

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**WAG/Rij SIÇANLARDA NEONATAL DÖNEMDE
UYGULANAN KAFEİNİN HİPOKAMPUS VE SEREBELLUM
BÖLGELERİNDEKİ BİYOFİZİKSEL ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DİDEM ŞENTÜRK

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

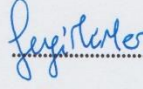
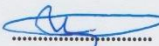

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

WAG/Rij SIÇANLARDA NEONATAL DÖNEMDE
UYGULANAN KAFEİNİN HİPOKAMPUS VE SEREBELLUM
BÖLGELERİNDEKİ BİYOFİZİKSEL ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

DİDEM ŞENTÜRK

Dr. Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA
Danışman, Kocaeli Üniv.
Doç. Dr. Özlem AKSOY
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.
Dr. Öğr. Üyesi İlknur DURSUN
Jüri Üyesi, Altınbaş Üniv.

Tezin Savunulduğu Tarih: 30.12.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, neonatal dönemde kafein uygulamasının Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) sıçanların hipokampus ve serebellum beyin bölgelerinde meydana getirdiği moleküler değişiklikleri karşılaştırmalı olarak Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi yöntemiyle incelendi.

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında bilgi, tecrübe ve fedakârlıklarıyla bana büyük destek veren değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA' ya sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda kullandığım sıçan beyin dokularını sağlayan Sayın Doç. Dr. Gül İLBAY hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışma süreci boyunca her zaman desteklerini hissettiğim ve yanımda olan, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım DİLAN YILDIRIM'a ve Kübra DAĞCI' ya teşekkür ederim.

Tüm desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim ve bu çalışmayı bitirmem konusunda manevi gücünü hissettirdiği için canım aileme yürekten teşekkür ederim. Her konuda destek veren ve yanımda olan, tüm hayatım boyunca emeklerini esirgemeyen sevgili annem GÜLHAN ŞENTÜRK'e, sevgili babam ALİ ŞENTÜRK'e, varlıklarıyla bana güç veren canım ablam İLKNUR DEMİRTAŞ'a, canım kardeşim GÜLÇİN ŞENTÜRK'e, canım yeğenlerim NEHİR ve IRMAK DEMİRTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Aralık-2019

Didem ŞENTÜRK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ	1
1.GENEL BİLGİLER	3
1.1. Epilepsi.....	3
1.1.1. Absans epilepsi.....	6
1.2. Hayvan Modelleri.....	8
1.2.1. Absans epileptojenez modeli olarak WAG/Rij sıçanlar.....	9
1.3. Kafein.....	10
1.3.1. Kafeinin yapısı	10
1.3.2. Adenozin reseptörünün yapısı	11
1.3.3. Kafeinin hücrel etki mekanizması.....	12
1.3.4. Kafein metabolizması.....	13
1.3.5. Kafeinin etkileri.....	14
1.4. Hipokampus	16
1.4.1. Hipokampusun fonksiyonları	18
1.5. Serebellum.....	20
1.5.1. Serebellumun fonksiyonları	21
1.6. Spektroskopinin Temelleri	23
1.6.1. Kızılötesi (IR) spektroskopisi.....	24
1.6.2. Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi	26
1.6.3. FT-IR spektroskopisinin avantajları ve uygulamaları	27
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
2.1. Hayvan Deneyleri.....	29
2.2. FT-IR Spektroskopisi Deneyleri	29
2.3. Bradford Analizi.....	30
2.4. TBARs Testi.....	31
2.5. Analiz	32
2.5.1. FT-IR spektral analiz.....	32
2.5.2. Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA).....	32
2.5.3. İstatistiksel analiz	33
3. BULGULAR	34
3.1. FT-IR Spektroskopisi Bulguları	34
3.1.1. 3050-2800 cm ⁻¹ frekans aralığı.....	35
3.1.2. 1800-900 cm ⁻¹ frekans aralığı.....	40
3.2. Biyokimyasal Testler.....	47
3.2.1. Bradford testi.....	47
3.2.2. TBARs testi	48

3.3. HCA Analizi.....	49
4. TARTIŞMA	50
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	77
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	82
ÖZGEÇMİŞ	83



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Epilepsi sınıflandırılması	5
Şekil 1.2. Epileptik nöbetlerin klinik ve EEG sınıflandırması, (ILAE 1981).....	5
Şekil 1.3. Kafein molekülünün yapısı	11
Şekil 1.4. Adenozin molekülünün yapısı	11
Şekil 1.5. Beyindeki adenozin reseptörlerin dağılımı	12
Şekil 1.6. Kafein molekülünün metabolitleri	13
Şekil 1.7. Hipokampusun denizati ile benzerliği	16
Şekil 1.8. Hipokampusun şekli ve konumu.....	17
Şekil 1.9. Hipokampusun bölümleri	17
Şekil 1.10. Serebellumun konumu ve şekli.....	20
Şekil 1.11. Serebellumun bölümleri.....	21
Şekil 1.12. Elektromanyetik spektrum.....	23
Şekil 3.1. WAG/Rij Sıçan beyin bölgelerinden hipokampus ve serebellum örneklerinden elde edilen FT-IR spektrumu	34
Şekil 3.2. 3050-2800 cm^{-1} bölgeleri arasında WAG/Rij sıçanların kontrol ve kafein gruplarının hipokampus ve serebellum gruplarına ait FT-IR spektrumları.....	36
Şekil 3.3. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının olefinik=CH gerilme bant alan (A) ve olefinik/lipit alan (B) oran değerleri.....	37
Şekil 3.4. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının CH_2 asimetrik frekansı (A) ve simetrik frekansı (B)değerleri	38
Şekil 3.5. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının CH_2 asimetrik(A) ve simetrik(B) bant genişliği değerleri	39
Şekil 3.6. Kontrol ile kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarına ait CH_2 asimetrik (A) ve simetrik (B) bant alan değerleri.....	40
Şekil 3.7. 1800-900 cm^{-1} bölgeleri arasında WAG/Rij sıçanların kontrol ve kafein gruplarının hipokampus ve serebellum gruplarına ait FT-IR spektrumları.....	41
Şekil 3.8. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının C=O frekans(A) ve C=O bant alan(B) değerleri.....	42
Şekil 3.9. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının C=O/Lipit bant alan oran değerleri	43
Şekil 3.10. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının Amid I (A) ve Amid II(B) bant alan değerleri.....	44
Şekil 3.11. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının lipit/protein alan oran değerleri	45
Şekil 3.12. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının PO_2 asimetrik(A) ve simetrik(B) frekans değerleri	46

Şekil 3.13. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının PO_2 asimetrik(A) ve simetrik(B) bant alan değerleri	47
Şekil 3.14. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarına ait protein miktarları	48
Şekil 3.15. Kontrol ile kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarına ait MDA miktarı	48
Şekil 3.16. $1700-1610\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığındaki kontrol ve kafein hipokampus ve serebellum gruplarına ait HCA dendogramı.....	49
Şekil B.1. Bradford standart eğri grafiği.....	79
Şekil C.1. TBARs standart eğri grafiği	80
Şekil D.1. Hayvan deneyleri etik kurul belgesi	81



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Absans nöbetleriyle ilişkili epilepsi sendromları.....	8
Tablo 1.2. IR spektrum bölgeleri	25
Tablo 2.1. Standart eğri hazırlanmasında kullanılan BSA konsantrasyonları	30
Tablo 2.2. Standart eğri hazırlanmasında kullanılan MDA konsantrasyonları.....	31
Tablo 3.1. Literatüre dayalı sıçan hipokampus ve serebellum FT-IR spektrumlarındaki ortalama bant frekansları ve bantların tanımlanması	35
Tablo A.1. Kontrol hipokampus ile serebellum ve kafein uygulanan hipokampus ile serebellum gruplarının spektral parametre değerleri	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

E	: Enerji, (Joule)
Λ	: Dalga boyu, (Nanometre)
Vvib	: Vibrasyonel frekans, (Hertz)
ΔE	: İlgilenilen enerji seviyeleri arasındaki fark, (Kj/K mol)
c	: Işık hızı, (metre/saniye)
h	: Planck sabiti, (joule/saniye)
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram

Kısaltmalar

AE	: Absans Epilepsi
AEİ	: Antiepileptik İlaç
AR	: Adenozin Reseptör
BSA	: Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümin)
CA	: Cornu Ammonis
CAE	: Çocukluk Çağı Absans Epilepsi
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
EEG	: Elektroensefalografik
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi)
GABA	: Gama – aminobütirik asit
ILEA	: International League Against Epilepsy (Uluslararası Epilepsi Ligi)
JTK	: Jeneralize Tonik Klonik
LA	: Lateral Çekirdek
MDA	: Malondialdehit
SWD	: Spike-Wave Discharges (Ani Diken-Dalga Deşarj)
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TBARs	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TLE	: Temporal Lob Epilepsisi
WAG/Rij	: Wistar Albino Glaxo from Rijswijk

WAG/Rij SIÇANLARDA NEONATAL DÖNEMDE UYGULANAN KAFEİNİN HİPOKAMPUS VE SEREBELLUM BÖLGELERİNDEKİ BİYOFİZİKSEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Dünyada en çok tüketilen psikoaktif maddelerden biri olan kafeinin (1,3,7-trimetilksantin) uyanıklık, dikkat ve hafıza gibi nörolojik işlevleri değiştirdiği bilinmektedir. Bilinen bu etkilerinin yanı sıra neonatal dönemde kafein alınımının ileride epileptik nöbet ve epilepsi oluşumuna neden olabildiğini destekleyen çalışmalar bulunsa da bu etkilerin altında yatan mekanizmalar açıklığa kavuşturulamamıştır. Konuya katkı sağlamak amacıyla çalışmamızda neonatal dönemde (7-11. Günler arası) yüksek doz (20 mg/kg) kafein uygulamasının absans epilepsi modeli olan WAG/Rij sıçanların hipokampus ve serebellum beyin bölgelerinde meydana getirdiği biyofiziksel değişiklikler FT-IR spektroskopisi yöntemiyle incelendi. Ayrıca çalışmaya bazı biyokimyasal testler dahil edildi. Elde edilen spektroskopik bulgulara göre kafeinin olefinik bant alanında, olefinik/lipit oranında ve MDA seviyesinde hipokampusta artmaya serebellumda azalmaya neden olması lipit peroksidasyon ürünlerinde ve doymamış lipit miktarlarındaki farklılıkları ortaya koydu. CH₂ asimetric ve simetric bant genişlik değerleri, kafein gruplarında hipokampusta membran akışkanlığında azalmayı, serebellumda artmayı gösterdi. İlaveten, aynı bantların alan değerlerinin her iki beyin bölgesinde artması yüksek seviyede doymuş lipitleri işaret etti. Proteinden kaynaklı Amid I ve II bant alanlarının analizleri ve Bradford testi sonuçları ile hipokampusta protein miktarında artma, serebellumda ise kafein etkisiyle azalma bilgisini verdi. Ayrıca C=O, PO₂ asimetric ve simetric frekanslarının hipokampus ve serebellumda farklılık göstermesi kafein uygulamasının membran lipitlerinin paketlenmesini değiştirdiği sonucunu verdi. Ayrıca, spektral parametrelere dayalı olarak uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi ile kafein uygulanmış ve uygulanmamış tüm grupların ayrımı başarılı bir şekilde elde edildi. Tüm bu sonuçlar neonatal dönemde uygulanan kafeinin hipokampus ve serebellum bölgelerinde farklı biyofiziksel etkilere neden olduğu bulgusunu verdi. Biyofiziksel parametrelerdeki farklılıklar kafeinin epileptik nöbetleri tetikleyici ya da inhibe edici etkilerinin yansımaları olabilir.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, FT-IR, Hipokampus, Kafein, Serebellum.

INVESTIGATION OF BIOPHYSICAL EFFECTS OF CAFFEINE ADMINISTRATION DURING NEONATAL PERIOD IN HIPPOCAMPUS AND CEREBELLUM BRAIN REGIONS OF WAG/Rij RATS BY FT-IR SPECTROSCOPY

ABSTRACT

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), one of the most consumed psychoactive substances in the world, is known to alter neurological functions such as alertness, attention and memory. In addition to these known effects, caffeine intake in the neonatal period may cause epileptic seizures and epilepsy in the future, but the mechanisms underlying these effects have not been clarified. To contribute to the subject, the biophysical effects of 20 mg/kg doses caffeine administration during neonatal period (7-11.Days) on hippocampus and cerebellum of WAG/Rij rats, which is a model of absence epilepsy were investigated by FT-IR spectroscopy. According to the obtained spectroscopic findings, caffeine caused an increment in olefinic band area, olefinic/lipid ratio and MDA level in hippocampus but a decrement in cerebellum. The CH₂ asymmetric and symmetric bandwidth values showed a decrease in membrane fluidity in hippocampus whilst an increase in cerebellum in caffeine groups. Moreover, based on the analysis of the areas of Amid I and II modes attributed to protein and Bradford test results an increment in hippocampus but a decrease in cerebellum. Furthermore, variations in the C=O, the PO₂ asymmetric and symmetric frequencies in different brain regions showed the application of caffeine changed the packaging of membrane lipids. Moreover, hierarchical clustering analysis based on spectral parameters successfully discriminated caffeine treated and untreated groups. All these results reveal that caffeine applied in neonatal period caused different biophysical effects in hippocampus and cerebellum regions. Such variations in biophysical parameters may reflect the triggering or inhibiting effects of caffeine on epileptic seizures.

Keywords: Epilepsy, FT-IR, Caffeine, Hippocampus, Cerebellum.

GİRİŞ

Epilepsi, dünya genelinde 70 milyondan fazla insanı etkileyen en yaygın ciddi beyin hastalıklarından biridir. İnsidansı bebeklerde ve daha büyük yaş gruplarında en yüksek risk taşıyan iki modlu bir dağılıma sahiptir. Epilepsi, tek bir ekspresyon ve nedeni olan bir durumdan ziyade çoklu risk faktörleri ve güçlü bir genetik yatkınlık içeren bir semptom kompleksidir (Thijs ve diğ., 2016).

Absans Epilepsi (AE), aktivitenin değerlendirilmesine eşlik eden ve geçici bir bilinç değişikliği ile ilişkili genel konvülsif olmayan nöbetler ile karakterize özel bir epileptik sendromdur (Depaulis ve Charpier., 2018). WAG/Rij sıçanları, patofizyolojik ve farmakolojik çalışmalar açısından, absans epilepsinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir genetik hayvan modelidir (Russo ve diğ., 2016).

Dünyada en çok tüketilen psikoaktif maddelerden biri olan kafeinin uyanıklık, dikkat ve hafıza gibi nörolojik işlevleri değiştirdiği bilinmektedir. Bilinen merkezi sinir sistemi uyarıcısı etkilerinin yanı sıra kafein özellikle prematüre apnesinin tedavisinde en sık kullanılan kimyasaldır. Etkileri, mekanik olarak havalandırılmış preterm bebeklerde apne, aralıklı hipoksemi ve ekstübasyon başarısızlığının sıklığını azaltmada iyi bir şekilde belirlenmiştir. Ayrıca, bronkopulmoner displazi ve patent duktus arteriozus insidansının azaltılmasında ilave kısa vadeli faydaları da kanıtlanmıştır (Abdel-Hady ve diğ., 2015; Dobson ve diğ., 2014; Abu Jawdeh ve diğ., 2013; Schmidt ve diğ., 2006). Adı geçen kullanımlarının yanı sıra neonatal dönemde kafein alınınının ileride epileptik nöbet ve epilepsi oluşumuna neden olabildiğini destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Fakat bu etkilerin altında yatan mekanizmalar açıklığa kavuşturulamamıştır (Borges-Mantin ve diğ., 2019).

Konuya biyofiziksel yaklaşım getirmek amacı ile çalışmada neonatal dönemde kafein uygulamasının Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) sıçanların hipokampus ve serebellum beyin bölgelerinde meydana getirdiği moleküler değişiklikleri karşılaştırmalı olarak Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR)

Spektroskopisi yöntemiyle incelendi. Elde edilen verilerle kafeinin hipokampus ve serebellum beyin bölgeleri üzerindeki etkileri; protein miktarı, lipit düzeni ve akışkanlığı gibi parametreler araştırıldı. Ayrıca Bradford testinde, protein miktarı ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARs) testi ile de lipit peroksidasyon ürünü olan malondealdehit (MDA) miktarındaki değişimler araştırıldı.



1.GENEL BİLGİLER

1.1. Epilepsi

Epilepsi, beyindeki anormal aşırı veya tekrarlayan nöronal aktivite sonucu oluşan nöbetler ve bu nöbetlere eşlik eden geçici ya da kalıcı semptomlara verilen addır. Epilepsi nörobiyolojik, kognitif, psikolojik ve sosyal sonuçları ile nöbet oluşturmaya kalıcı bir yatkınlık ile karakterizedir. Bu hastalığın tanımının yapılabilmesi için en az bir epileptik nöbetin ortaya çıkmasını gerekmektedir. Epileptogenezis, beklenmedik nöbetlerin oluşmasına neden olan moleküler ve hücrel değişiklikleri ile sonuçlanan beyin hasarı sürecini ifade etmektedir. Nöbetler epilepsinin karakteristiği olan devamlı tekrarlayan nöbetli hastalıklardan kaynaklanabilmekle birlikte; hipoglisemi, hiponatremi ve normal beyin metabolizmasındaki benzer geçici değişikliklere bağlı da nöbetler oluşabilirler (Brissart ve diğ., 2018; Malkan ve diğ., 2014; Fisher ve diğ., 2004).

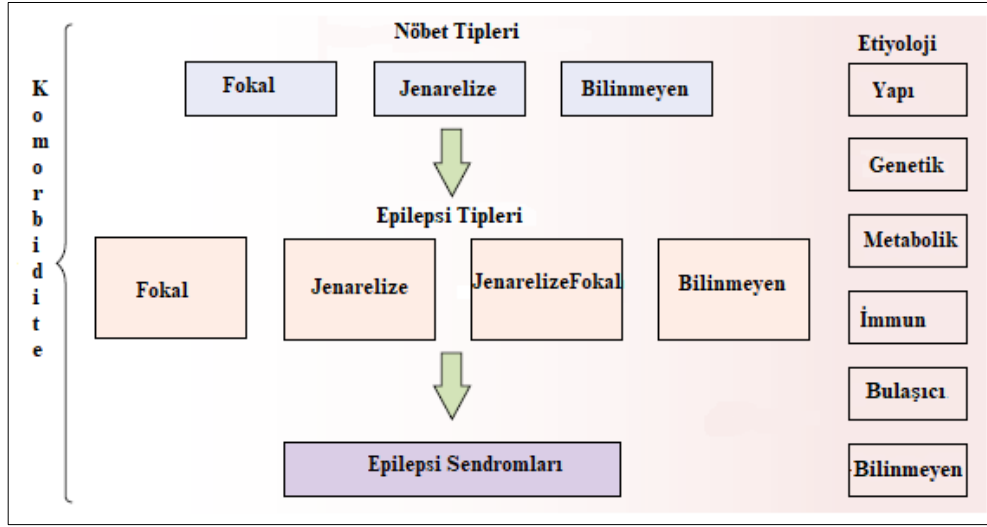
Beynin en sık görülen nörolojik hastalıklarından biri olan epilepsi, dünya çapında yaklaşık 70 milyon kişiyi etkilemektedir (Ngugi ve diğ., 2010). Herhangi bir bireyde yaşam boyu epilepsinin görülme riski %3 - %5 arasındadır. Genel popülasyonda % 0,5-2 prevalansı olan epilepsi vakaların yaklaşık üçte ikisinde, hastalığın başlangıcı çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıkar. Yaşamın ilk yıllarında epilepsi hastalığı maksimum oranda (100.000'de 100-233) görülür. Bu oran, çocukluğun erken döneminde düşerek (100.000'de 60), gençlik ve yetişkinlik dönemlerinde minimum orana ulaşarak (100.000'de 30-40), yaşlılık döneminde tekrar artar (Aronica ve diğ., 2018).

Epileptogenez, pek çok hastanın bilinmeyen bir nedeni olmasına rağmen, patogenetik bir olay ("epileptojenik bir hareket") veya genetik bir değişiklik tarafından başlatılır. Epileptogenezden sorumlu hücrel mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Tüm epilepsi nöbetlerinde aynı mekanizmadan söz edilmemekle birlikte hepsinde artmış ve tekrarlayan nöronal uyarılabilirlik gibi ortak özellikler

mevcuttur (Devinsky ve diğ., 2018). Epilepsi spontan nöbetlerin sıklığı ve şiddeti, hayvan modellerinde ve insanlarda yıllarca antiepileptojenik tedavi yaklaşımlara geliştirilmesinde terapötik hedefler için geniş bir araştırma olanağı sağlar (Pitkanen ve diğ., 2015; Dudek ve diğ., 2011).

