017, **52**, 48-57.

Zoumpoulou G., Papadimitriou K., Polissiou M.G., Tarantilis P.A., Tsakalidou E., Detection of Changes In The Cellular Composition of Salmonella enterica Serovar Typhimurium In The Presence of Antimicrobial compound(s) of Lactobacillus Strains Using Fourier Transform Infrared Spektroskopy. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, **144**, 202-207.



## **KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER**

**Yağış B.**, Türker-Kaya S., Binding Ability Of Lacosamide To Phosphotidylcholine Lipids With Cholesterol Effects. *Medeniyet Medical Journal*, 2018, **33**, 218-226.

**Yağış B.**, Türker-KAYA S., Antiepileptik İlaç Lakosamid'in Fosfatidilkolin Lipidleri ile Etkileşmesi ve Kolesterolün Etkisi. *International Eurasian Conference On Biological And Chemical Sciences (EurasianBioChem)*, Ankara, 2018.



## ÖZGEÇMİŞ

Yüksek lisans çalışmasını yapan Burçin YAĞIŞ, 1993 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbulda tamamladı. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı zamanda 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde pedagojik formasyon eğitimini bitirdi. 2018 yılında Analiz Özel Öğretim Kursu'na Biyoloji öğretmeni olarak girdi. Halen bu görevine devam etmektedir.