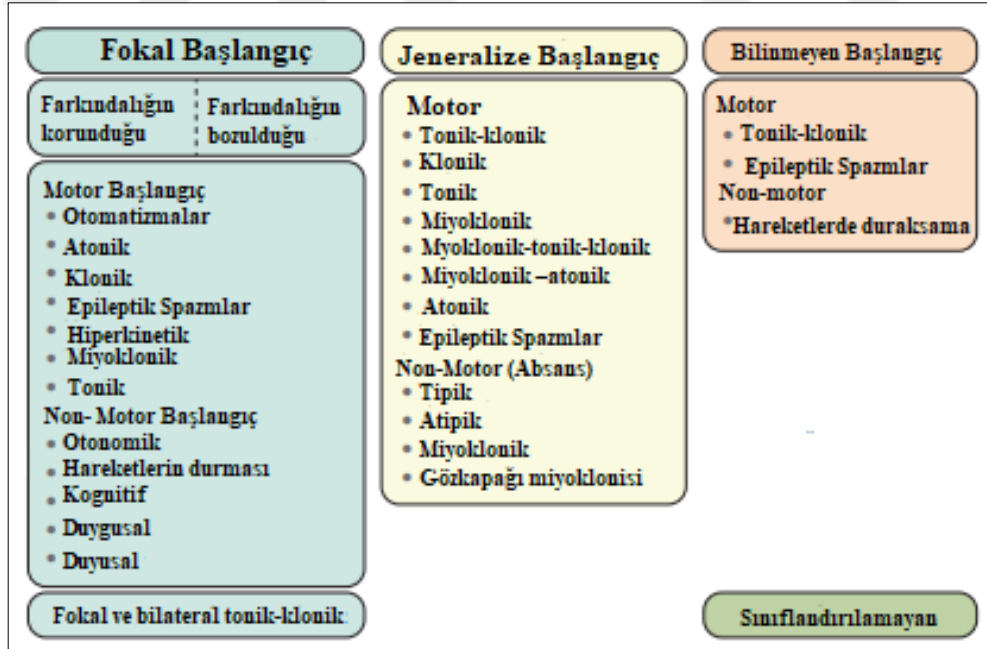
Antiepileptik ilaçlar (AEİ), epilepsi hastalarının çoğunda tedavinin temelidir ve nöbetleri ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. 1990'lı yılların başında yeni AEİ'lerin kullanıma girmesiyle tedavi seçenekleri artmıştır. Epilepsi tedavisinin hedefleri üç seviyede belirlenmiştir. Nöbet kontrolü, epilepsi kontrolü ve epileptogenez sürecinin tersine çevrilmesidir. Nöbet kontrolü AEİ'nin etkinliği ve nöbetlerde sıklık ve/veya şiddetinde azalma anlamına gelmektedir. Epilepsi kontrolü ise nöbet kontrolünün de ötesinde AEİ etkinliğini göstermektedir. Epileptogenezin tersine çevrilmesi ise günümüzde medikal tedavi ile sağlanamamakta ancak belirli olgularda cerrahi tedavi ile sağlanabilmektedir (Steinhoff ve diğ., 2003). Epilepsi hastaların yaklaşık %70'i antiepileptik ilaçlarla farmakolojik olarak kontrol edilebilir. Hastaların geriye kalan %30'u farmakolojik tedaviye dirençlidir ve önemli bir terapötik zorluk ortaya çıkarmaktadır (Rutlanda ve diğ., 2018). Günümüzde 20'den fazla AEİ mevcuttur ve yeni tanı almış epilepsili hastalarda ilk önce tek ilaçla tedavi önerilmektedir. AEİ'lerin seçimi, öncelikle hastanın nöbet tipi, ilacın güvenliği, yaş, cinsiyet, çocuk doğurma potansiyeli, komorbiditeler ve eşlik eden medikasyon kullanımı gibi hastaya özgü faktörlere göre uygulanır (Thurman ve diğ., 2019; Perucca ve diğ., 2011).

Epilepsi tanısı mümkün olduğu kadar spesifik ve kesin olması gerekir. Sınıflandırması ise nöbet tipi, epilepsi tipi ve sendrom olmak üzere üçe ayrılır. Her aşamanın etiyolojileri ve komorbiditeleri, bunlar önemli terapötik etkilere sahip olabileceğinden tanımlanmalıdır. Nedenler ise genetik, yapısal, metabolik, bulaşıcı, immun ve bilinmeyen olmak üzere altı kategoriye ayrılmıştır ve Şekil 1.1.'de gösterilmektedir (Thijs ve diğ., 2019).



Şekil 1.1. Epilepsi sınıflandırılması

Uluslararası Epilepsi Ligi (International League Against Epilepsy-(ILAE)) ilk olarak 1970'te epileptik nöbetler ve epilepsi sınıflamalarını oluşturmuştur; uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda 1981 yılında epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik (EEG) sınıflandırılması bugün için geçerli olan son şeklini almıştır (Fisher ve diğ., 2014).



Şekil 1.2. Epileptik nöbetlerin klinik ve EEG sınıflandırması, (ILAE 1981)

Epilepsi literatüründe önemli yeri olan kavram epilepsi sendromudur. Epilepsi sendromu, başlangıç yaşı, nöbet özellikleri, klinik seyri, EEG bulguları açısından ortak

özellikler gösteren durumlar için kullanılmaktadır. Bu kavram etiyolojik bir benzerliği gerektirmez. Etiyolojik tanısı belirlenmiş olan durumlara 'epilepsi', belirlenmemiş olanlara 'epilepsi sendromu' olarak adlandırılır. Lokalizasyon özellikleri temelinde epilepsiler 'parsiyel epilepsiler' ve 'jeneralize epilepsiler' olarak iki ana başlıkta toplanmaktadır (Scheffer ve diğ., 2017; Stafstrom ve diğ., 2015).

Parsiyel nöbet, bir hemisferdeki herhangi bir hücre topluluğunun aşırı deşarjı ile ilişkili olup başlangıç semptomları klinik veya EEG olarak o bölgenin işlevsel özellikleri ile ilgilidir. Jeneralize nöbetler, başlangıcından itibaren beynin iki tarafını da aynı anda etkileyen nöbetlere denir.

Etiyolojik özelliklerine göre ise, 'idiyopatik', 'kriptojenik' ve 'semptomatik' olmak üzere 3 ana grupta incelenmektedir. İdiyopatik epilepsiler genetik olarak belirlenir. Gözlenen nöbet tipleri, yaşa bağlı başlangıç, EEG kriterler ve hareket bozuklukları veya gelişimsel gecikme gibi eşlik eden semptomlarla karakterize edilirler. Ana alt tipler, idiyopatik genelleştirilmiş, erken çocuklukta görülen iyi huylu sendromları ve epileptik ensefalopatileri içeren fokal epilepsileri içerir (Weber ve diğ., 2015). Kriptojenik epilepsiler, idiyopatik epilepsilerin bilinen özelliklerine uymamaları nedeniyle semptomatik gibi görünen fakat mevcut araştırma yöntemlerinin etiyolojik bilgi vermediği durumlardır. Semptomatik epilepsi, beynin bilinen bir lezyonu ya da bir hastalığına sekonder gelişen epilepsileri olarak tanımlanmaktadır. Semptomatik epilepsilerin büyük bir kısmında nöbetler fokaldır ve nöbetin ilk semptomu genellikle kaynaklandığı anatomik yeri işaret eder (Knutson ve diğ., 2007).

1.1.1. Absans epilepsi

Absans epilepsi, idiyopatik veya genetik jeneralize epilepsi olarak sınıflandırılan bir durumdur. Nöbetlere sebep olan anormal elektriksel aktivite, nöronların aşırı uyarabilirliği nedeniyle genelleştirilir. Absans epilepsisi, çocukluk çağı epilepsisinin (CAE) en yaygın biçimlerinden biri olarak tanımlanır ve tüm çocukların % 10-17'sini etkileyen yaygın bir pediatrik epilepsi sendromudur. 4 ila 10 yaş arasındaki çocuklarda nöbetler başlar. EEG'de genelleştirilmiş 3 Hz ani-diken dalga deşarjları (SWD) eşlik eder. SWD'ler sürekli kısa olabilir (2 ila 5 saniye) veya uzun (15 ila 30 saniye), deşarj sıklığı 2,5-5 Hz arasındadır (Panayiotopoulos., 2001). SWD'ler korteksin ön orta hat bölgesinde görünürken, genlik lateral ve posterior yönlerde yavaş yavaş küçülür.

SWD'ler ani başlangıçlı ve sonludur; ataklar, özellikle istirahat durumunda kaydedildiğinde normal bir EEG aktivitesi izleyerek takip edilebilir (van Luijtelaar ve Sitnikova., 2004). Nöbet sona erdiğinde, hasta hemen önceki konuşma veya aktiviteye devam eder. Absans nöbetleri kısa ve sarsıcı olmadığından, rahatlıkla gözden kaçabilir veya yanlış teşhis konabilir. Absans nöbet sıklığı günde birkaç ile yüzlerce arasında değişmektedir. Stres ve yorgunluk, nöbet sıklığını artırır (Kessler ve diğ., 2017).

Absans nöbetlerinin patofizyolojik mekanizmaları, genelleştirilmiş SWD davranış önlemesiyle ilişkili olduğu çeşitli hayvan modellerinde çalışılmıştır. SWD'ler, esas olarak neokortik piramidal hücreleri, retiküler çekirdeği ve talamusun röle çekirdeğini içeren bir talamo-kortikal devrede anormal salınımlı ritimler tarafından üretildiği ve sürdürüldüğü anlaşılmaktadır. Hem inhibe edici hem de uyarıcı nörotransmisyonlar absans nöbetlerinin oluşumunda ve kontrolünde rol oynar. İnhibisyon ve uyarım arasındaki dengesizlik nedeniyle aşırı kortikal uyarılabilirliğin veya inhibe edici gama-aminobutirik asit (GABA) mekanizmalarının kontrolü altındaki anormal iç nöronal özelliklerden dolayı aşırı talamik salınımların sonucunda gerçekleşir. Kalsiyum kanalları talamik nöronlar üzerinde yüksek yoğunluklarda bulunur. Absans nöbetlerinin SWD deşarjları normal ve patolojik talamokortikal rejeneratif patlama deşarjını tetikler. Nörotransmitterler arasından GABA-B reseptörleri, rejeneratif patlama deşarjlarının başlatılmasında kalsiyum kanallarını ulaşmak için gerekli olan hiperpolarizasyonu ortaya çıkararak en belirgin rolünü oynamaktadır. GABA-B agonistleri tipik absans nöbetlerini arttırırken, GABA-B antagonistleri onları bastırarak nöbetleri azaltır. GABA-A'nın aktivasyon olduğu yerlerde ise talamokortikal salınımları senkronize etmek için bir ritim düzenleme olarak işlev gören retiküler talamik çekirdektir. Çekirdekdeki GABA-A reseptörlerinin arttırılmış aktivasyonu, bu hücrelerin ritim düzenleme kapasitesini azaltarak absans nöbetlerini oluşturma olasılığını azaltır (van Luijtelaar ve sitnikova., 2006; Panayiotopoulos., 2001).

Absans nöbetleri genellikle çocukluk çağında görülür. 10 yaştan büyük çocuklarda absans nöbeti başlangıcı genellikle çocukluk çağı absans epilepsisini düşündürmez. Çocuklarda sıklıkla jeneralize tonik-klonik nöbetler ve miyoklonik nöbetleri vardır. Bazı yetişkinlerde absans nöbeti görülebilir. 10 yaştan büyük çocukta başlayan jeneralize tonik-klonik nöbetlerle birlikte absans nöbetleri öyküsü, gençlik absans epilepsisi sendromunu göstermektedir. Benzer şekilde, daha erken yaşta başlamış fakat

miyoklonik nöbetlerin yanı sıra absans ve jeneralize tonik-klonik nöbetleri olan çocuk juvenil miyoklonik epilepsiyi Tablo 1.1’de göstermektedir (Butler., 2016).

Tablo 1.1. Absans nöbetleriyle ilişkili epilepsi sendromları

Absans Nöbetleriyle İlişkili Epilepsi Sendromları				
	Çocukluk Absans Epilepsi	Jüvenil Absans Epilepsi	Jüvenil Myoklonik Epilepsi	Myoklonik Absans Epilepsi
Tipik Başlangıç Yaşı	5-9	9-13	Gençlik	1-12
Kadın-Erkek Oranı	K>E	K>E	K=E	E>K
Nöbet Çeşitleri	Absans: Çok sık	Absans: daha az sıklıkta, genellikle jtk nöbet	Jtk, myoklonik ve absans daha az yaygın, CAE’ye göre daha az görülür	Üst gövde, kollar veya bacakların myoklonik absans ile çoğu hastada aynı zamanda jtk ve atomik nöbet
Prognoz	İyi	Orta, yetişkinlikte jtk	Orta, tedavi devam ettiği sürece jtk	Kötü, tedavi etmesi zor

1.2. Hayvan Modelleri

Hayvan modelleri, çeşitli hastalıklar hakkında bilgi edinilmesini sağlayarak tedaviler için etkili yöntemler geliştirilmesinde son derece önemlidirler. Bu modeller, insan hastalığına patofizyolojik benzerlikleri, hastalık durumuna göre fenotipik bir uyumu ve tekrarlanabilirlik gibi özelliklere sahiptir (Blass., 2015).

Epilepsi patogenezin daha iyi anlaşılması, epileptogenez sürecini aydınlatıp nöbetlerin önlenmesi, ilerlemesinin durdurulması veya etkili tedavi yöntemlerinin bulunabilmesi açısından önemlidir (Hui Yin ve diğ., 2013). Bu nedenle insan çalışmaları sadece tanımlayıcı düzeyde kalmakta dolayısıyla hayvan çalışmaları zorunlu olmaktadır (Taşkırın ve diğ., 2017). Epilepsi araştırmalarında en sık kullanılan hayvan modelleri, kemirgen modelidir. Bunlar genellikle sıçanlar veya farelerdir. Hayvan modelleri epileptogenezin altında yatan moleküler ve hücresel

değişikliklerin aydınlatılmasına (Devinsky ve diğ., 2018), epilepsinin tedavisinde yeni AEİ'ler ve alternatif tedavi edici yaklaşımların belirlenmesine olanak sağlayabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Geiger ve diğ., 2019; Perucca ve diğ., 2011; Sarkisian ve diğ., 2001).

Hayvan modelleri; nörofizyolojik, farmakolojik ve genetik çalışmalarda absans epilepsi modelini araştırılmasında önemli bir yere sahiptir. WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk) ve GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats of Strasbourg) ırkı genetik epilepsili sıçanlar, deney hayvanları olarak bilinmektedir. Bu hayvanlar Wistar ırkından olup, genetik olarak belirlenmiş nöbetler geçirmektedirler (Depaulis ve van Luijtelaar., 2006).

1.2.1. Absans epileptojenez modeli olarak WAG/Rij sıçanlar

WAG/Rij sıçanlar, Glaxo laboratuvarındaki Wistar sıçanlarından elde edilen genetik absans epilepsisine sahip inbred üretilen sıçanlardır. Bu sıçanlar, ilk olarak Rijswijk'teki REPGO TNO Enstitüsü tarafından Hollanda'da üretildi. WAG/Rij, Wistar Albino Glaxo/Rijswijk anlamına gelir. WAG/Rij ırkı, en az 130 kuşaktır (Sarkisova ve diğ., 2011). WAG/Rij sıçanları, patofizyolojik ve farmakolojik çalışmalar açısından, absans epilepsinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir genetik hayvan modelidir (Russo ve diğ., 2016; van Luijtelaar ve diğ., 2014; Coenen ve Van Luijtelaar ve diğ., 2003).

WAG/Rij absans epilepsi genetik modelinde, nöbetler genellikle kendiliğinden oluşur ve EEG'de SWD'ler eşlik eder. SWD'nin sayısı ve süresi yaşla birlikte giderek artar (Sitnikova ve diğ., 2011). WAG/Rij sıçanlarda 2 aylıkken göz seğirmesi, hızlanmış nefes alma, kafa eğme ve davranışsal ataklar eşliğinde EEG'de senkronize 7-10 Hz SWD gelişir. Genç erişkin WAG/Rij sıçanlarda (2-3 aylık) sadece SWD'nin olgunlaşmamış biçimlerini ifade ederken, SWD'nin en belirgin hali ise 6 aylıkken görülür. Yaşlı sıçanlarda ise çok daha belirgin hale gelir. WAG/Rij sıçanlarda, yaşamları boyunca nöbetler devam eder (Russo ve diğ., 2018; Sarkisova ve diğ., 2011).

Absans epilepsisine genetik yatkınlığı olduğu bilinen WAG/Rij sıçanlarında somatosensör korteksin sinaptik hipereksitabilite ile karakterizedir. WAG/Rij sıçanlarındaki somatosensör korteks birincil olarak tetiklenir (D'Antuono ve diğ.,

2006). Nöral devrelerde uyarıcı / inhibitör işlemlerin etkinliğinin duyuşal deneyim ile modüle edilebileceği bilinmektedir. Erken ontogenez sırasında anormal duyuşal tecrübenin kortikal uyarılabilirliği geri dönüşümsüz olarak değiştirebileceği birkaç hassas dönem vardır (Lee ve diğ., 2009). Yapılan çalışmalarda, doğumdan sonraki ilk 3 hafta boyunca bıyıkları kesilmiş olan sıçanlarda somatosensör korteks daha güçlü bir uyarılma ve inhibe edici cevapların bulunmadığını gösterdi (Shoykhet ve diğ., 2005; Cheetman ve diğ., 2008; Simons ve Land., 1987).

Absans epilepsisinin uyku ile yakın bir ilişkisi olduğu iyi bilinmektedir. Absans nöbetleri genellikle uyanıklık, uyku arasındaki geçiş dönemlerinde ortaya çıkar ve 3 Hz SWD'ler eşlik eder. WAG/Rij sıçanlarındaki epileptik aktivite, uyku kontrol mekanizmalarının bozulması ile ilişkilidir (Drinkenburg ve diğ., 1991).

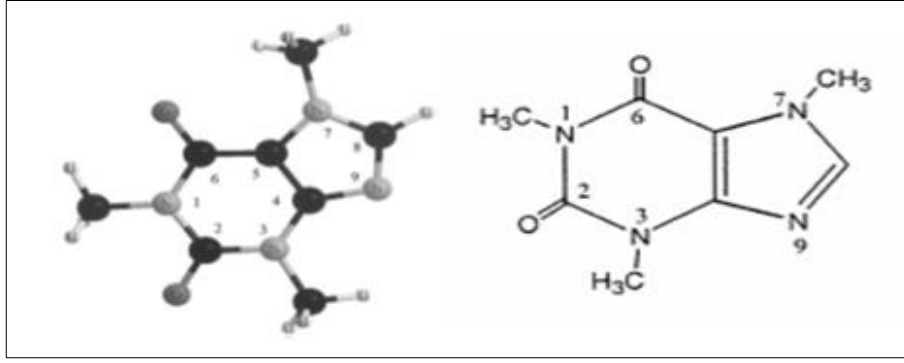
Genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçan hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, epileptogenezin altında yatan hücreşel mekanizmaları aydınlatılmasını ve bireyleri inceleme fırsatı sunar. Bu sebeple insan AE'nin patofizyolojisini anlamamız için olanak sağlar.

1.3. Kafein

1.3.1. Kafeinin yapısı

Kafein (1,3,7-trimetilksantin), kahve ve kakao çekirdekleri, çay yaprakları, guarana meyveleri gibi çeşitli bitkilerde bulunan merkezi sinir sistemini uyarıcı bir alkaloiddir. Kafein ilk kez 1819 yılında Alman Kimyager Runge tarafından, kahve çekirdeklerinden izole edilmiş ve yapısı E. Fischer tarafından aydınlatılmıştır (Turnbull ve diğ., 2017; McKetta ve diğ., 1977).

Kafeinin kimyasal formülü $C_8H_{10}N_4O_2$ 'dur. Temel bileşeni, nükleik asitlerin yapıtaşı olan "purin" dir. Kafein molekülünün yapısı, üç hidrojen bağı alıcısı, üç metil grubu içerir ve proton verici grupları yoktur. Metil gruplarının hidrojenleri dışındaki tüm atomlar aynı düzlemde kalır. Hidrofilik ve hidrofobik atom grupların bir kombinasyonu, kafeinin hem polar hem de polar olmayan çözücülerde çözünür olmasını sağlar. Kafeinin bu özellikleri, tüm biyolojik membranlardan geçişine izin verir. Kafeinin, kan beyin bariyerleri ve plasenta engelleri yoktur (Poltev ve diğ., 2010).

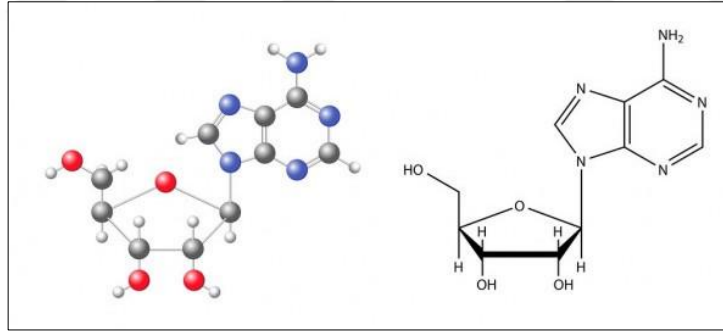


Şekil 1.3. Kafein molekülünün yapısı

Kafein, bütün adozin reseptörlerini (AR) antagonize ederek biyolojik etkilerinin çoğuna neden olur. Kafein, hücre yüzeyindeki adozin reseptörlerini aktif hale getirmeden bağlar ve böylece rekabetçi inhibitör görevi görür (Ribeiro ve diğ., 2010).

1.3.2. Adozin reseptörünün yapısı

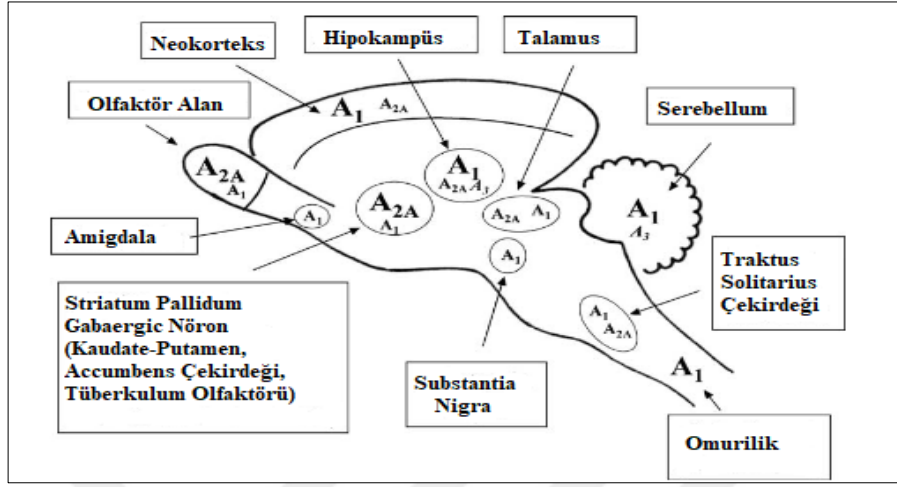
Pürin bazlarından biri olan adenine bir pentoz halkasının eklenmesi ile oluşan adozin, tüm hücrelerde yaygın olarak bulunan ve önemli düzenleyici etkileri olan bir moleküldür (Kayır ve Uzbay., 2004).



Şekil 1.4. Adozin molekülünün yapısı

Adozin hücrelerin normal bir bileşenidir ve hücre içi konsantrasyonunu düzenleyen çok sayıda reseptörleri vardır. Bugüne kadar dört alt tip adozin reseptörü tanımlanmıştır: A₁, A_{2A}, A_{2B} ve A₃. Adozin reseptörleri, tüm beyin alanlarının nöronları ve glial hücreleri üzerinde etkilere sahiptir. Omurilik ve beyinde en yaygın bulunan adozin reseptörü A₁ alt tipidir (Masino ve diğ., 2001). Özellikle korteks, serebellum ve hipokampuste yoğun olarak bulunmaktadır. A_{2A} alt tipi ise daha çok striatum, nükleus akkübens, kaudat putamen ve bazal ganglionlarda yoğunlaşmıştır (Ribeiro ve diğ., 2003). Kafein, adozin reseptörleri üzerindeki inhibe edici etkisine

bağlı olarak kortikal bir hipereksitabilite durumuna neden olur; bu süreç uyanıklığı artırır ve bilişsel işlevi geliştirir (Scammells ve diğ., 2017; Jovel ve diğ., 2017).



Şekil 1.5. Beyindeki adenozin reseptörlerinin dağılımı

1.3.3. Kafeinin hücresel etki mekanizması

Kafeinin hücresel seviyedeki potansiyel etkileri üç etki mekanizması ile açıklanabilir. Bunlar adenozin reseptörlerinin merkezi sinir sistemindeki antagonizması, hücre içi kalsiyum depolamanın mobilizasyonu ve fosfodiesterazların inhibisyonudur (Cappelletti ve diğ., 2015).

Adenozin reseptörlerinin antagonizması

Kafein, adenozin reseptörlerinin alt kısımlarını (A_1 ve A_{2A}) bloke ederek etkilerini azaltır. Dopamin, nöradrenalin ve glutamat salınımının artmasına neden olur. Kafein, beyin kan akışını azaltabilir. Ayrıca, kan damarlarındaki A_1 , A_{2A} ve A_{2B} adenozin reseptörlerini inhibe ederek ve adenozin aracılı kasılmayı sınırlandırarak, miyokard kan akışını azaltabilir (Namdar ve diğ., 2009).

Hücre içi kalsiyum mobilizasyonu

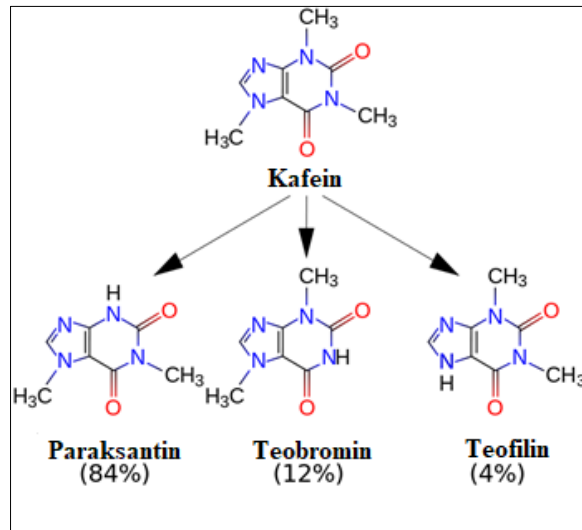
Kafein, sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salımını indükleyebilir ve yeniden alımını da inhibe edebilir. Bu mekanizma ile alışılmış ve alışılmadık kafein kullanıcılarında, kasılmaları artırabilir. Hücre içi kalsiyum endotel nitrik oksit sentazın daha yüksek miktarlarda nitrik oksit üretimi ile aktivasyonunu belirler. Bu nedenle, iskelet kaslarının kasılmalarının artışına neden olabilir (Goldstein ve diğ., 2010).

Fosfodiesterazların inhibisyonu

Kafein, fosfodiesterazların seçici olmayan rekabetçi bir inhibitörü olarak görev yapar. Enzimler, siklik adenozin monofosfat (cAMP) gibi moleküllerdeki fosfodiester bağlantılarını hidrolize ederek bozulmalarını önler. cAMP, hormona duyarlı lipazın aktivitesini tetikleyerek lipolizi uyarır ve adrenal için hayati bir role sahiptir. Aynı zamanda, glikoz ve lipit metabolizmasında yer alan birkaç enzimi fosforile eden protein kinaz A'yı da aktive eder (Graham., 2015).

1.3.4. Kafein metabolizması

Kafein ağızdan alındıktan kısa bir süre sonra, gastrointestinal sistemden hızlı bir şekilde emilir (15-120 dk) ve kanda en yüksek düzeye ulaşır. Kafein karaciğerde sitokrom P450 oksidaz enzim sistemiyle üç ana metabolit oluşturur. Metabolizma sonucunda paraksantin (84%), teobromin (12%) ve teofilin (4%) gibi pek çok metabolit açığa çıkar. Basit difüzyonla taşınır. Hürelere geçişi sırasında herhangi bir bariyer olmadığı için kafein beyin, testis ve fetus dahil vücuttaki tüm hürelere ve dokulara hızlı bir şekilde yayılır. Plazmada albümine bağlı olarak taşınan kafeinin % 80'i beyinde bulunur. Kafeinin vücuttan uzaklaştırılması sürecinde yarılanma ömrü, yaklaşık 3-4 saattir ve karaciğerde depolanır. CYP1A2, kafeinin demetilasyonundan sorumludur ve metabolizmasını etkileyebilir. CYP1A2 ekspresyonu cinsiyet, ırk, genetik polimorfizmler, hastalıktan etkilenebilir ve bu faktörler farklı dokulardaki kafein konsantrasyonunu değiştirebilir (Stefanello ve diğ., 2019; Nehlig ve diğ., 2018).



Şekil 1.6. Kafein molekülünün metabolitleri

Kafeinin ana metaboliti olan paraksantin, benzer bir kimyasal yapıya ve kafein ile yarı ömre sahiptir. Serum ve idrarda kolayca ölçülür. Oral olarak alınan paraksantin yaklaşık %60'ı değiştirilmemiş olarak atılır. Teobromin, biyolojik olarak aktif metabolitlerin daha yüksek bir oranını oluşturur. Hızla emilir ve yaklaşık %50'si 8-12 saat içinde idrarla atılır. Teofilin ve kafein benzer bir kimyasal yapıya sahiptir. Teofilin bir N-metil grubundan yoksundur. Teofilinin, kafein ve teobrominden daha güçlü etkileri belirler. Yarı ömrü 3 ila 9 saat arasında değişir (Garipağaoğlu ve diğ., 2009).

Sonuç olarak, kafein ve metabolitlerinin metabolizması bireyler arasında önemli farklılıklar vardır. Dışsal faktörler; sigara içme, yiyecek alımı, mide boşalma hızı, hamilelik, hepatik ve kardiyovasküler hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve eşlik eden ilaç kullanımı gibi metabolik ve atılım oranlarını etkiler (Cappelletti ve diğ., 2015).

1.3.5. Kafeinin etkileri

Kafein bazlı gıda takviyeleri ve içecekler, zihinsel ve fiziksel güç sağlamak, atletik performansı ve konsantrasyonu geliştirmek için kullanılmaktadır (Alves ve diğ., 2018; McLellan, Caldwell ve Lieberman., 2016).

Araştırmalarda kafeinin bilişsel ve motor fonksiyon üzerindeki etkileri, olası mekanizmaları netleştirmek amacıyla incelenmiştir. Kafeinin dikkat, ruh hali ve uyanıklık üzerindeki etkileri bildirilmiştir (Diukova ve diğ., 2012; Rogers ve diğ., 2011). Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, frontal korteks ve striatumunda dopaminerjik fonksiyonu önleyerek, bilişsel ve motor anormallikleri ile sonuçlanır. Yapılan çalışmalarda dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun kafein kullanımıyla, davranışsal ve nörokimyasal değişiklikleri hafiflettiği rapor edilmiştir (Pandolfo ve diğ., 2013).

Kafeinin nöbet ve nöbet eşiği üzerindeki etkileriyle ilgili bazı tartışmalar vardır. Bazı raporlar, uzun süreli kafein uygulamasının fare ve sıçan modellerinde nöbet eşiğini artırabileceğini desteklemektedir. Kafeinin merkezi bir sinir sistemi uyarıcısıdır ve izole edilmiş hipokampal dilimlerde epileptiform aktivitelere neden olduğu gösterilmiştir (Avoli ve Jefferys diğ., 2016). Motor nöbet modellerinde yapılan in vivo çalışmalar, kafeinin nöbet aktivitesinin süresini kısaltabileceğini göstermiştir (Gupta ve diğ., 2014). WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk) ve GAERS (Genetic Absence

Epilepsy Rats of Strasbourg) ani-diken deşarjlarını (SWD'ler) baskıladığı gösterilmiştir (Dede ve diğ., 2019). Prenatal dönemde kafein alımın etkisi, hipokampalı uyarılmasını değiştirdiği ve nöbet sergileyen hayvanların yüzdesini arttırdığı gösterilmiştir. Ancak yetişkinliğe devam eden lokomotor aktivitede bir değişiklik olmadığı bildirildi (Silva ve diğ., 2013).

Kafein, prematüre apnesinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir metilksantindir. Erken doğmuş bebeklerde, kafein solunum desteği süresini azaltarak, hayatta kalma oranlarını arttırır. Beyin felci ve bilişsel gecikme insidansını azaltır (Abu-Shaweesh ve diğ., 2017; Atik ve diğ., 2016).

Kafeinin içeren içeceklerin, özellikle kahvenin kardiyovasküler sağlık üzerindeki etkisi tartışmalı bir konudur. Kafein, kan basıncı, kolestrol, plazma homosistein ve kalp atışı açısından kardiyovasküler sistemi olumsuz yönde etkiler. Ancak bazı insanlar kafeine tolerans geliştirdiği için diğerlerinden daha ciddi şekilde etkilenir. Kafeinin kardiyovasküler etkilerine tolerans geliştikçe, başlangıçta gözlenen etki hızlı bir şekilde azalır, hatta kaybolur (Turnbull ve diğ., 2017; Pelchovitz ve diğ., 2011).

Kafein, anksiyeteyi arttıran bir madde olarak kabul edilir ve farmakolojik temeli belirsizdir. Kafeinin alışma mekanizması, adenzin reseptlerine (ncelikle A₁ ve A_{2A}) bağlandığı, adenzin etkilerini önleyen ve nöronal aktiviteyi arttıran bir işlemdir. Çünkü adenzin reseptlerine bağlandığında nöronların depresyonuna ve uyusukluğuna neden olan kısıtlayıcı bir nromodlatrdr. Kafeinin, nöradrenerjik sistemle kesilmesi sonucunda adrenalın salınımının artmasına neden olmasıdır (Chen ve diğ., 2013).

Genelde kahvenin iyi bir gece uykusuna müdahale ettiği bilinir. Kafein içeren içeceklerin yaygın olarak kullanıldığı bilindiğinden, insanlar kafein içeren içeceklerin uyanık kalmaya yardımcı olabileceğini, gece uykusu kalitesini ve süresini etkileyebileceğini fark edildi. Fazla kafein tüketen kişilerde, sadece huzursuzluğa değil aynı zamanda kas gerginliğine de neden olur. Uyumadan önce kafein alan insanlar gürültüden daha kolay uyanırlar (Nawrot ve diğ., 2003).

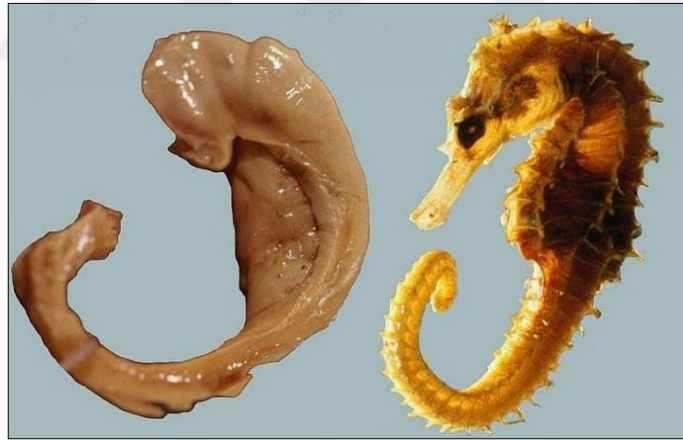
Kafein, gebelikte oldukça yaygın tüketilen ksenobiotiktir. Annenin gebelik sırasında kafein alması, doğrudan fetüsün kafeine maruz kalmasına yol açar. Çünkü kafein

plasenta bariyerini kolayca geçer. Fetüsün yeterli enzim sistemleri gelişmediği için kafein metabolizması çok uzun süre almaktadır. Bu sebepten dolayı fetal büyüme ve gelişme olumsuz etkilenmektedir. Yüksek dozda kafein tüketimi, fetal ölüm riskinde artış, gelişme geriliği, düşük doğum ve prematüre doğuma neden olur (Deniz ve diğ., 2015).

Kafein bir idrar söktürücü madde olarak bilinir. Yüksek kafein alımı genellikle düşük kalsiyum alımı için bir belirteçtir. Kafein içeren içeceklerin tüketimi bu nedenle osteoporoz için risk faktörüdür (Gaspar ve diğ., 2016).

1.4. Hipokampus

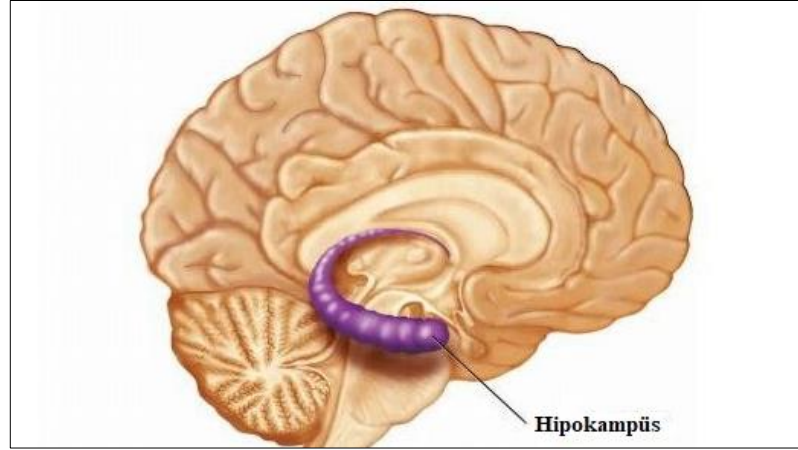
Filogenetik olarak beynin en eski bilinen bölümlerinden biri olan hipokampus, koronal kesitlerde C harfi şeklinde görülür. Denizatına benzerliğinden dolayı hipokampus (hippos=at, kampos=deniz) ismi verilen bu yapı, bir zamanlar dış yüzü koç boynuzuna benzediğinden Cornu ammonis adı ile anılmıştır. (Ammon: Koç başlı bir Mısır İlahına verilen isim)



Şekil 1.7. Hipokampusun denizatı ile benzerliği

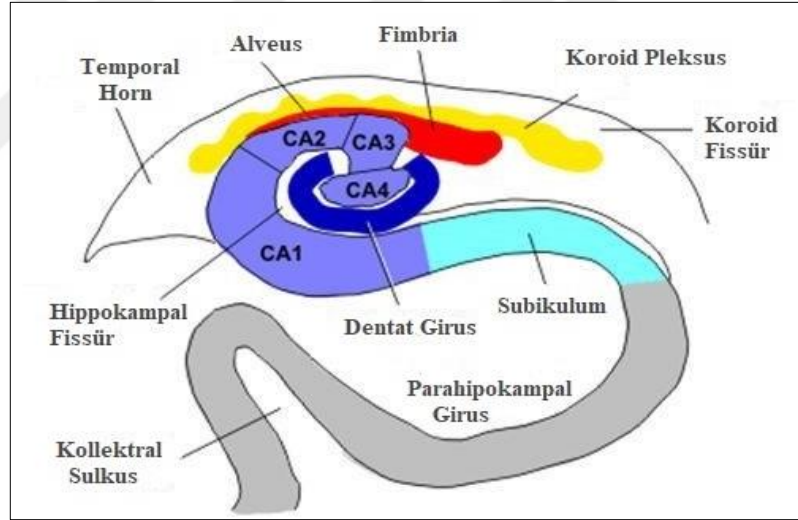
Hipokampus, koroid fissür kavisinin dış parçasından gelişir. Bu süreç, bölgede bulunan öncü nöronların çoğalması ve göç etmesiyle başlar. Böylece hemisfer duvarı bir yandan kalınlaşırken, diğer yandan ventrikülün medial kenarına doğru bir çıkıntı yapar. Bu çıkıntı hipokampusü meydana getirir (Songur ve diğ., 2001).

Hipokampus; lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanan, yaklaşık 5-8 cm uzunluğunda bir gri cevher tabakasıdır. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır (Songur ve diğ., 2001).



Şekil 1.8. Hipokampusun şekli ve konumu

Hipokampus, singulat girus, hipotalamus ve amigdala birlikte “Limbik sistem”i oluşturur (İzci ve diğ., 2015). Limbik sistem, hatıraların ve duyguların oluşumundan sorumludur (Maftoon ve diğ., 2014).



Şekil 1.9. Hipokampusun bölümleri

Hipokampus histolojik olarak 3 ana bölümden oluşmaktadır ve buna hipokampal formasyon denir. Hipokampal formasyon; esas hipokampus, dentat girus ve subikulumdur. Hipokampal formasyon, uzaysal öğrenme ve bellekten sorumludur. Cornu Ammonis’in İngilizce baş harflerini temsilen “CA” olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı alanlara bölünmüştür. Bunlardan CA1 subikuluma, CA4 ise dentat girusa en yakın olan alandır (İzci ve diğ., 2015).

1.4.1. Hipokampusun fonksiyonları

Hipokampus, eşsiz hücrel morfolojiye ve karmaşık bir yapıya sahiptir (Zeidman ve Maguire., 2016). Hipokampus, üzerinde en fazla klinik ve laboratuvar çalışma yapılan beyin bölümüdür. Hipokampusun karmaşık anatomisi nedeniyle incelenmesi oldukça zordur Bu nedenle, hipokampusun tek başına yaptığı fonksiyonları tanımlamak yerine, karmaşık fonksiyonlardaki rolü üzerinde durulmaktadır (Songur ve diğ., 2001).

Hipokampus, epizodik bellek, mekansal gezinme ve duygularla ilgili işleme dahil olmak üzere çoklu bilişsel işlevlerde rol oynar (Przeździk ve diğ., 2019). İnsan ve kemirgen beynindeki hipokampus, mekansal konumlarla ilgili bilgilerin hafızaya alınması, öğrenilmesinde ve işlenmesinde çok önemli bir rol oynar.

Hipokampuse gelen duyuşal sinyalleri içerisinden geçiren ek kanal rolü oynadığı düşünülür. Duyusal uyarılar, hipokampusu aktive ederek limbik sistemi etkiler. Bu sebepten dolayı davranışların şekillenmesinde etkilidir (Songur ve diğ., 2001). Amigdala ve hipokampus arasındaki dinamik etkileşim, önemli derecede duyuşal olayların uzun süreli bellek oluşumunu initialize eder. Davranışsal tepkilerin düzenlenmesini önemli ölçüde modüle eder. Amigdala, sosyal ve duyuşal davranış merkezi olarak kabul edilir ve korku şartlanmasının yaratılması için temel bir merkez olan lateral çekirdeği (LA) barındırır. Savunma davranışlarının gösterimi, LA'daki nöronların öğrenme uyarılmış değışiklikleriyle ilişkilidir. Üstelik amigdala; dikkat, biliş ve stresli olayların değeriendirilmesinde etkili bir rol oynar (Gley ve diğ., 2019).

Hipokampus, epilepsi ve nöbet patofizyolojisinde önemli bir yapıdır. Hipokampal korteks iki ana nöron grubunu içerir; bunlar ana nöronlar ve internöronlardır. Ana nöronların çoğu, beynin uzak bölgelerindeki diğeri nöronların hücre gövdeleri üzerinde uyarıcı sinapslar oluştururken, internöronlar genellikle ana nöronlar ve diğeri internöronlar üzerinde inhibe edici sinapslar oluşturur. Bu nedenle, ana nöronların uyarıcı etkisini inhibe ederek ve nöbet oluşumunu önlerler (Sendrowski ve diğ., 2013).

Hipokampusun özelliği ise uyarılabilirliğidir. Örneğin, hafif elektriksel uyarılar hipokampus bölgelerinde uyarı kesildikten sonra saniyeler süren bölgesel epileptik nöbetlere sebep olur. Bu da hipokampusun normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir (Sloviter., 2005).

Yapılan çalışmalarda, WAG/Rij sıçanlarında kendiliğinden ortaya çıkan absans nöbetlerinin başlatılması ve sonlandırılması sırasında korteksin farklı bölgeleri ve hipokampus arasındaki ilişki araştırılmıştır. Absans epilepsi nöbetleri talamokortikal kökene sahiptir (Depaulis ve van Luijtelaar., 2006). SWD'ler somatosensörlü korteksin küçük bir alanında başlatıldığı ve ardından talamokortikal alanı içinde genelleştirildiği bilinmektedir (Avoli., 2012; Meeren ve diğ., 2002). SWD'ler tüm beyin korteksine kaydedilir. Somatosensörlü korteksin fokal bölgesinden diğer kortikal bölgelere hızlı intrakortikal nöbet aktivitesinin yayıldığı düşünülmektedir (Meeren ve diğ., 2002). Tipik yokluk epilepsisinin ani diken dalga deşarjları hipokampuste veya epileptik sıçanlarda başka herhangi bir limbik yapıya kaydedilmemiştir (Depaulis ve van Luijtelaar., 2006). Bununla birlikte, genetik olmayan epilepsili sıçanlar, limbik bölgelerde artmış serebral glukoz kullanım oranını ve hipokampuste (Richards ve diğ., 2000) artmış glutamat seviyelerini ve talamusta (Touret ve diğ., 2007) azalmış seviyeleri göstermektedir. Hipokampusun, tipik devamsızlık nöbetlerinin doğrudan ekspresyonu ile ilgili olmamasına rağmen nöbet oluşumunun düzensizliğine ve/veya epileptik uyarılmaya oldukça duyarlı olan limbik devrelere yayılan nöbetlerin kısıtlanmasında rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Sysoeva ve diğ., 2016).

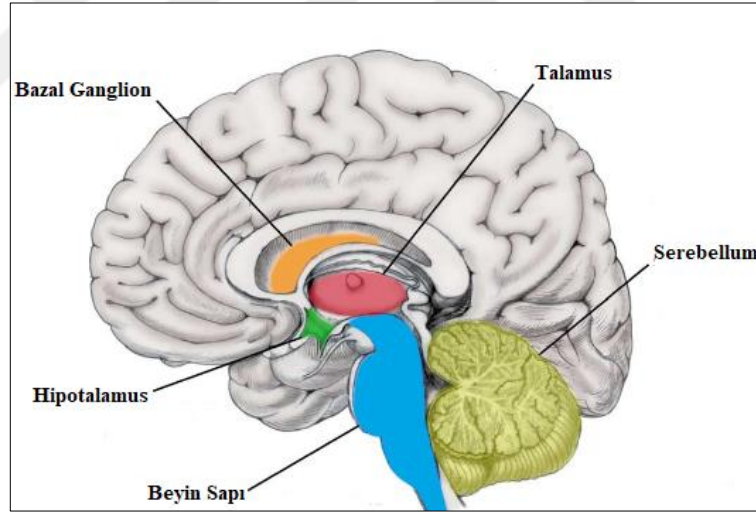
Yapılan çalışmalarda, uzun süreli epileptik nöbetlerin çoğunlukla hipokampuste nöronal hasar oluşturarak bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya neden olduğuna varılmıştır. Öğrenme ve hafızadan sorumlu olan hipokampus, CA1 ve CA2 bölgesi küçük piramidal hücrelerden, CA3 ve CA4 bölgesi geniş piramidal hücrelerden oluşur. Dentat girus bir kavite şeklindedir ve küçük granül hücrelerden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, hipokampusun piramidal nöronlarında ve granüler nöronlarında histolojik değişiklikler saptanmıştır.

Temporal lob epilepsisinde CA1'in en fazla etkilenen hipokampus alt bölgesi olduğu rapor edilmiştir (Lehmann ve diğ., 2000). İlaveten hipokampus alt bölgeleri arasındaki intrahipokampal bağlantılar, epileptik durum oluşturabilen eksitator geri besleme halkaları içeren devrelere sahiptir. CA1 bölgesi nöronları uzaysal öğrenme ve bellek için gereklidir. CA1 bölgesi bir hataları kontrol eden bölge olarak çalışır ve korteksten gelen bilgiler arasında uyumsuzluk olup olmadığını kontrol eder. CA1 ve CA3'deki hücre sayıları ergenlik döneminden önce daha az iken bu dönemden sonra giderek artmaktadır (Suzuki ve diğ., 2005). Epileptik nöbetler ve bilişsel bozukluk ilişkisi iyi

bilinmektedir. Uzun süreli anıların oluşumu ve depolanmasındaki zorluklar nöbetlerde hipokampus dışında diğer beyin bölgelerinin de etkilendiğini düşündürmektedir. Frontal korteks hipokampusta kodlanan bilgilerin uzun süreli hafızada depolanmasından sorumlu olduğu bilinen en önemli beyin bölgesidir (Kapucu., 2019; İzci ve Erbaş., 2015).

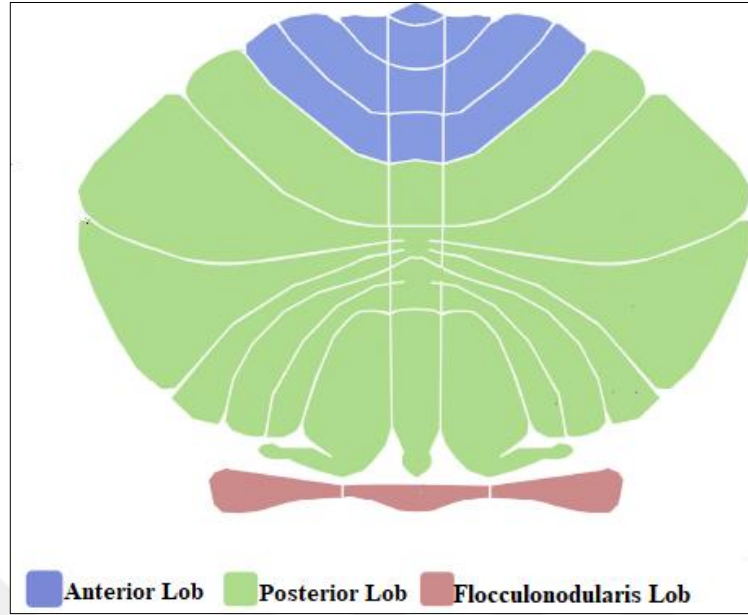
1.5. Serebellum

Anatomik olan serebellum, tekil geometrik bir düzenlemeye sahiptir. Serebrumdan dura mater katmanı ile ayrılan iki serebellar hemisferden oluşan geniş bir katlanmış format içerir. Serebellum, arka kranial fossada bulunan, oksipital loblardan aşağı ve beyin sapına dorsal yatan vermis adı verilen merkezi bir bileşen ile birleştirilir (Andreotti ve diğ., 2018). Serebellum tüm beynin büyüklüğünün sadece %10'unu temsil ederken, 100 milyardan fazla nöronla beyin hücresiyle aynı miktarda sinir hücresini içermektedir (Parmar ve diğ., 2018).



Şekil 1.10. Serebellumun konumu ve şekli

Serebellum, beyin sapına serebellar pedünküller aracılığıyla bağlanır. Üst pedünkül, serebellumdan talamus yoluyla serebral kortekse kadar bilgi taşıyan yollar içerir. Orta pedünkül, beyin korteksinden serebelluma pontin çekirdeği yoluyla geçen yapılardan oluşur. Alt pedünkül, serebellumu vestibüler sistemi ve omuriliğe bağlayan hem iç hem de dış yollarını taşır. Serebellum; lobus anterior, lobus medius ve lobus flocculonodularis olmak üzere 3 ana bölüme ayrılır (Stoodley ve diğ., 2016).



Şekil 1.11. Serebellumun bölümleri

Serebellumun iç yapısı, gri ve beyaz cevherden meydana gelir. Gri cevher, temel olarak serebellumun dış yüzeyini örtmektedir ve korteks olarak adlandırılır (Snell., 2000). Beyaz maddeyi ve derin serebellar çekirdeği kapsayan kuvvetlice katlanmış serebellar korteksten oluşur. Serebellar korteks üç katmandan oluşur. Bunlar; granül hücre katmanı, moleküler katman ve bu ikisi arasında iki boyutlu bir dizide düzenlenmiş purkinje hücrelerinden oluşmaktadır (Sultan., 2015).

1.5.1. Serebellumun fonksiyonları

Serebellum, hareket kabiliyetini kontrol eden ve öğrenmeden sorumlu organdır. Serebellumun iki ana işlevi bulunur. Merkezi komutu ve gerçek çevresel hareketi karşılaştıran hareket planının düzeltilmesi ve iyileştirilmesi, ontogenez sırasında hareketlerin ayrışmasıdır. Lokomotor sisteme iletilen karmaşık görevleri destekleyen sinir ağları oluşturulmuştur. Serebellum, karmaşık hareket planlarının öğrenilmesinde ve depolanmasında önemli bir yeri vardır. (Zsarnovszky ve diğ., 2018).

Serebellum, motor koordinasyonunda etkilidir. Bilişsel, öğrenme, duygu ve davranışların yanı sıra sözel bellek bozuklukları, serebellar ataksi gibi hem motor hem de motor olmayan fonksiyonların bozulmasıyla ilişkili çeşitli nörolojik bozukluklarda rol oynar. Bu nedenle, serebellar formasyonda rol oynayan mekanizmaların azaltılması, rollerini ve onunla ilişkili patolojileri anlamak için kritiktir (Andreotti ve diğ., 2018). Serebellumun yalnızca çeşitli duyuşal-motorlu ağlarda değil, aynı

zamanda bilişsel-davranışsal süreçlerde, özellikle MS'li hastalarda etkilenen alanlarda etkili olduğu tespit edilmiştir (Parmar ve diğ., 2018).

Serebellum, duyuşsal tahmin hatalarına dayalı öğrenmeyi desteklemek için istemsiz refleksleri uyarlaması ve hedefe yönelik bilişsel işlevlerde rolüyle de iyi bilinmektedir. Bu rolle uyumlu olarak, şizofreni, otizm, fronto temporal demans ve serebellar işlevindeki değişiklikler ile ilişkili olan çeşitli nöropsikiyatrik bozukluklar ve gelişimsel sendromlardır. Değişmiş serebellar anatomisi olan birçok bireyde, kaba motor bozulmalarının yokluğunda bilişsel ve davranışsal bozulmalar meydana gelir. Bu hastalıkların birçoğu, serebellum/lateral serebellar çekirdek anatomisinin dentat çekirdeğindeki değişiklikler ve gen ekspresyonu ile ilişkilidir (Locke ve diğ., 2018).

Normal serebral fonksiyonlarda olduğu gibi, epileptik nöbetler kortikal ve subkortikal yapılar arasındaki yaygın aę etkileşimlerini içerir. Her ne kadar korteks nöbet kökenli bir bölge olarak vurgulanmasına rağmen, davranışların ortaya çıkması, yayılmada ve bazı durumlarda epileptik nöbetlerin başlamasında subkortikal yapılar için çok önemli bir role işaret eder. Subkortikal düzeyde beyincik, motor öğrenmede rol alan ana beyin yapısıdır. Önceki çalışmalar da serebellumdan gelen ritmik verimin, genelleştirilmiş nöbetlerin korunmasına katkıda bulunduğunu ve epilepsideki rolünü ortaya koymuştur (Norden ve diğ., 2002).

Serebellumdaki glutamat aracılı nöronal hasarın, serebellar korteksin purkinje hücrelerinin kaybından sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Lehtinen ve diğ., 2009). Glutamerjik nörotransmisyon, sıklıkla glutamatın sentezi ve salımı, geri alımı ve metabolizmasındaki değişikliklerle karakterize temporal lob epilepsisiyle (TLE) ilişkilidir.

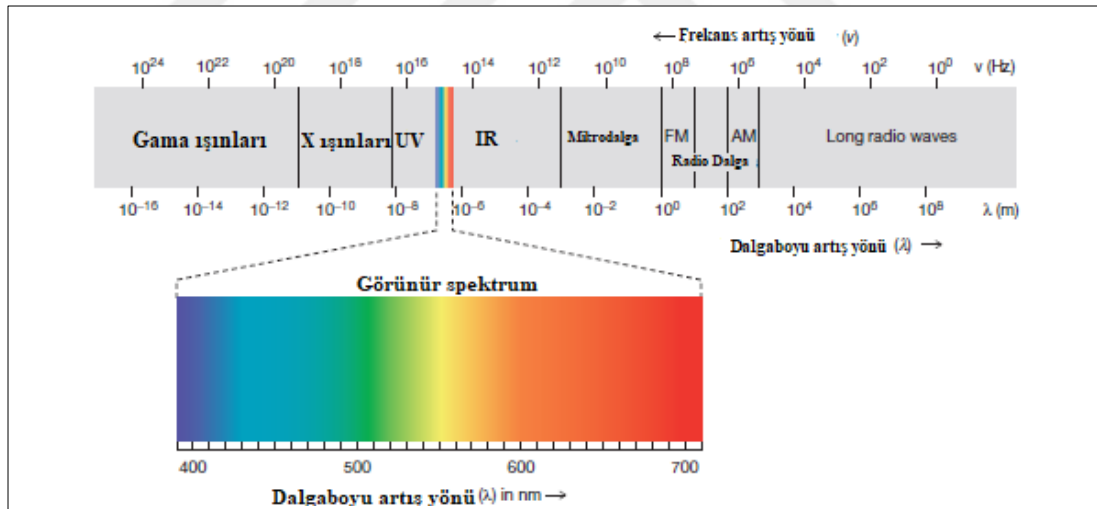
Glutamat düzenlemesini içeren işlemlerin araştırılması, epilepside ilgili ilaç hedefleri olabileceğinden kilit öneme sahiptir. TLE'de, uyarıcı ve inhibe edici nörotransmisyonda geçici değişiklik nedeniyle glutamat içeriğinde bir artış vardır. Artan glutamat nöronları, glutamerjik reseptörlerin hiperaktivasyonuna, ikincil mesajçıl seviyesine yükselmeye, nöronal hasar ve ölüme yol açan hücre içi Ca^{2+} 'da artışa yol açan çeşitli şekillerde etkiler (Khan ve diğ., 2008; Linn., 2000). Nöronal hasarın, TLE ile ilişkili olası davranış açığıyla sonuçlanan serebellar atrofiden

kaynaklanmaktadır. Nöronal kaybın yanı sıra, glutamerjik reseptörlerde yapılan değişiklikler sinaptik plastisite ve motor öğrenmeyi içeren mekanizmaların bir parçasıdır (Soman ve diğ., 2013; Norden ve Blumenfeld., 2002).

1.6. Spektroskopinin Temelleri

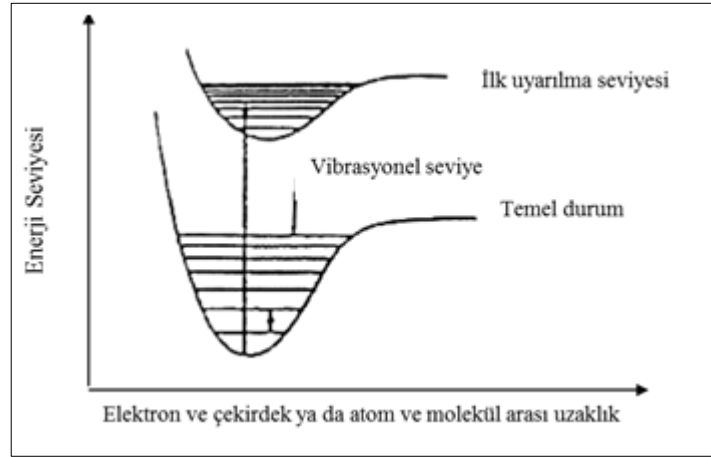
Spektroskopi, örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve değerlendirilmesi şeklinde adlandırılır. Absorplanan ışınların spektrofotometre tarafından belirlenip, değerlendirilmesiyle elde edilen verilere spektrum adı verilir.

Elektromanyetik dalgalar, dalga boyunun ve frekansının çok geniş bir spektrumunu içerir. Elektromanyetik dalgaların 1 Hz ile 10^{24} Hz frekans aralığında yayıldığı fark edilmiştir. Elektromanyetik dalga sıklığına göre yedi gruba ayrılır. Radyo dalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi radyasyon, görünür ışık, ultraviyole radyasyon, X ışınları ve gama ışınlarıdır (Şekil 1.12) (Pekin., 2013).



Şekil 1.12. Elektromanyetik spektrum

Elektromanyetik radyasyon ve madde arasındaki etkileşim, atomların veya moleküllerin enerji seviyeleri arasındaki radyasyonun yeniden yönlendirilmesine neden olabilir. Bu nedenle enerji bir molekülü daha yüksek bir enerji seviyesini uyarır. Uyarma tipi ışığın dalga boyuna bağlıdır (Freifelder ve diğ., 1982). Enerji seviyeleri genellikle, Şekil 1.13'de gösterilen bir enerji seviyesi diyagramı ile tanımlanmaktadır.



Şekil 1.13. Vibrasyonel enerji seviye diyagramı

Elektromanyetik ışımının, dalga boyu, periyodu, frekansı, hızı ve dalga sayısı birden çok özelliği bulunmaktadır. Bir ışının dalga özelliğinin yanında, parçacık özelliği de vardır ve bu parçacıkların herbirine, foton denir. Işığın şiddeti, ışık demeti içindeki foton sayısı ile ilgilidir ve enerji birimleriyle ölçülür. Işık enerjisinin absorpsiyonunda, molekül kuantlanmış (değişken) miktarda enerji alıp vereceğine göre, tek frekanslı belli düzeydeki bir ışınımı absorblar. Bu bileşiğin bütün molekülleri için geçerlidir ve böylece spektrumda absorpsiyon çizgileri görülür. Fakat belli bir elektronik seviyede olan her molekül aynı zamanda değişik titreşim ve dönme seviyelerinde olduğundan bunlar spektruma absorpsiyon bantları ve pikleri şeklinde yansır. Buna göre bir molekülün ışınımı absorblaması durumunda enerji değişimi aşağıdaki denklem ile bulunur (Eşitlik 1.1) (Eerdenbrugh ve diğ., 2011; Skoog ve diğ., 1998) (planck sabiti: $h = 6.6 \times 10^{-34}$ joule, $c = 3,0 \times 10^8$ ms⁻¹).

$$E = hv = hc \bar{\nu} \quad (1.1)$$

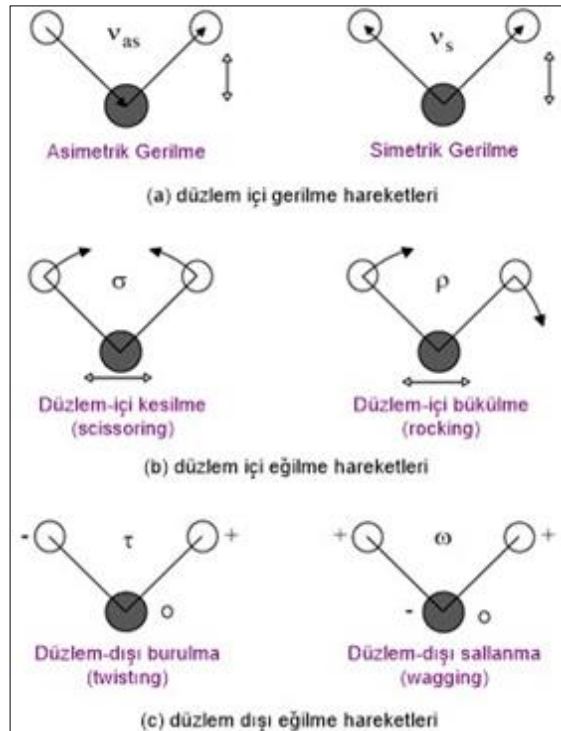
1.6.1. Kızılötesi (IR) spektroskopisi

IR spektroskopisi, uygun frekans aralığında soğurma ile molekül bağlarının ve atom gruplarının dipol momentlerinde değişmeye neden olan titreşimlerin incelenmesini sağlayan spektroskopik yöntemdir. Moleküllerin IR ışığını (0,78 – 1000 μ m dalga boylu veya 12,800 – 10 cm⁻¹ dalga sayılı) absorpsiyonuyla titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanır. IR spektroskopisi dalga boyuna, frekansa ve dalga sayılarına göre yakın, orta, uzak IR bölge olmak üzere üç bölgeye ayrılır (Tablo 1.1) (Larkin., 2018).

Tablo 1.2. IR spektrum bölgeleri

Bölge	Dalga boyu, μm	Dalga Sayısı, cm^{-1}	Frekans, Hz
Yakın IR	0,78-2,5	12,800-4000	$3,8 \times 10^{14} - 1,2 \times 10^{14}$
Orta IR	2,5-50	4000-200	$1,2 \times 10^{14} - 6,0 \times 10^{12}$
Uzak IR	50-1000	200-10	$6,0 \times 10^{12} - 3,0 \times 10^{11}$

IR ışınları UV, GB ve X-ışınları ile ilgili incelenen elektronik geçişlerin hepsini oluşturacak kadar yüksek enerjili değildir. Bu nedenle, IR ışınının absorpsiyonu, çeşitli titreşim ve dönme halleri arasındaki enerji farklarının küçük olmasından dolayı daha çok moleküler yapılarla sınırlıdır. IR alanda gönderilen ışınların absorblanmasına temel oluşturan ve enerji gereksinimini yaratan hareketler titreşim hareketleridir. Bunlar gerilme titreşimleri ve eğilme titreşimleri olarak iki grupta toplanırlar (Şekil 1.14). Eğilme titreşimleri, atomlar arasındaki bağ açıları değişmelerinden ibarettir. Bunlar; Makaslama, Sallanma (düzlem dışında), Sallanma (düzlem içinde) ve Burulma (düzlem dışında) olmak üzere dört tiptir (Sridharan., 2016).

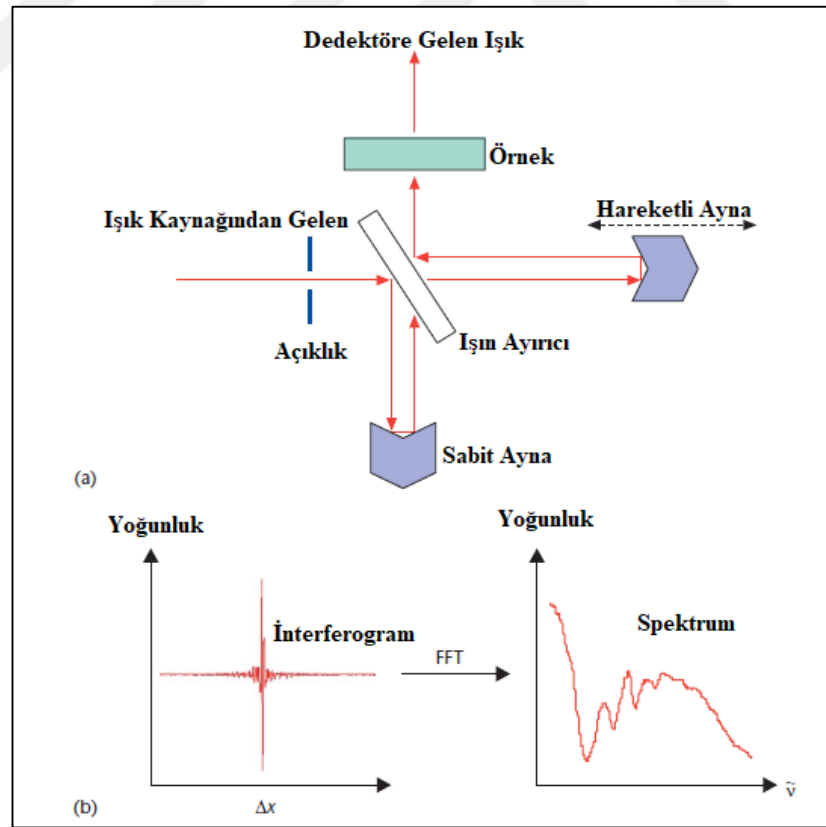


Şekil 1.14. Moleküler titreşim tipleri

1.6.2. Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi

IR geniş bandına yakın bölgeye ulaşan bir kızılötesi titreşim spektroskopisi tekniğidir. IR radyasyonunun bir kısmı örnek tarafından emilir ve bir kısmı da iletilir. Elde edilen spektrum, moleküler absorpsiyon, iletimi temsil eder ve numunenin moleküler parmak izini oluşturur (Bellisola ve diğ., 2012).

FT-IR spektrometresi, önce bir Michelson interferometresi kullanarak örnek sinyalin interferogramını toplayarak ve daha sonra spektrumu elde etmek için interferogram üzerinde bir Fourier Dönüşümü gerçekleştirerek kızılötesi spektrumları elde eder. İnterferometre, kaynaktan gelen kızılötesi ışını alan ve iki optik olarak ayıran bir ışın dağıtıcı kullanır. Bir ışın sabitlenmiş düz bir aynaya gider. Diğer ışın ise çok kısa bir mesafede hareket eden hareketli düz bir aynaya gider. İki ışın kendi aynalarından geri gelirler ve tekrar karşılaştıklarında birleşirler. İnterferometreden çıkan sinyal, bu iki ışın etkileşiminin sonucudur. Ortaya çıkan sinyale interferogram denir (Gerwert ve diğ., 2010).



Şekil 1.15. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrum

Bir interferogramda, kaynaktan gelen sinyaller her kızılötesi frekans hakkında bilgi verir. Bu sayede tüm frekanslar aynı anda ölçülmektedir. Veri analizi için spektrumun frekansları kullanılır. IR fotonları, atom gruplarının kendilerini bağlayan bağlara göre titremlerine neden olacak kadar enerjiye sahiptir. Fourier dönüşümü adı verilen matematiksel bir fonksiyon, interferogramı yoğunluk-frekans spektrumuna dönüştürmemizi sağlar. Bu dönüşüm, spektrometre bilgisayarı tarafından gerçekleştirilir. Dalga boyuna karşılık gelen absorbans grafiği çizilir (Dutta., 2017; Pradhan ve diğ., 2017; Gerwert ve diğ., 2010).

1.6.3. FT-IR spektroskopisinin avantajları ve uygulamaları

Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, herhangi bir patolojik durumun neden olduğu parametrelerdeki değişiklikleri saptamak için, biyomoleküllerin kompozisyon yapısını ve fonksiyonunu araştırma yeteneğine sahiptir. Bu yöntem, birçok hastalığın teşhisinde ve seçilen ilaçların hastalık durumlarına etkilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Turker-Kaya ve diğ., 2014). Nörolojik hastalıklar, beyinde lipit peroksidasyonu, lipit hasarı ve protein yapısındaki, lipit/protein oranındaki ve membran yapılarındaki değişimler gibi biyokimyasal ve moleküler değişiklikleri tetikler. FT-IR duyarlılığı ile hastalıklara bağlı varyasyonlar aynı anda tanımlanabilir. Her ne kadar birçok farklı IR cihazı mevcut olsada IR spektrumunda yer alan bilgiler aynıdır (Turker., 2012).

FT-IR spektroskopisi, birçok alternatif üzerinde tercih edilmesini sağlayan avantajlara sahiptir. İlk avantajı, moleküllerin orta-kızılötesinde güçlü absorbanslara sahip olmasıdır. Katı, sıvı, gaz, organikler, inorganikler, biyolojik materyaller, saf maddeler ve karışımlar dahil olmak üzere birçok numune tipinin kızılötesi spektrumları ölçülebilir. İkinci avantajı, spektrumların bilgi bakımından zengin olmasıdır. Ölçülen spektrumlar numunenin biyokimyasal durumu hakkında bilgi verir. Bant konumlarındaki kaymalar, bant genişliğindeki değişiklikler ve bantların alan değerleri biyolojik malzemeler hakkında değerli yapısal ve işlevsel bilgiler verir (Toyran ve diğ., 2006). Üçüncü avantajı, spektrumları ölçmek oldukça hızlı ve kolaydır. Ölçümü yapılacak olan örneğin yapısı ve örnekleme tekniği analizin hızını ve kolaylığını etkileyecektir. Bununla birlikte, birçok örneğin infrared spektrumlarını beş dakika veya daha kısa sürede ölçülebilir. Bazı örnekler ve örnekleme teknikleri için birkaç

saniye içinde kalite spektrumları elde edilebilir. Dördüncü avantajı, FT-IR spektroskopisi diğer yöntemlere göre ucuz olmasıdır (Sevinc ve diğ., 2015; Smith, 2011; Caine ve diğ., 2011).



2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Deneyleri

Kocaeli Üniversitesi DETAB biriminde hayvan deneyleri gerçekleştirildi. Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onayı alındı (KOÜ HADYEK 1/6 – 2018) (Ek-D). Çalışmada kullanılan, WAG/Rij sıçanlar kontrol (n=6) ve kafein (n=6) grupları olmak üzere iki gruba ayrıldı. Yeni doğan sıçanların 7-11. günler arasında intraperitoneal olarak 20mg/kg kafein uygulandı. Sıçanların 22. gün sonunda annelerinden ayrılarak ayrı kafeslere konuldu. Hayvanlar 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık siklusunda sabit ısıli bir odada yiyecek ve su alımları serbest tutuldu. Sıçanlar 6. aylarında derin eter aneztezisi altında iken dekapite edilip beyinleri çıkarıldı. Çıkartılan beyin dokularının serebellum ve hipokampus bölgelerine ayrılarak biyofiziksel ve biyokimyasal analizlere kadar -80 °C'de derin dondurucuda tutuldu.

2.2. FT-IR Spektroskopisi Deneyleri

Sıçan beyin bölgelerinden hipokampus ve serebellum, Freeze Dryer (Labconco FreeZone®) kullanılarak dokulardaki suyun uzaklaştırılması için 24 saat boyunca kurutma işlemi gerçekleştirildi. Kurutulmuş hipokampus ve serebellum, agat havan içerisinde sıvı azot yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline getirilen hipokampus ve serebellum numuneleri 2 mg ayrı ayrı tartıldı ve 100 mg kuru potasyum bromür (KBr) ile agat havan içinde homojen olana kadar karıştırıldı. Hazırlanan karışım paslanmaz çelikten yapılmış özel bir aparat içine yerleştirildi, hidrolik preste 5 dakika boyunca 100 kg/cm²'lik basınçta tutuldu. Böylece KBr diski elde edildi. Hazırlanan KBr peletlerinin spektrum eldeleri, 4000-450 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ve 4 cm⁻¹ çözünürlükte Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spektrometresi ile gerçekleştirildi. Sonuçların güvenilirliğini artırmak için hipokampus ve serebellumdan iki tane pelet hazırlandı ve her örnekten iki kez çekim yapıldı. Bu iki çekimden elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak detaylı analizler ve istatistiksel testler bu spektrumlar üzerinde gerçekleştirildi.

Atmosferdeki CO₂ ve H₂O'den soğurma bantları, incelenen doku örneklerinin emme bantlarını kamufle eder. Bu nedenle, atmosferik su buharının etkisini azaltmak için FT-IR spektrometresinden sürekli kuru hava geçirilmektedir. Örnek çekimlerinden önce hava çekimi yapılmakta ve ortaya çıkan spektrum bilgisayar programıyla örnek spektrumundan matematiksel olarak çıkarılmaktadır.

2.3. Bradford Analizi

Bradford protein analizi, solüsyondaki protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir (Cheng ve diğ., 2016). Bu yöntem kullanım kolaylığı, hızlılık, göreceli olarak göz önüne alındığında popülerdir. Coomassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak gerçekleştirildi. Beyin bölgelerinden hipokampus ve serebellumun toplam protein miktar tayinleri Thermo Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit ile gerçekleştirildi. Kit içerisinde hazır olarak bulunan standart sığır albümin (BSA) çözeltilerinden tüplere final BSA konsantrasyonları Tablo 2.1.'deki gibi hazırlanarak standart eğri grafiği çizildi.

Tablo 2.1. Standart eğri hazırlanmasında kullanılan BSA konsantrasyonları

Tüp	Fosfat Buffer	BSA Hacmi	BSA Konsantrasyonu
A	0	300 µL stoktan	2000 µg/ml
B	125 µL	375 µL stoktan	1500 µg/ml
C	325 µL	325 µL stoktan	1000 µg/ml
D	175 µL	175 µL B tüpünden	750 µg/ml
E	325 µL	325 µL C tüpünden	500 µg/ml
F	325 µL	325 µL E tüpünden	250 µg/ml
G	325 µL	325 µL F tüpünden	125 µg/ml
H	400 µL	100 µL G tüpünden	25 µg/ml
I	400 µL	0	0 µg/ml

Beyin bölgelerinin homojenatlarının hazırlanmasına geçilerek, her beyin bölgelerinin örneğinden 5 mg tartıldı. Tartılan örneklerin üzerlerine 1 ml fosfat buffer ekleyerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Hazır olan her homojenattan 30 µL alındı ve üzerine 1,5 ml Coomassie Reagent eklendi. 10 dk inkübe edildikten sonra 595 nm'de

spektrofotometrede okutuldu. Elde edilen sonuçlar standart eğri grafiğine göre değerlendirildi (Ek-B).

2.4. TBARs Testi

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS), tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona giren lipid peroksidasyonunun (malondialdehit) lipid yan ürününün miktarını analiz eder (Monserrat ve diğ., 2017). Test için Cayman markalı TBARs Assay Kit kullanıldı. Kit içerisindeki kimyasallar hazırlandı. 530 mg Tiyobarbitürik Asit (TBA) tartılarak, 150 ml'lik beher içerisine 50 ml seyreltilmiş TBA Asetik Asit ve 50 ml seyreltilmiş TBA Sodyum Hidroksit eklendi. TBA tamamen çözülene kadar karıştırıldı ve renk reaktifi hazırlandı. Standart eğri için gerekli hazırlıklar yapıldı. Kit içerisindeki MDA solüsyonlarından 125 µm'lik bir stok çözeltisi elde etmek için 250 µl MDA standardı 750 µl distile su ile seyreltildi. Tablo 2.2.' de gösterilen µl'lerde her tüpe 125 µl'lik stok MDA çözeltisinden eklendi.

Tablo 2.2. Standart eğri hazırlanmasında kullanılan MDA konsantrasyonları

Tüp	Stok MDA µl	Su µl	MDA Konsantrasyonu(µM)
A	0	1000 µL	0 µg/ml
B	5 µL	995 µL	0,625 µg/ml
C	10 µL	990 µL	1,25 µg/ml
D	20 µL	980 µL	2,5 µg/ml
E	0 µL	960 µL	5 µg/ml
F	80 µL	920 µL	10 µg/ml
G	200 µL	800 µL	25 µg/ml
H	400 µL	600 µL	50 µg/ml

Hazırlanan cam tüplere 1,5 ml renk reaktifi eklendi ve 20 dk boyunca beher içerisinde kaynatıldı. Kaynatma sonrası tüpler 10 dk buza alınarak reaksiyona son verilerek rpm x 1600'de 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar 1 ml şeklinde küvetlere alınarak okutuldu. Elde edilen sonuçlarla standart eğri grafiği hazırlandı.

Örneklerin hazırlanması için ise hipokampus, serebellumdan 25 mg tartılarak üzerine 250 µl Fosfat Buffer eklenerek ve homojenize edildi. İşlem sonrası rpm x 1600'de 20 dk santrifüj edildi. Analiz için oluşan süpernatantlardan tüplere 100 µl örnek alınarak

üzerine 1,5 ml renk reaktifi eklendi. Prosedürdeki kaynatma-soğutma uygulamaları uygulandı. Tekrar rpm x 1600'de santrifüj edilerek süpernatantlar okutulup kaydedildi ve sonuçlar standart eğri grafiğinde (Ek-C) değerlendirildi.

2.5. Analiz

2.5.1. FT-IR spektral analiz

Gruplar arasındaki bant alanı, bant pozisyonu ve bant genişliği açısından spektral farklılıkları ortaya çıkarmak için her bir spektrum Perkin Elmer Spektrum One programı ile ayrıntılı olarak analiz edildi. Bant pozisyonları (dalga sayısı) değerleri bantların ağırlık merkezleri üzerinden değerlendirilerek pik yüksekliğinin %70'i alınarak hesaplandı. Bant genişliği pik yüksekliğinin %70 'inden elde edilen cm birimi cm^{-1} e çevrilerek hesaplandı. Bant alan değerleri 4000-2000-900 cm^{-1} noktalarına baseline düzeltilmesi uygulanarak, piklerin başlangıç ve bitiş noktaları belirlendi. Bant alan değerleri bilgisayar yazılımı tarafından başlangıç ve bitiş değerlerinin girilmesiyle otomatik olarak hesaplandı (Turker-Kaya ve diğ., 2016).

Gruplar arasındaki spektral değişimleri görsel olarak göstermek amacıyla, her gruba ait örneklerin ortalaması alınarak, baseline düzeltilmesini yapıp aynı program ile normalize edildi. Bu ön işlemler uygulanan spektrumlar istatistiksel analiz için değil sadece farklılıkları göstermek için kullanıldı. Ayrıntılı istatistiksel analiz ve data değerlendirilmesi ön işlem uygulanmamış spektrumlar üzerinden gerçekleştirildi.

Deneysel koşullardan kaynaklanan numune kalınlığı gibi farklılıkları en aza indirilebilmek için bazı özel bölgelerin alan oranları hesaplandı. Lipit/protein oranı, CH_2 asimetric ve simetric gerilme (2924 cm^{-1} - 2851 cm^{-1}) bantlarının alan toplamının amid I ve amid II (1645 cm^{-1} - 1547 cm^{-1}) bantlarının alan toplamının oranlanmasıyla hesaplandı. Olefinik = CH/lipit ve C=O/lipit oranları olefinik=CH (3012 cm^{-1}) ve C=O gerilme (1739 cm^{-1}) bantlarının bant alanlarının toplam doymuş lipite (CH_2 asimetric ve simetric gerilme bant alanlarının toplamı) bölünerek hesaplandı.

2.5.2. Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA)

Kümeleme analizi, deneysel sonuçları değerlendirme ve spektral verileri olmadan kontrol etmeyi, işlenmiş örnekler arasında ayırım yapma imkanı sunar. Tüm numuneler arasında ve yakınlıklarına göre dendrogram formundaki bilgilerini gösterir ve ara

nokta mesafelerini test eder (Mora ve diğ., 2018).

Bu çalışmada hiyerarşik kümeleme metodu örneklerin ayrımı için uygulanmıştır. Hiyerarşik kümeleme analizi için OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics, Ettlingen, Germany) programı kullanıldı. Kümeleme analizi için spektrumların analizi 1650 - 1540 cm^{-1} spektral bölgesinde gerçekleştirildi.

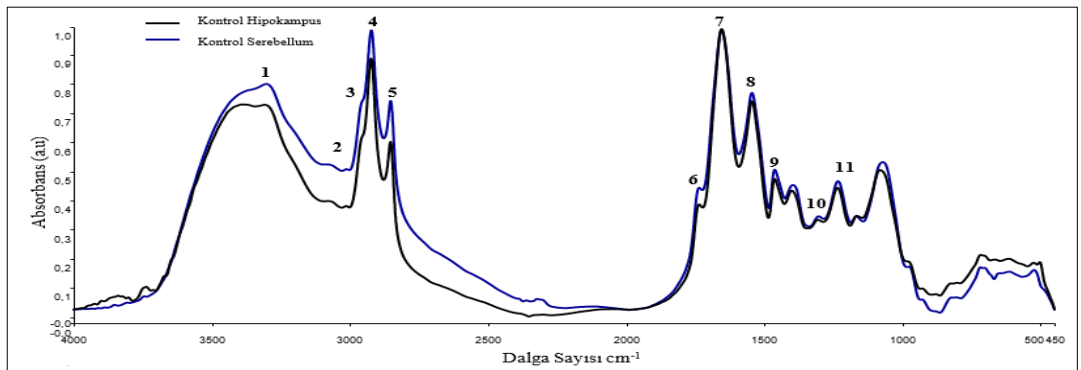
2.5.3. İstatistiksel analiz

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde değerlendirildi. Sonuçlar IBM SPSS Statistics 22 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Kontrol WAG/Rij ve kafein uygulanan sıçan grupları arasındaki değişimler ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığının hesaplanması için One-Way Anova testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05^*$ ve $p < 0,001^{**}$ şeklinde belirlendi

3. BULGULAR

3.1. FT-IR Spektroskopisi Bulguları

FT-IR spektroskopisi, biyomoleküllerin yüksek çözünürlükte tanımlanmasını sağlar. Biyomoleküllerde bulunan fonksiyonel grupların titreşimleri, beyin dokusunun absorpsiyon FT-IR spektrumunda farklı dalga sayı değerlerinde görülen farklı modları temsil eder. Farklı modların birbirinden ayrılmasının nitel (pik frekansının belirtilmesi) ve nicel analize (pik alanların/absorpsiyon değerlerinin hesaplanması) olanak sağlar (Turker-Kaya ve diğ., 2016; Akkas ve diğ., 2007). Böylelikle biyolojik sistemlerle ilgili biyofiziksel parametreler üzerinden moleküler bilgi sağlar. Özellikle dört biyomolekül yani protein, lipid, karbohidrat ve nükleik asitlerle bilgileri aynı anda verdiği için oldukça avantajlı bir tekniktir. Çalışmamızda FT-IR spektroskopisinin sözü edilen avantajlarından faydalanarak WAG/Rij sıçanlara neonatal dönemde uygulanan kafenin hipokampus ve serebellum bölgelerinde meydana getirdiği biyofiziksel etkiler incelendi. Ayrıca çalışmaya biyokimyasal testler dahil edildi. Sıçan beyin bölgelerinden hipokampus ve serebellum örneklerinden elde edilen FT-IR spektrumları, Şekil 3.1.'de gösterildi. Şekilden görüldüğü üzere, sıçan hipokampus ile serebellum bölgelerine ait spektrumlar birçok bant içeren kompleks bir yapıdır ve her bir dalga sayısına karşılık gelen bant adlandırmaları Tablo 3.1.'de verildi (Severcan ve diğ., 2007).



Şekil 3.1. WAG/Rij Sıçan beyin bölgelerinden hipokampus ve serebellum örneklerinden elde edilen FT-IR spektrumu

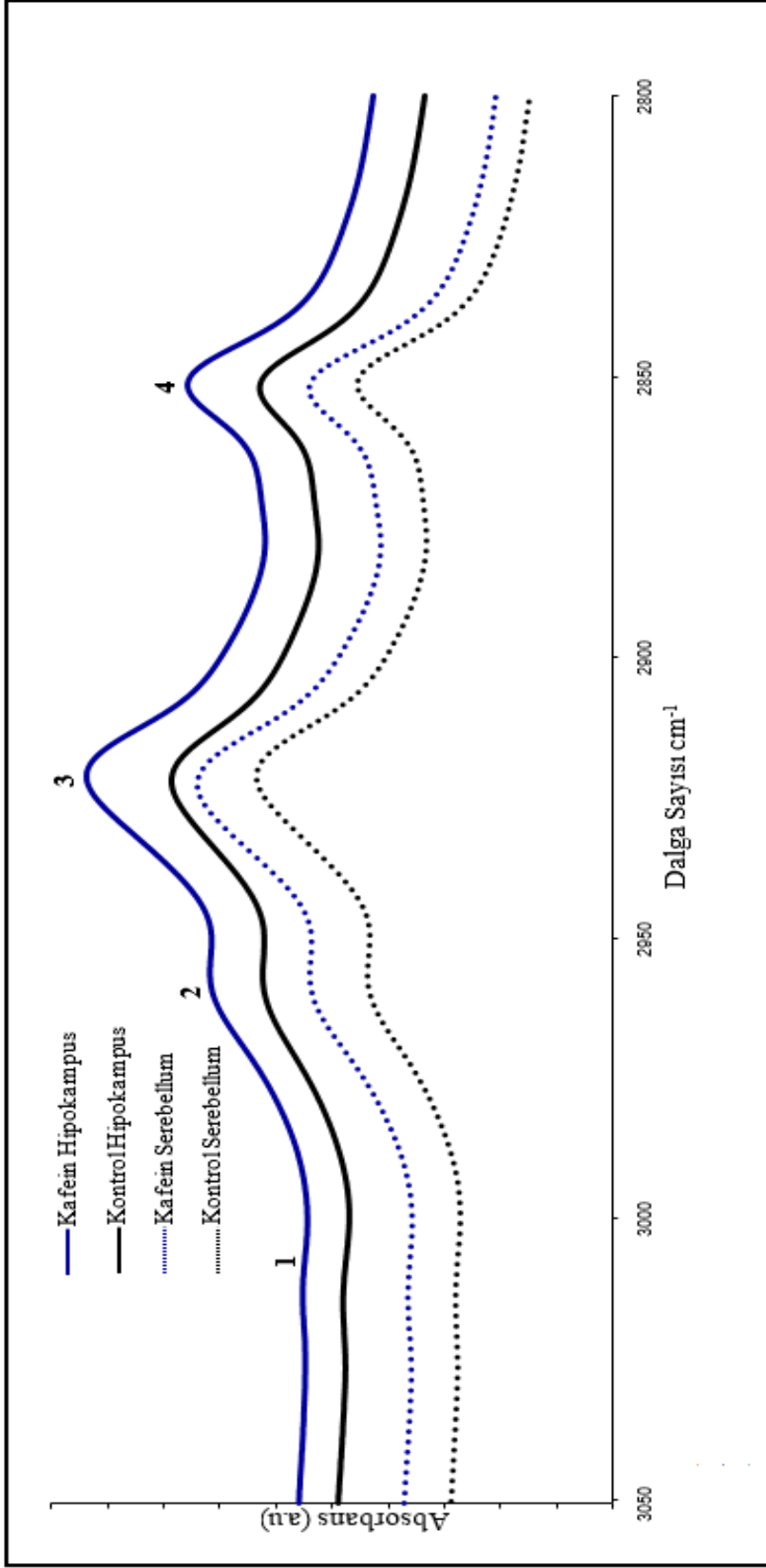
Tablo 3.1. Literatüre dayalı sıçan hipokampus ve serebellum FT-IR spektrumlarındaki ortalama bant frekansları ve bantların tanımlanması

BANT NO	DALGA SAYISI CM^{-1}	SPEKTRAL BANTLARIN AÇIKLAMASI
1	3350	Amid A: protein
2	3012	Olefinik HC=CH gerilme: doymamış lipit
3	2956	CH ₃ asimetrik gerilme: esas olarak lipit, az miktarda protein, karbonhidrat ve nükleik asit
4	2925	CH ₂ asimetrik gerilme: esas olarak lipit, az miktarda protein, karbonhidrat ve nükleik asit
5	2852	CH ₂ simetrik gerilme: esas olarak lipit, az miktarda protein, karbonhidrat ve nükleik asit
6	1740	Doymuş ester C = O gerilme: fosfolipit, kolesterol ester, trigliserit
7	1645	Amid I (protein C=O gerilme): protein
8	1545	Amid II (C=N ve N-H gerilme): protein
9	1305	Amid III: protein
10	1229	PO ₂ asimetrik gerilme: fosfolipit ve nükleik asit
11	1080	PO ₂ simetrik gerilme: fosfolipit ve nükleik asit

WAG/Rij sıçanlarının kontrol ve kafein örnekleri arasındaki spektral farklılıkları daha ayrıntılı incelemek amacıyla spektrumlar 3050-2800 cm^{-1} ve 1800-900 cm^{-1} olmak üzere iki ayrı bölgede gösterildi. Analiz sonuçlarının numerik verileri ise Ek-A'da tablo olarak verildi.

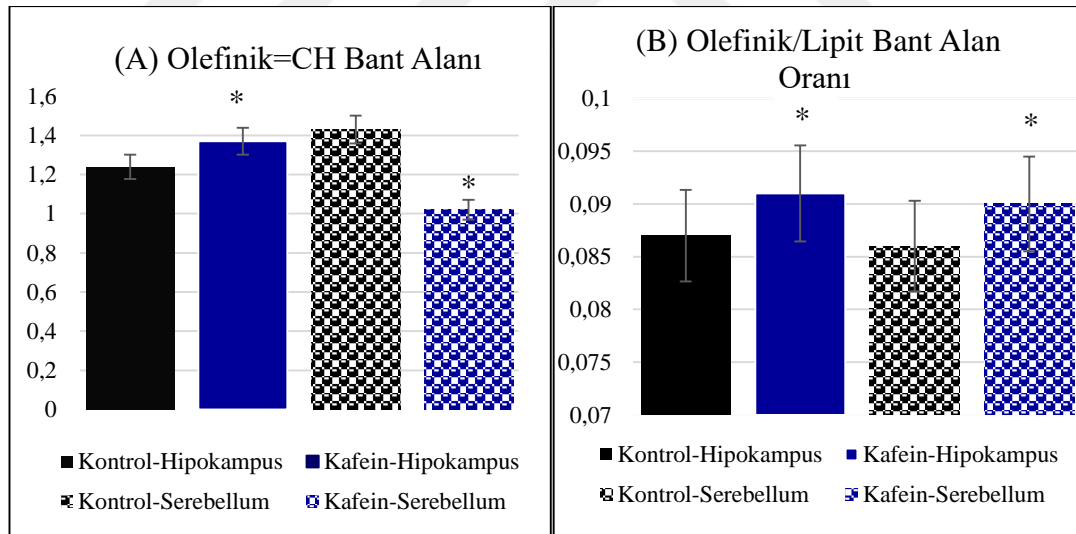
3.1.1. 3050-2800 cm^{-1} frekans aralığı

3050–2800 cm^{-1} frekans aralığı, lipit ve protein makromoleküllerinin asimetrik ve simetrik gerilme titreşimleri bulunan bantları içermektedir. Bu bantlar, olefinik=CH (3012 cm^{-1}), CH₃ asimetrik (2958 cm^{-1}), CH₂ asimetrik (2925 cm^{-1}) ve simetrik (2850 cm^{-1}) gerilme titreşimleridir (Staniszewska ve diğ., 2014; Cakmak ve diğ., 2011; Akkas ve diğ., 2007).



Şekil 3.2. 3050-2800 cm⁻¹ bölgeleri arasında WAG/Rij sıçanların kontrol ve kafein gruplarının hipokampus ve serebellum gruplarına ait FT-IR spektrumları

Şekil 3.2.'de WAG/Rij sıçanların kontrol ve kafein gruplarının hipokampus ve serebellum örneklerine ait 3050-2800 cm^{-1} frekans aralığındaki spektrumları göstermektedir. 3050 ile 2800 cm^{-1} frekans aralığındaki 1 numaralı bant 3012 cm^{-1} 'deki olefinik bantdır. Olefinik bantı, HC=CH gruplarının doymamış yağ asitlerinde C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Turker-Kaya ve diğ., 2016). Şekil 3.3.(A)'da olefinik bant alan değerleri gösterilmektedir. Kontrol hipokampus ile kontrol serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol serebellum grubunun olefinik bant alanının yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Şekilde 3.3.(A)'da görüldüğü üzere, kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarının bant alan değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında ise, kafein uygulanan serebellum gruplarında ise anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu bulundu.

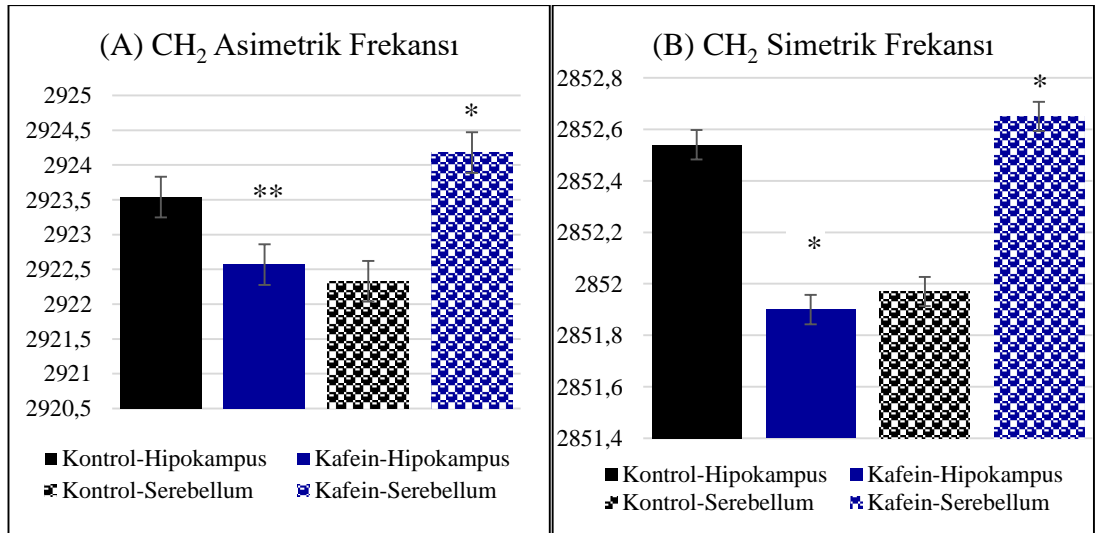


Şekil 3.3. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının olefinik=CH gerilme bant alan (A) ve olefinik/lipit alan (B) oran değerleri

Şekil 3.3.(B)'de olefinik/lipit bant alan oran değerleri gösterilmektedir. Kontrol hipokampus ile kontrol serebellum gruplarının bant alan oran değerleri karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus grubunun yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Ayrıca, kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları ve kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein

uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarında anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu bulundu.

3 numaralı CH_2 asimetrik (2925 cm^{-1}) ve 4 numaralı CH_2 simetrik (2850 cm^{-1}) modları membran lipitlerinin lipit açıl zincirlerinin C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanır (Ziegler ve diğ., 2016; Toyran ve diğ., 2006). Şekil 3.4(A)'da CH_2 asimetrik bandının frekans değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ile kontrol serebellum gruplarının CH_2 asimetrik frekans değerleri karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus grubunun yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus gruplarını karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarının asimetrik frekans değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,001^{**}$) azalma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum gruplarını karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarında ise anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma bulundu. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

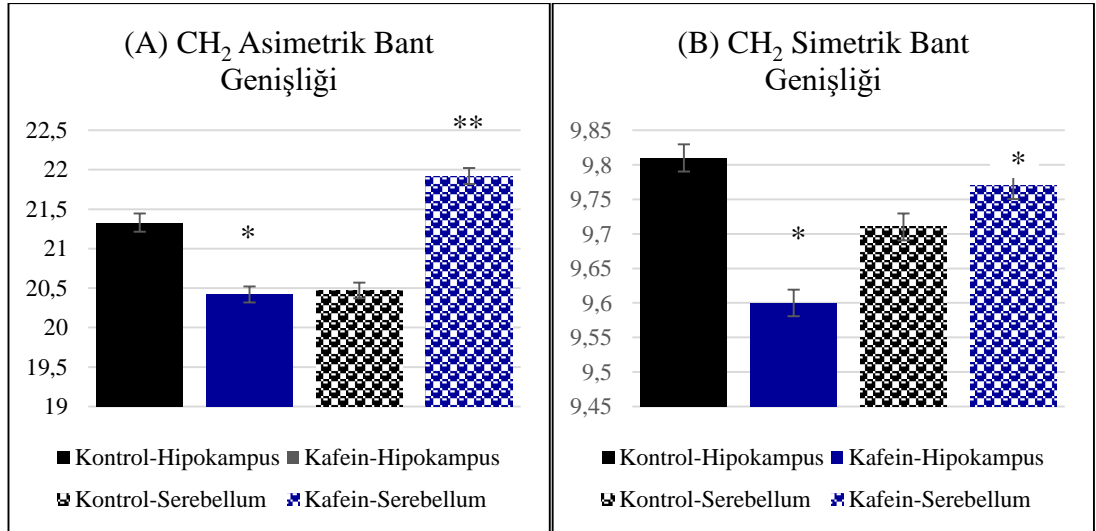


Şekil 3.4. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının CH_2 asimetrik frekansı (A) ve simetrik frekansı (B) değerleri

Şekil 3.4(B)'de CH_2 simetrik bandının frekans değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ile kontrol serebellum gruplarının CH_2 simetrik frekans değerleri karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus grubunun yüksek değerlerde olduğu tespit

edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus gruplarını karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarının simetrik frekans değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarında ise anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi

Şekil 3.5.'de CH_2 asimetrik(A) bant genişliği değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ile kontrol serebellum gruplarının CH_2 asimetrik bant genişliği değerleri karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarının bant genişlik değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarında ise anlamlı derecede ($p<0,001^{**}$) artma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

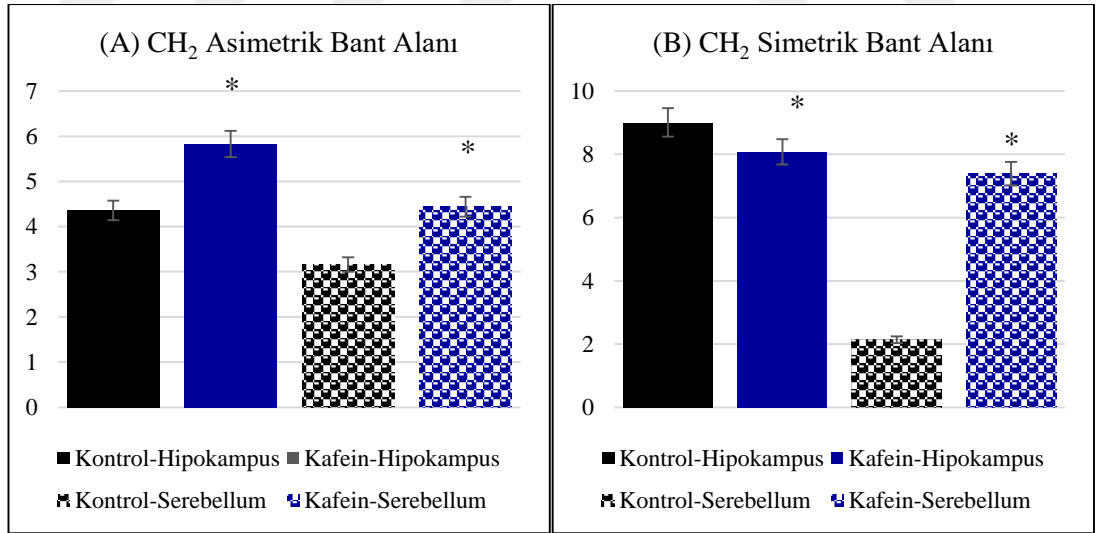


Şekil 3.5. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının CH_2 asimetrik(A) ve simetrik(B) bant genişliği değerleri

Şekil 3.5.(B)'de CH_2 simetrik bant genişlik değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ile kontrol serebellum gruplarının, kontrol hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan

hipokampus gruplarını karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarının bant genişlik değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarında ise anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

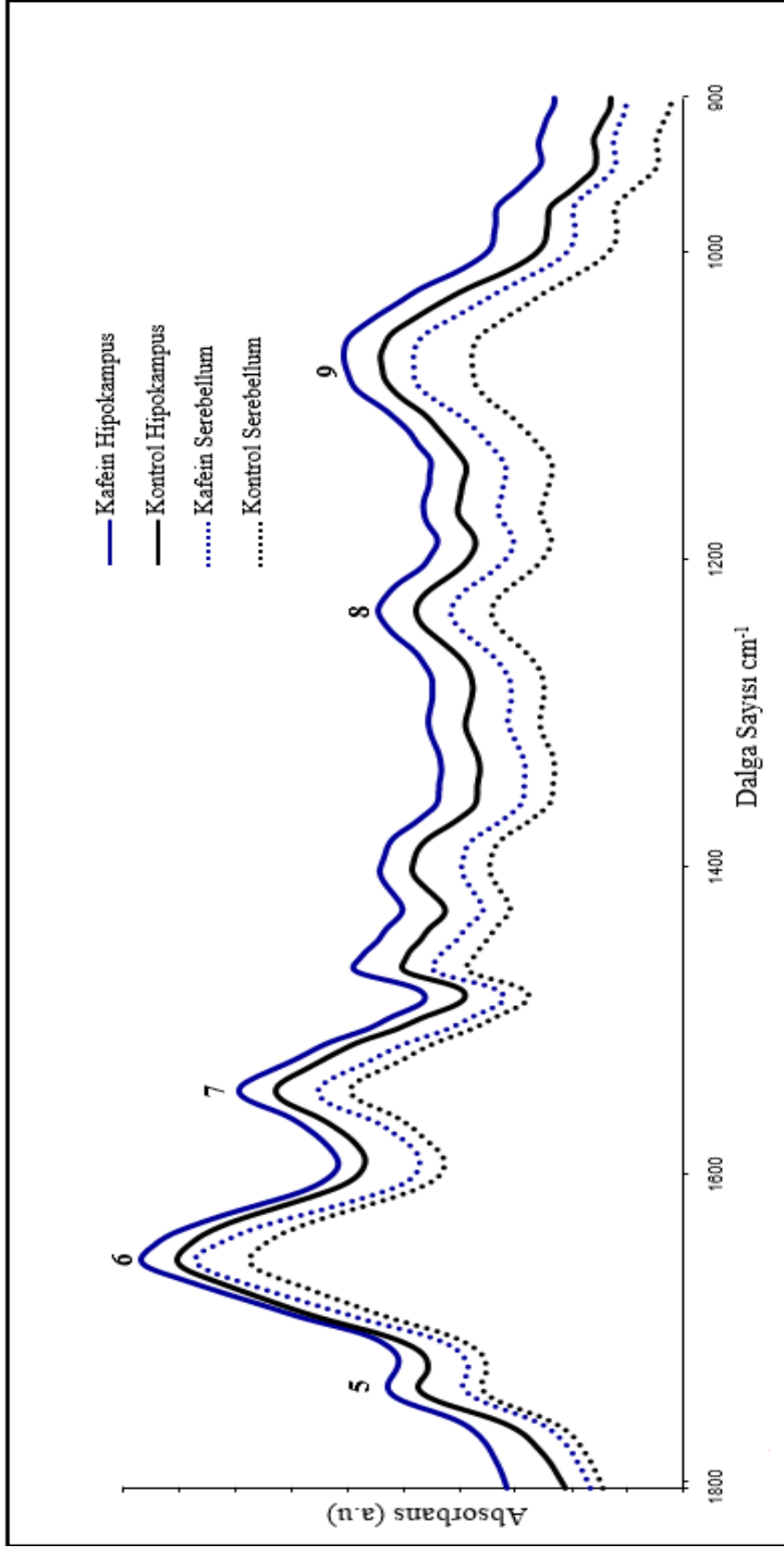
Şekil 3.6.'da CH_2 asimetrik(A) ve simetrik(B) bant alan değerleri gösterilmektedir. Kontrol hipokampus ile kontrol serebellum gruplarının CH_2 asimetrik ve simetrik bant alan değerleri karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus gruplarının daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Her iki bant içinde, kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus ve kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre kafein uygulanan gruplarının bant alan değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artış gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.



Şekil 3.6. Kontrol ile kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarına ait CH_2 asimetrik (A) ve simetrik (B) bant alan değerleri

3.1.2. 1800-900 cm^{-1} frekans aralığı

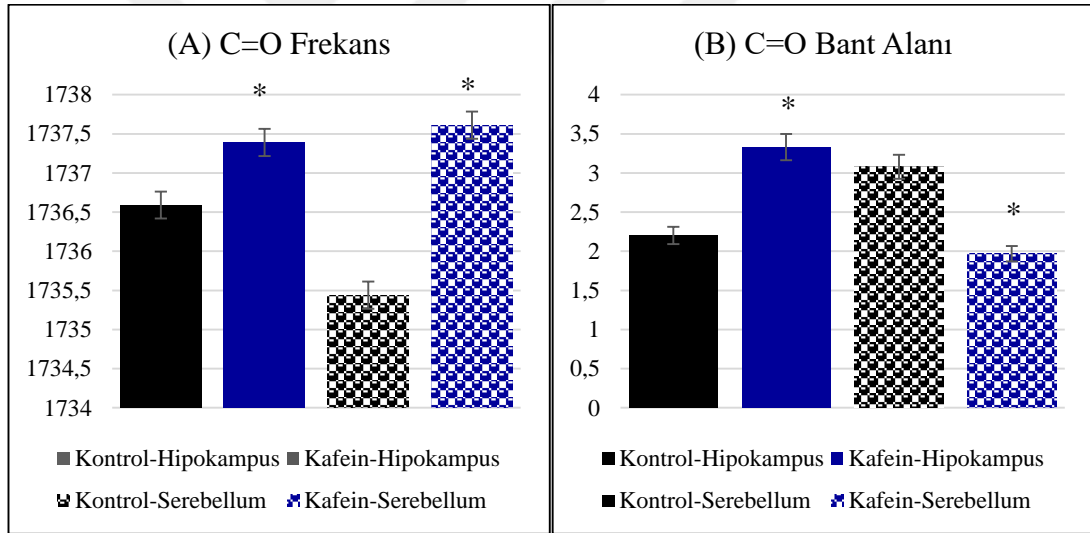
Şekil 3.7.'de 1800-900 cm^{-1} bölgeleri arasında WAG/Rij gruplarının FT-IR spektrumlarını göstermektedir.



Şekil 3.7. 1800-900 cm^{-1} bölgeleri arasında WAG/Rij sıçanların kontrol ve kafein gruplarının hipokampus ve serebellum gruplarına ait FT-IR spektrumları

5 numaralı (1740 cm^{-1}) bant, karbonil grubuna ait C=O gerilme titreşimlerine dayanır ve trigliseritlerden, kolesterol esterlerinden ve fosfolipitlerden kaynaklanmaktadır (Turker-Kaya ve diğ., 2016; Staniszewska ve diğ., 2014; Hernández-Martínez ve diğ., 2014).

Şekil 3.8(A)'da C=O bandın frekansı verilmektedir. Kontrol hipokampus ve serebellum gruplarının C=O frekans değerleri karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus ve kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre kafein uygulanan gruplarının frekans değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artış gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

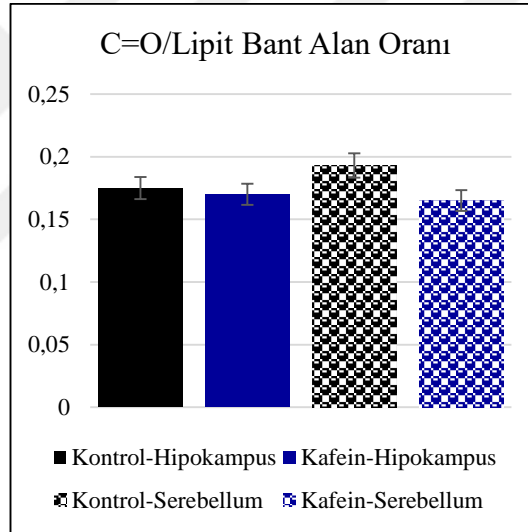


Şekil 3.8. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının C=O frekans(A) ve C=O bant alan(B) değerleri

Şekil 3.8.(B)'de C=O bant alan değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ve serebellum gruplarının C=O bant alan değerleri karşılaştırıldığında, kontrol serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarında anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum bant alan değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması

yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

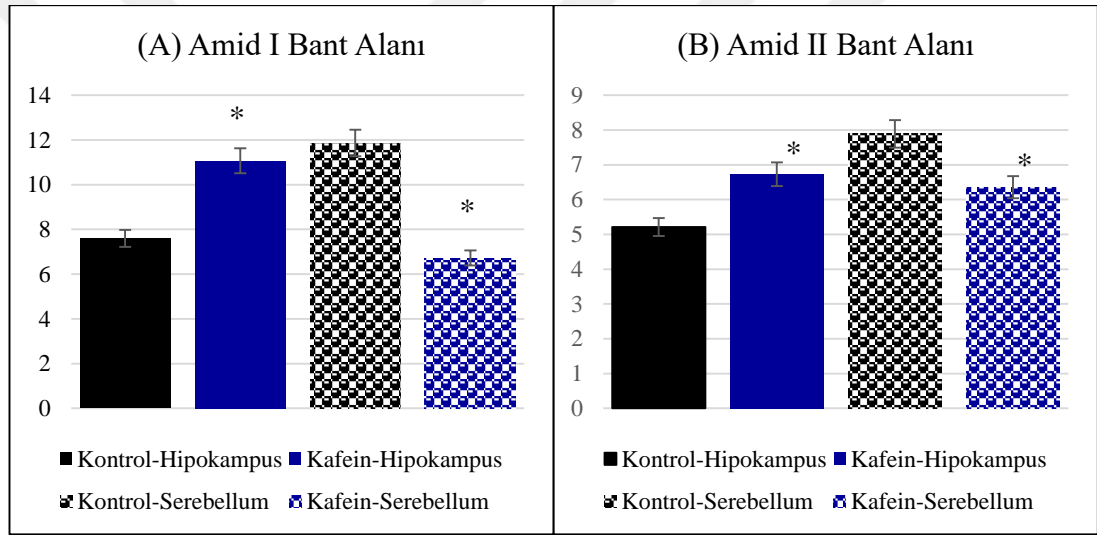
Şekil 3.9.'da C=O/lipit bant alan oran değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ve serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus ve kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre kafein uygulanan gruplarının bant alan değerlerinde azalma görüldü. Ancak tüm bu alan oran değerindeki karşılaştırmalar sonucu görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.



Şekil 3.9. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının C=O/Lipit bant alan oran değerleri

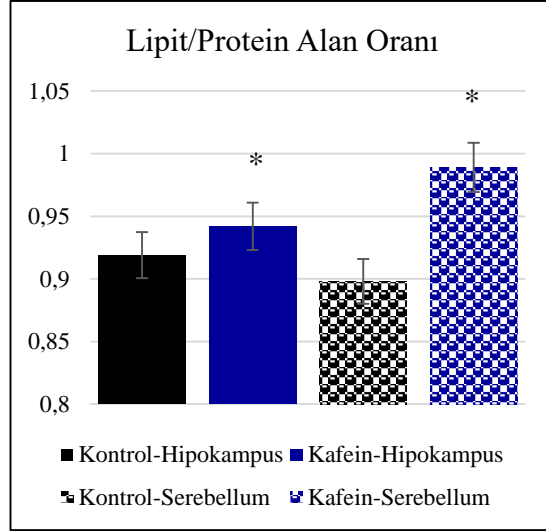
6 numaralı Amid I (1645 cm^{-1}) ve 7 numaralı Amid II (1540 cm^{-1}) bantlar, yapısal proteinlerin titreşimlerine karşılık gelir. Amid bantları, peptid bağının farklı titreşim modlarını temsil eder. Amid I bandı C=O proteinlerinin gerilme titreşimleriyle karakterize edilir. Amid II bandı ise N-H bükülmesine ve proteinlerin C-N gerilme titreşimleriyle karakterizedir (Alujoju ve diğ., 2019; Bortoletto ve diğ., 2018; Zohdi ve diğ., 2015; Kong ve Yu., 2007).

Şekil 3.10.'da Amid I(A) ve Amid II(B) bant alanları değerleri gösterilmektedir. Her iki bant alan değerleri için, kontrol hipokampus ve serebellum grupları karşılaştırıldığında kontrol serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus gruplarını karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarında anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarının bant alan değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.



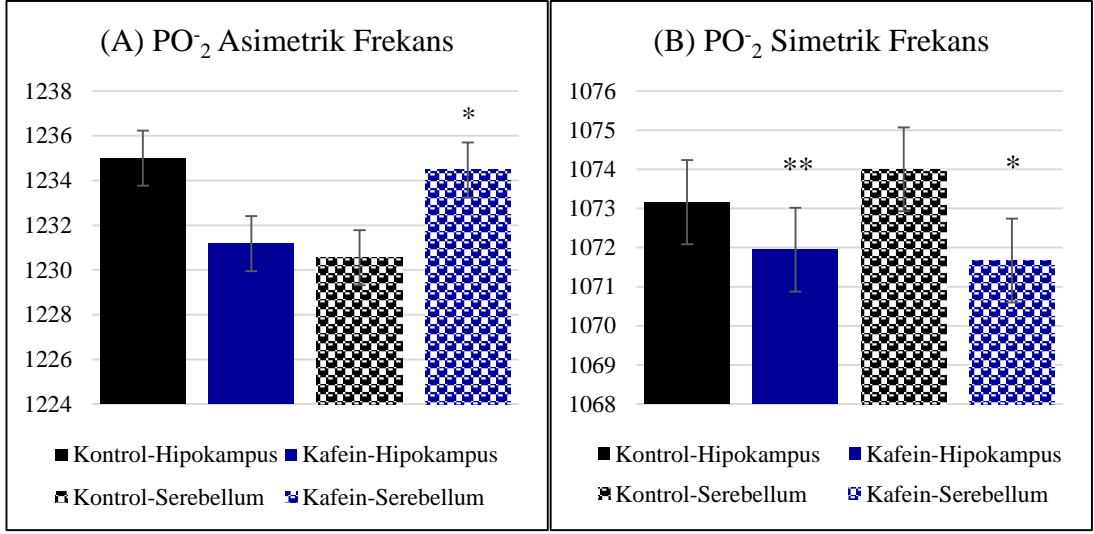
Şekil 3.10. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının Amid I (A) ve Amid II(B) bant alan değerleri

Şekil 3.11.'de lipit/protein alan oran değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ve serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus ve kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre kafein uygulanan gruplarının alan oran değerlerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artış gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.



Şekil 3.11. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının lipit/protein alan oran değerleri

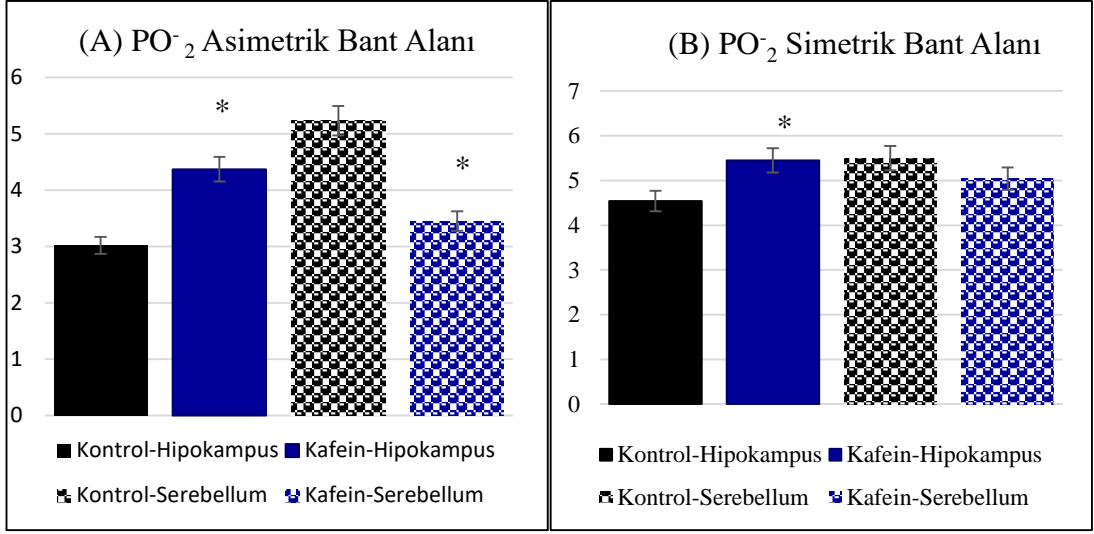
Şekil 3.12.'de PO_2 asimetric(A) ve simetric(B) frekans değerleri verilmektedir. Kontrol hipokampus ve serebellum gruplarını PO_2 asimetric frekans değerleri karşılaştırdığında, kontrol hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarında azalma gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum gruplarının karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarının frekans değerlerinde anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) artma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.



Şekil 3.12. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının PO₂ asimetric(A) ve simetrik(B) frekans değerleri

Kontrol hipokampus ve serebellum gruplarının PO₂ simetrik frekans karşılaştırdığında, kontrol serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarının anlamlı derecede ($p < 0,001^{**}$) azalma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarının anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

Şekil 3.13.'de PO₂ asimetric(A) ve simetrik(B) bant alan değerleri gösterilmektedir. Kontrol hipokampus ve serebellum gruplarının asimetric bant alan değerleri karşılaştırdığında, kontrol serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarında anlamlı derecede artma ($p < 0,05^*$) gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarının bant alan değerlerinde anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) azalma gözlemlendi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.



Şekil 3.13. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarının PO₂ asimetrik(A) ve simetrik(B) bant alan değerleri

Kontrol hipokampus ve serebellum gruplarının PO₂ simetrik(B) bant alan değerleri karşılaştırıldığında, kontrol serebellum grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi. Şekil 3.13.(B)'de görüldüğü üzere, kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarında anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) artma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarının bant alan değerlerinde azalma gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının karşılaştırılması yapıldığında ise kafein uygulanan hipokampus grubunun daha yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

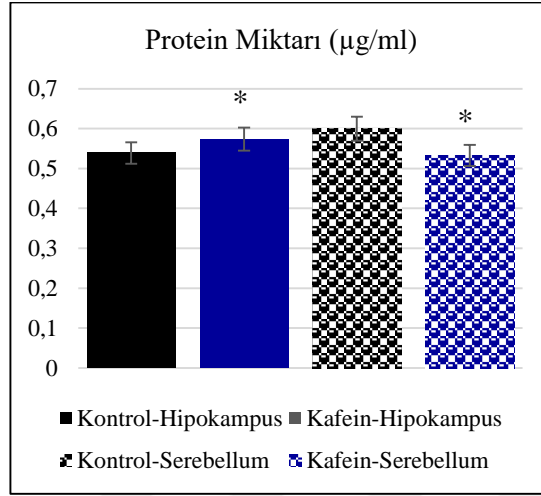
3.2. Biyokimyasal Testler

FT-IR çalışmasının yanı sıra protein miktar tayini için Bradford, lipid peroksidasyonu varlığı belirlenmesi için ise TBARs testleri gerçekleştirildi.

3.2.1. Bradford testi

Şekil 3.14.'de görüldüğü üzere protein miktarı kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarında anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) artma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarında anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) azalma gözlemlendi.

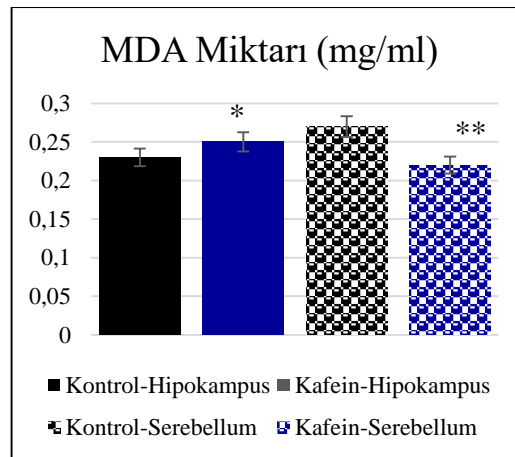
Sonuçlar FT-IR çalışmalarındaki amid I ve amid II bant alan değeri sonuçlarını destekler niteliktedir.



Şekil 3.14. Kontrol ile kafein hipokampus ve serebellum gruplarına ait protein miktarları

3.2.2. TBARs testi

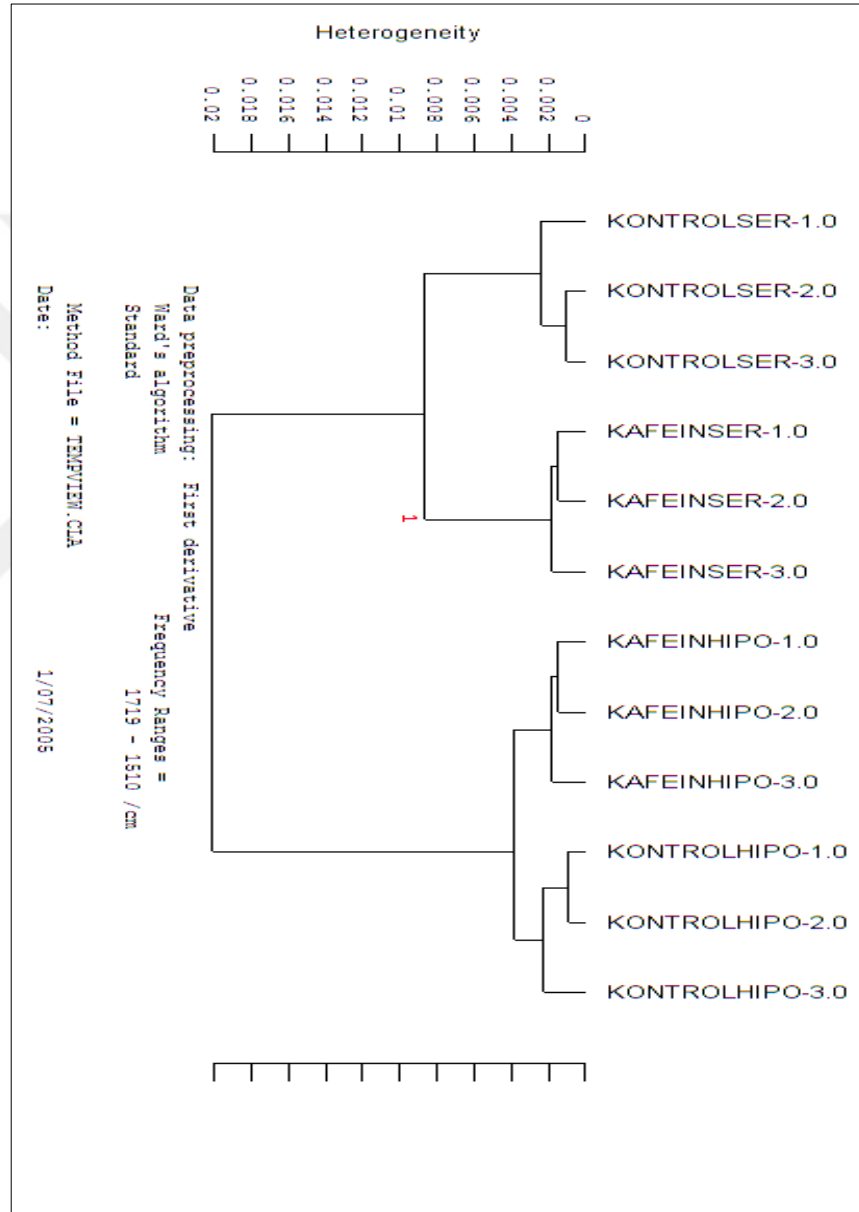
Şekil 3.15.'de görüldüğü üzere MDA miktarı, kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan hipokampus gruplarında anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) artma gözlemlendi. Kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kafein uygulanan serebellum gruplarında anlamlı derecede ($p < 0,001^{**}$) azalma gözlemlendi. Olefinik bant alan değerlerindeki sonuçlar destekler niteliktedir.



Şekil 3.15. Kontrol ile kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarına ait MDA miktarı

3.3. HCA Analizi

Şekil 3.16.'de 1700-1600 cm^{-1} bölgesinde gruplar arasındaki spektral farklılıklara bağlı olarak, grupları ayırt etmek üzere kümeleme analizi yapıldı. HCA analizine göre kontrol ve kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarına ait spektrumlar %100 heterojenite ile başarılı bir şekilde birbirinden ayrıldı.



Şekil 3.16. 1700-1610 cm^{-1} spektral aralığındaki kontrol ve kafein hipokampus ve serebellum gruplarına ait HCA dendrogramı

4. TARTIŞMA

Literatüre göre kafein ve epileptik nöbetler arasında karmaşık bir etkileşim vardır (Chroscinska-Krawczyk ve diğ., 2016). Bu etkileşimin açığa çıkartılması oldukça önemlidir. Hayvan modellerinde özellikle de absans epilepsisi modellerinde, kafeinin nöbet duyarlılığı, erken yaşta konvülsiyonlar ve travmatik beyin hasarı sonrası faydalı etkileri rapor edilmiştir. Bu etkiler yaşa, prokonvülsan, nöbet modeline, kafein dozuna ve uygulama yöntemine bağlıdır. Örneğin, akut olarak uygulanan kafeine maruz kalındığında, nöbet duyarlılığını arttırıcı etkisi tespit edilmiştir (Koert ve diğ., 2018; Tchekalarova ve diğ., 2009). Ayrıca Germé ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, genetik absans epilepsi sıçan modelinde intrakraniyal olarak uygulanan akut kafeinin SWD ve EEG kayıtları üzerindeki etkileri incelenmiş. SWD'lerin sayısı ve süresi, başlangıçtaki EEG kaydına kıyasla düşük dozlu (10 mg/kg) kafeine maruz kaldıktan sonra doza bağlı olarak azalma bulunmuştur (Germé ve diğ., 2015). Bir başka çalışmada sıçanlarda, düşük dozda kafeinin (0,5 mg/kg), epilepside ani ölümle ilişkili olabilecek nöbet kaynaklı solunum durması insidansını önemli ölçüde azaltmıştır (Koert ve diğ., 2018). Diğer taraftan kafeinin epilepsili ve epilepsisi olmayan kişilerde nöbetleri tetiklediği özellikle toksik doz kafein alımından veya uzun süre kafein alımından sonra nöbetler meydana geldiği literatürde belirtilmektedir (Babu ve diğ., 2011; Iyadurai ve Chung., 2007). Sonuç olarak düşük ve yüksek dozda uygulanan kafeinin epileptik nöbetleri tetikleyici ya da inhibe edici etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunsa da, kafeinin söz konusu etkilerini ortaya koyan moleküler mekanizmanın açığa çıkartılması önem arz etmektedir. Çalışmamızda belirtilen konuya katkı sağlamak amacı ile komorbiditelerle birlikte genetik olarak belirlenmiş absans epileptogenezinin hayvan modelleri olarak kabul edilen (Russo ve Citraro., 2018) WAG/Rij sıçanlarda neonatal dönemde uygulanan kafeinin hipokampus ve serebellum bölgelerindeki biyofiziksel etkileri moleküler seviyede FT-IR spektroskopisiyle incelendi. FT-IR spektroskopisi sonuçları, kafein uygulanan hipokampus ve serebellum bölgelerindeki, lipid ve proteinlerin miktarı, yapısı ve içeriğinde önemli değişiklikler meydana getirdiğini

ortaya koydu. Elde edilen sonuçlar ile bazı biyokimyasal testlerle desteklenerek karşılaştırılmalı olarak incelendi.

Beyin çoğunlukla karmaşık polar fosfolipitler, sfingolipitler, gangliositler ve kolesterol içeren lipit bakımından zengin bir organdır. Bu lipitler, beyindeki hücre membran yapısı ve fonksiyonunda rol oynarlar (Vickers ve diğ., 2009). Her ne kadar lipit sınıfları genel olarak polar kafa grupları tarafından tanımlanmış ve sınıflandırılmış olsalar da omurgalarına bağlı olan açıl zincirleri, uzunluk ve doymuşluk açısından çok çeşitlidir. Genel olarak, uzunluk ve doymuşluk derecesi membranlara, kalınlık, akışkanlık ve mikrodoman düzeneğine özgü fiziksel özellikler sağlar (Miranda ve diğ., 2019). Lipit açıl zincir esnekliği membran kalınlığı ile doğrudan ilişkili ve yapısal bir parametredir. Lipit dinamiği ise membran akışkanlığı ve geçirgenliği ile ilgili fonksiyonel bir parametredir. Bu parametreler, sinyal iletimi, çözünen taşınımı ve membranlarla bağlantılı enzimlerin aktivitesi gibi birçok membran fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Casares ve diğ., 2019; Ozek ve diğ., 2014). Epileptik nöbetlerin oluşması hücre membranı üzerinde devamlı ve ani olarak meydana gelen aksiyon potansiyelinin bir sonucu olduğu gözönünde bulundurulursa, bahsedilen parametrelerin incelenmesi kafeinin nöbet oluşumuna katkısı olup olmadığına dair literatüre ayrıntılı bilgi sağlayacaktır.

Olefinik=CH bandının (3012 cm^{-1}) alanı ve olefinik/lipit oranı, doymamış yağ açıl zincirlerinin ve/veya lipit peroksidasyon son ürünlerinin yapısındaki çift bağ konsantrasyonunun seviyesi hakkında bilgi verir (Turker-Kaya ve diğ., 2014a). Bu nedenle, bu bandın alan ve absorpsiyon değeri, lipit peroksidasyon indeksi olarak kullanılır (Severcan ve diğ., 2005). Verilerimize göre olefinik alanının, doymuş lipitlerden kaynaklanan bantların alanlarının toplamının oranı ile hesaplanan olefinik/lipit oranının kafein uygulanan hipokampus ile serebellum gruplarında anlamlı derecede ($p<0,05^*$) arttığı bulundu. Diğer taraftan, olefinik bant alanında hipokampus grubunda anlamlı derecede artma ($p<0,05^*$) ve serebellum grubunda anlamlı derecede azalma ($p<0,05^*$) gözlemlendi. Lipit peroksidasyon reaksiyonları sırasında doymamışlık kaybı, MDA, lipit aldehitler ve alkil radikalleri gibi lipit peroksidasyon ürünlerindeki çift bağların varlığı ile telafi edildiğinden hipokampusteki olefinik bant alanındaki ve olefinik/lipit oranındaki artışın nedeni lipit peroksidasyon son ürünlerinin birikmesinden kaynaklanmaktadır. Bu ürünler, eşik

konsantrasyonunun üstünde, apoptoz veya nekrotik hücre ölümüne neden olarak hücrenin ekstra veya hücre içi bölgesine salınır (Severcan ve diğ., 2005). Dolayısıyla, hipokampusta kafein uygulaması ile lipid peroksidasyonunun tetiklendiği, hali hazırda literatüre göre (Turker ve diğ., 2014a) sadece absans nöbetlerin etkisi ile gerçekleşen bu olayın kafein etkisiyle daha da fazlaştığı yorumu yapılabilir. Diğer taraftan serebellumda tespit edilen olefinik bant alanındaki azalma ise doymamış yağ lipid içeriğinde azalma ya da lipid peroksidasyon ürünlerindeki düşüşten kaynaklı olabilir. Olefinik bant alanında serebellum için bulunan bu azalma olefinik/lipit oranına azalma şeklinde yansımaları beklenirken bu sonuçlarımıza göre bu oranda artma bulduk. Olefinik/lipit oranında serebellum için olefinik bant alanındaki azalmaya rağmen tespit edilen bu artma çok yoğun miktarda doymuş yağların miktarının artmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 3.3.). Serebellum bölgesinde kafein etkisiyle meydana gelmiş olan bu artış olefinik bant alanındaki azalmayı kompanse etmiş dolayısıyla olefinik/lipit oranında artma olarak yansımıştır.

Bu durum lipid peroksidasyonla alakasından çok kafein etkisi ile doymuş yağların sentezinde bir tetiklenmeden kaynaklı olabilir. Elde edilmiş olan bu verilerle ilgili olarak, FT-IR spektroskopisi, olefinik bant alanındaki artmanın ya da azalmanın, doymamış lipidlerin konsantrasyonundaki bir artmadan ya da azalmadan mı yoksa lipid peroksidasyonundan mı kaynaklandığını ayırt edemez (Turker ve diğ., 2014a). Bu sebepten lipid peroksidasyonunu ölçmek için çalışmamızda ayrıca TBARs biyokimyasal testi uygulandı. TBARs testi ile lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarı ölçüldü (Setiowaty ve Che Man 2003). TBARs testin sonuçları ise, kontrol hipokampus ile serebellum gruplarının karşılaştırıldığında kafein hipokampus ile serebellum gruplarının MDA miktarlarında hipokampusta anlamlı derecede artma ($p<0,05^*$) fakat serebellum anlamlı derecede ($p<0,001^{**}$) azalma tespit edildi. Hipokampus için FT-IR verilerinden elde edilen olefinik bantının alanındaki ve olefinik/lipit oranındaki artma lipid peroksidasyon ürünlerinin varlığından kaynaklandığını, serebellumdaki azalmalar ise doymamış yağ miktarlarında azalma olduğunu fakat bu azalmanın lipid peroksidasyonundan değil başka mekanizmalardan dolayı (doymamış lipid sentezinde düşüş gibi) olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, kafeinin birçok farmakolojik özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Hepatik mikrozomal sitokrom P-450 sistemi tarafından metabolize

edildiği ve insanlarda karaciğer fonksiyonunu incelemek, özellikle de P-450 1A2 ekspresyon seviyelerini belirlemek için metabolik bir prob olduğu öne sürülmüştür. Subkutan kafein uygulaması ile ilgili daha önceki çalışmaların bazıları, yağ dolaşımını ve belirli dozlarda uyarılmamış lipit peroksidasyonu gibi bazı oksidatif hasar biçimlerini indükleyebildiğini göstermiştir (Metro ve diğ., 2017). Kahve çekirdeğinde veya kahvede bulunan kafeinin ve/veya diğer moleküllerin, ısıtma sırasında üretilen reaktif türleri yakalayan 'serbest radikal çukuru' gibi davranması muhtemeldir. Bununla birlikte, mevcut çalışmalarda diğerlerinin yanı sıra, milimolar konsantrasyonlardaki kafeinin, kardinal reaktif oksijen türleri, 'OH, ROO ve O₂' tarafından in vitro olarak indüklenen lipit peroksidasyonu önleyebilen güçlü bir antioksidan olduğunu açıkça göstermektedir (Devasagayam ve diğ., 1996). Sonuç olarak, kafeinin dozuna bağlı olarak, lipit peroksidasyonu tetikleyici ya da tam tersi olarak antioksidan olarak aksiyonunu gösterdiğine dair çalışmalardan dolayı bir çelişki söz konusudur. Yapılan çalışmalarda, kafeinin göstermiş olduğu antioksidan etkisinden dolayı lipit peroksidasyonda azalma beklenir. Bizim verilerimize göre, kafein uygulanan hipokampus bölgesinde epileptik aktiviteden çok etkilendiği için lipit peroksidasyon tayininde MDA miktarında artma meydana gelmiştir. Kafein uygulanan serebellum bölgesinde MDA miktarında azalma gözlemlendi. Gözlenen bu azalma serebellum bölgesinde kafeinin antioksidan olarak koruyucu etki yaptığı şeklinde yorumlanabilir. Sonuçlar doğrultusunda beyin bölgesine bağlı olarak kafein farklı şekilde lipit peroksidasyonunu tetikleyici ya da engelleyici rolü söz konusudur.

Lipit kaynaklı CH₂ asimetric (2925 cm⁻¹) ve CH₂ simetric (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarının frekans değerleri açıl zincirlerinin sıklığı, konformasyonel bozukluk derecesine ve esneklik seviyesine bağlıdır. Bu bantların konumu, lipit açıl zinciri esnekliği (lipitlerin düzen/düzensizlik durumu) hakkında bilgi sağlar (Sivakumar ve diğ., 2012; Turker ve diğ., 2014a). Sistemdeki trans/gauche izomerizasyonunu izlemek için kullanılırlar. CH₂ asimetric ve simetric gerilme bantlarının frekans değerleri karşılaştırıldığında, kontrol hipokampus ve serebellum gruplarına göre kafein uygulanan hipokampus grubunda anlamlı derecede azalma (p<0,05*), kafein uygulanan serebellum grubunda anlamlı derecede artma (p<0,05*) tespit edildi. Literatüre göre, CH₂ asimetric ve simetric bantlarının frekans değerleri yüksek değerlere kayarsa, açıl zincir esnekliği de o kadar yüksek olur yani lipitlerin daha

düzensiz durumda olması konformasyonel olarak gauche sayısının fazla olması durumudur (Cakmak ve diğ., 2011; Akkas ve diğ., 2007). Bu nedenle, bu bantların tepe pozisyonunun düşük değerlere kayması, lipit düzeninin arttığını ve açıl zincir esnekliğinin azaldığını gösterir (Turker-Kaya ve diğ., 2018). Kafein uygulanan serebellum gruplarındaki belirgin artış, kafeinin metilen gauche yoğunluğunu arttırarak lipit sisteminin daha düzensiz yapıda olduğunu gösterir (Akkas ve diğ., 2007). Kafein uygulanan hipokampusta bu bantların frekans değerlerinin daha düşük değerlere kayması, sistem düzenindeki bir artışı ya da lipit açıl zincirlerinde trans yoğunluklarının arttığını temsil edebilir (Turker-Kaya ve diğ., 2018; Elibol-Can ve diğ., 2011).

CH₂ asimetric (2925 cm⁻¹) ve simetric (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarının bant genişlikleri de sistemin dinamikleri hakkında bilgi verir (Alugoju ve diğ., 2019; Turker-Kaya ve diğ., 2018). CH₂ asimetric ve simetric gerilme bantlarının genişlik değerleri karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre kafein uygulanan hipokampus grubunda anlamlı derecede azalma (p<0,05*), serebellum grubunda ise anlamlı derecede artma (p<0,001**) tespit edildi. Türker-Kaya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada epileptik nöbetlerin bir sonucu olarak tüm beyin dokusunda CH₂ bant genişliğinde azalmalar belirtilmiştir ve bu sonuç hipokampusla ilgili elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir (Turker-Kaya ve diğ., 2014b). Söz konusu olan bant genişliklerinde artma ve azalmalar hücre membran akışkanlığındaki artma ve azalmayı belirtmektedir. Azalan bant genişliği, kafein uygulanan hipokampus grubunun membran akışkanlığında bir azalma olduğunu göstermektedir. Azalan membran akışkanlığı, membrana bağlı enzimlerin, iyon kanallarının ve reseptörlerin aktivite değişikliklerine veya inhibisyonuna yol açabilir. Membran akışkanlığındaki artış ise sadece lipit hareketlerini değil aynı zamanda lipit açıl zincirlerinin serbest dönüşünde gösterir (Bozkurt ve diğ., 2010; Toyran ve diğ., 2004). Membran akışkanlığındaki fark, membran fosfolipitlerinin paketlenmesinde meydana gelen değişikliklerle birlikte kan beyin bariyerinde glikoz taşıyıcıların işlevsizliği ile karşılaşabilir. Beyin kan akışı metabolik talebini karşılayamadığı için, beyinde belirgin enerji bozulması meydana gelir. Enerji bozulması, epileptik aktivite için önemli etkilerden biri olarak kabul edilen iyonik homeostaz kaybına neden olabilir (van Vliet ve diğ., 2015; Turker ve diğ., 2014b).

Lipitlerin açıl zincirlerinden kaynaklı olan CH₂ asimetric (2925 cm⁻¹) ve simetric (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarının alan değerleri doymuş yağ konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir (Liyanage ve diğ., 2018). Her iki bant içinde, kontrol hipokampus ile kafein uygulanan hipokampus ve kontrol serebellum ile kafein uygulanan serebellum grupları karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre kafein uygulanan gruplarının bant alan değerlerinde anlamlı derecede (p<0,05*) artış tespit edildi. CH₂ simetric bant alanları değerleri, CH₂ asimetric bant alanları değerlerine göre daha yüksek değerlerdedir. Her iki beyin bölgesinde bulunan bu artış doymuş yağ lipid miktarındaki artmanın göstergesidir. Bu durum membran kalınlığındaki farklılıklar, hücresel seviyede gerçekleşen yapısal değişimlerin göstergesi olabilir (Turker ve diğ., 2014a; Szalontai ve diğ., 2000).

C=O (1745 cm⁻¹) bant, esas olarak triaçilgliseroller, kolesterol ester ve membran lipidlerinin gliserol iskeletlerinin karbonil uzantıları nedeniyle oluşur (Grace ve diğ., 2019; Sivakumar ve diğ., 2014). Normal Őartlar altında C=O bandına katkı yapan en önemli moleküllerden biri olan triaçilgliseroller olsa da, çalışmamızda incelediğimiz biyolojik dokular beyin bölgeleri olduğu için bu moleküllerin beyinde varlığı çok düşük olduğundan C=O bandına katkıları anlamlı değildir. C=O bandın alanı için kafein uygulanan hipokampus grubunda anlamlı derecede (p<0,05*) arttığı, kafein uygulanan serebellum grubunda ise anlamlı derecede (p<0,05*) azalttığı tespit edildi. Yapılan çalışmalarda, yetişkin bireyin hayatı süresince beyin lipid içeriğinin karşılaştırmalı olarak incelenerek kolesterol içeriğinin fizyolojik evrimi hakkında ilginç bilgiler verilmiştir. Örneğin, yetişkin bireyin beyin kütlesinin yaklaşık % 20'sini kaybettiğini ve beyin kolesterolünü % 20-50 azaldığı belirtilmektedir (Svennerholm ve diğ., 1997). Aslında, kolesterol içeriğinin düzenli olarak azalması, hem frontal hem de temporal loblarda 20 yaş kadar erken gerçekleşir. Bu kapsamlı çalışmadan önce, genellikle kolesterol de dahil olmak üzere membran lipidlerinin kaybının ak maddede başladığı kabul edilirken beyin korteksinde ise önemli bir kolesterol kaybı meydana gelir. Bu veriler doğrultusunda, Martin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yetişkin kemirgenlerde hipokampal nöronların membranlarında orta düzeyde fakat önemli miktarda kolesterol kaybı gözlendi (Martin ve diğ., 2014). Bu literatür bilgisi gözönüne alındığında hipokampus bölgesinde kolesterol kaybından dolayı azalma beklerken biz sonuçlarımızda artma tespit ettik. Kafein hipokampus grubundaki

artmanın sebeplerinden bir tanesi lipit peroksidasyonu olabilir. Uzun zincirlerin parçalanmasına neden olan lipit peroksidasyonunun, genellikle lipit dahil olmak üzere aldehitler, daha kısa zincirli lipitler ve karbonil bileşikleri çok çeşitli bozunma ürünlerinin oluşumuna eşlik ettiği gösterilmiştir (Alugoju ve diğ., 2019). Verilerimize göre olefinik bandının alanındaki düşüşle ve yapılan TBARs testi ile kanıtlanmış olan lipit peroksidasyonu sonucunda karbonil gruplarının arttığı sonucuna varılmaktadır. Ayrıca C=O bandındaki artmanın sebeplerinden biri olarak, lipit metabolizması için, doymuş ve doymamış yağ asitlerinin çoğunun yanı sıra, yüksek doz kafein grubunun fetal plazmasında azaltılmış ve tüm doz kafein gruplarında yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol içeriği artmış olduğunu belirtilmiştir (Liu ve diğ., 2012). Diğer taraftan serebellum için kaydedilen C=O bant alanındaki azalma ise kafein etkisi ile kolesterol, membran lipitleri gibi bu banda katkı yapan moleküllerin miktarlarındaki düşüşten kaynaklı olabilir. Bununla ilgili olarak, yukarıda açıkladığımız C=O bandına lipit peroksidasyon ürünlerinin katkısı serebellum bölgesi için söz konusu değildir. Çünkü olefinik bant alanı ve TBARs sonuçlarına göre lipit peroksidasyonunda bu bölgede azalma bulduk. Dolayısıyla serebellum için C=O bandının hipokampuste gözlenen lipit peroksidasyon ürünlerinin katkısından bahsedilemez. Buna ek olarak, serebellumda kolesterol içeriğinin azaldığı da rapor edilmiştir (Jacques Fantini, Nouara Yahi., 2015). Sonuç olarak C=O grubu içeren lipit moleküllerinin miktarında kafein etkisiyle serebellum bölgesinde azalma gözlenmiştir.

C=O bant alanı parametresinin yanısıra çalışmamızda ayrıca C=O/lipit alan oran değerleri de hesaplandı. Sonuçlarımıza göre hipokampus ve serebellum bölgelerinin her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma görüldü.

Fosfolipitler, biyolojik organizmaların temel bileşenleri olan canlı organizmalardaki temel yapı taşlarıdır. Fosfolipitler esterlenmiş iki yağ asidine sahip bir gliserol omurgasına sahiptir. Bundan dolayı yukarıda belirtildiği gibi C=O bandına katkı yapan moleküllerden bir tanesi membran fosfolipitleridir. Diğer taraftan membran fosfolipitleri ayrıca PO_2^- asimetric (1236 cm^{-1}) ve simetric (1080 cm^{-1}) bantlarının fosfat kafa gruplarından kaynaklanmasıyla oluşurlar (Carmona ve diğ., 2008). C=O ve PO_2^- bantlarının frekanslarındaki değişimler membran fosfolipitlerinin paketlenme derecesi ve hidrasyon durumları hakkında bilgi verirler (Turker-Kaya ve diğ., 2014b).

Sonuçlarımıza göre C=O frekanslarında kafein etkisiyle hipokampus ve serebellum bölgelerinde anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artmanın tespit edilmesi membran fosfolipitlerinin polar bölgeye yakın gliserol omurgasının hidrasyon durumunun azalması anlamına gelir (Turker ve diğ., 2014a). Diğer taraftan PO_2^- asimetric ve simetric frekanslarında hipokampus için istatistiksel olarak anlamlı ve anlamsız azalma tespit edildi. Serebellum bölgesi için ise PO_2^- asimetric bantı anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artarken PO_2^- simetric anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma tespit edildi. PO_2^- asimetric ve simetric bantlarının bölgesel farklılıklara bağı olarak belirlenen azalma membran lipitlerinin fosfat kafa gruplarının artması anlamına gelir. Bu durum, gruplar arasında hidrojen bağı yapma kapasitesinde artış olduğunun bir göstergesidir (Akkas ve diğ., 2007). Hidrojen bağı, su molekülleri ile fosfolipitlerin veya hidrofilik protein kalıntılarının hem karbonil hem de fosfat gruplarının oksijen molekülleri arasındadır. Bu lipitler tarafından işgal edilen alanı etkileyen lipit kafa grubu boyutunu değıştiren enzimlerin aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Lipit paketlenmesindeki tüm varyasyonlar, proteinlerin hidrofobik ve hidrofilik kalıntıları ile etkileşimlerini doğrudan etkileyebilir. Böylece proteinlerin membrana yerleştirilmesini sağlayabilir (Do ve diğ., 2017; Turker-Kaya ve diğ., 2014a).

FT-IR spektroskopisi biyolojik membranlarda ve dokularda lipitlerle birlikte proteinlerin eşzamanlı çalışması için eşsiz olanaklar sunar (Cakmak ve diğ., 2011). Ancak, FT-IR spektroskopisinin karmaşık bir doku içindeki belirli molekülleri ayırt edemediğinden, belirli bir proteine odaklanmadığı sürece proteinler hakkında bilgi vermekle sınırlı kaldığını hatırlatmakta fayda var. Bu nedenle, burada sunulan beyin dokusu gibi numunelerdeki proteinlere ait elde edilen veriler, hücre dışı, plazma membranı, sitoplazma ve nükleer proteinleri içeren beyin dokusunun protein profili hakkında bilgi sağlar (Turker-Kaya ve diğ., 2016). Proteinler, canlı organizmalardaki moleküler tanıma, enzimatik aktiviteler, iyonik taşınma ve sinyal iletimi gibi temel hücresel fonksiyonların çoğunu kontrol eden moleküler makinelerdir (Babu ve diğ., 2019). Amid I (1653 cm^{-1}) ve amid II (1550 cm^{-1}) bantları, protein zincirlerinin yapı ve konsantrasyonları hakkında bilgi verir (Grace ve diğ., 2019). Söz konusu olan bantların, bant alanlarında kafein uygulanan hipokampus gruplarında anlamlı derecede ($p<0,05^*$) artma, serebellum gruplarında ise anlamlı derecede ($p<0,05^*$) azalma gözlemlendi. Amid I ve amid II profilleri, protein yapısal bileşimine bağı olduğundan

bu bantların alanlarındaki değişimler proteinlerin yapılarında bazı farklılıkların olduğunu göstergesidir (Cakmak ve diğ., 2011; Dogan ve diğ., 2007). Çünkü söz konusu bantlar özellikle amid I bandı alfa heliks, beta plakalı gibi proteinlerin ikincil yapı elemanlarına ait alt bantların toplamıdır (Turker-Kaya ve diğ., 2016; Turker ve diğ., 2014a; Severcan ve diğ., 2004). Literatüre göre kafein, protein zincirleri üzerinde koruyucu bir etki yaratarak apolar amino asitlerle hidrofobik etkileşimi nedeniyle proteinlerin sitrik asit aracılı çapraz bağlanmasını kesintiye uğratabilir (Zand-Rajabi ve Madadlou., 2016). Bu durumda protein yapılarında değişimlere neden olabilir. Sonuç olarak serebellumda belirlenen azalma, proteinlerinin yapılarında bazı değişikliklerin ve protein miktarındaki azalmayı göstermektedir. Hipokampusteki bant alanlarındaki artma ise, hipokampus bölgesinin proteinlerinin konformasyonel değişikliklerin yanısıra protein miktarındaki artmasından kaynaklanmaktadır (Cakmak ve diğ., 2006). Proteindeki bu miktar artışıyla ilgili olarak daha önce belirtildiği gibi, kafeinin ana reseptörleri adenosin A_1 ve A_{2A} reseptörleridir. Yapılan bir çalışmada, kafein doğrudan yenidoğan yavrulara verildiğinde kafeinin beyin sapında ve hipotalamusun solunum çekirdeğinde A_1 transkripsiyonunu arttırdığını göstermiştir (Li ve diğ., 2019; Gaytan ve Pasaro., 2012). FT-IR analizlerinden protein miktarları ile elde ettiğimiz verileri test etmek üzere çalışma kapsamına ayrıca Bradford testini dahil ettik. Bu testten elde edilen veriler protein bantlarındaki sonuçları destekler niteliktedir (Şekil 3.14.).

Membran yapısını ve dinamiklerini etkileyen bir başka önemli faktör, membranlardaki protein ve lipitlerin miktarıdır (Szalontai ve diğ., 2000). FT-IR verileri kullanılarak, lipitlerin protein oranı, lipitlerden ve proteinlerden kaynaklanan bantların alanlarının oranı alınarak elde edilir (Cakmak ve diğ., 2011). Lipit/protein oranını değerlendirmek için, CH_2 asimetric ve simetric bantlarının altındaki alanların toplamının ile amid I ve II bantları altındaki alanın toplamına bölünerek hesaplandı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarının alan oran değerlerinde anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) artış gözlemlendi. Artan lipit/protein oranı, lipit içeriğiyle karşılaştırıldığında protein içeriğinde daha belirgin bir düşüş olduğunu ya da her iki olayın aynı anda gerçekleşmesinden de kaynaklanabilir. Bu düşüş, protein parçalanması ve bozulmasıyla ilişkilendirilebilir. Proteinlerin zarar görmesi serbest radikallerin saldırısından kaynaklanabilir, bu da proteoliz, doku hasarı ve

nörotoksisiteye karşı artan duyarlılığa yol açabilir. Membranın kimyasal bileşimindeki değişikliklerle birlikte lipid/protein oranını değiştiren komponentler hücre içi sitoskeletal elemanlarla membran bağlantısının çekilmesi ile dinamik bir dengesizliğe yol açabilir. Bu gibi olaylar, membran bozulmasını açıklayabilir ve epileptik aktivite sırasında kalıcı bir membran bütünlüğü kaybı ile ilişkili olan canlılık kaybını kanıtlayabilir (Turker-Kaya ve diğ., 2014a).

Tezin giriş kısmında da belirtildiği gibi mikromolar konsantrasyonlardaki kafein, spesifik olmayan adenosin reseptörü antagonistidir. Adenozin reseptörlerinden A₁ ve A_{2A} beyinde nadir görülür; A₁ tipi her yerde bulunur, A_{2A} bazal ganglionlarda diğer beyin yapılarından daha fazla temsil edilir. Yapılan deneylerde doğum öncesi sıçan beyninde bulunduğunu ve yoğunluğunu doğum sonrası arttığı tespit edilmiştir. A₁ adenosin reseptörleri, beyin sapında doğum sonrası 8. günde, hipotalamusta 14. günde, beyincikte 24. günde ve hatta daha sonra kortekste erişkin yoğunluğa ulaşır (Tchekalarova ve diğ., 2010). Çalışmamızda neonatal dönemde yani 7-11. günler arasında kafein uyguladık, bundan kafeinin adenosin reseptörü antagonisti olarak davranabileceği bu günler arasında hipokampusta daha fazla reseptör bulunurken beyincikte daha az sayıda reseptör bulunmaktadır. Bundan dolayı yüksek dozdaki kafeinin hipokampusta etkisi daha yoğun görülürken serebellumda daha az ya da zıt etkiler tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bir önemli husus olarak, absans nöbetler her ne kadar talamustan köken alıp tüm beyne yayıldığını gösteren çalışmalar bulunsa da (Falco Walter ve diğ., 2016) bu nöbet tipinin belli bir zaman sonra sadece talamus değil hipokampustan da köken alabilir hale geldiğini çalışmalarında rapor etmişlerdir. Bundan dolayı hipokampusta tespit ettiğimiz kafeinin etkilerinin yanı sıra absans nöbetlerinin tetikleyici mekanizmalarından da kaynaklıdır yorumunu getirebiliriz. Bununla ilgili olarak kafein uygulanan hipokampus bölgesi nöbetten çok etkilenirken, serebellum bölgesi hipokampus kadar nöbetten etkilenmemiştir şeklindeki bulgu Chatzikonstantinou, (2014) tarafından rapor edilmiştir. İlaveten, bazı çalışmalara göre serebellumun paroksizmal epileptik aktivite üzerinde inhibe edici bir etkisi vardır (Marcían ve diğ., 2016). Başka çalışmalarda ise serebellar hasarı olan hastalarda ve hayvan modellerinde epileptik nöbet insidansının ve yoğunluğunun daha yüksek olduğunu göstermiştir (Hutton ve diğ., 1972; Dow ve diğ., 1962). Bu çalışmaların sonuçlarıyla birlikte verilerimizin sonucu olarak serebellumun epileptik nöbet aktivitesi

üzerinde hipokampusten çok farklı bir şekilde davrandığı şeklinde yorum yapılabilir. Kafeinin yüksek dozda merkezi sinir sistemini tetikleyici rolü gözönünde bulundurulursa absans nöbet kaynağı olabilen hipokampus bölgesine kafeinin etkisi literatürdeki sadece nöbet etkileri ile uyumludur (Turker ve dig., 2014a;b). Buna göre yüksek doz kafein uygulaması hipokampus bölgesinde nöbet tetikleyici rol üstlenmektedir. Diğer taraftan kafein serebellum bölgesinde hipokampuste davrandığından tam zıt şekilde davranmış olması serebellumun daha önceden rapor edilmiş olan nöbet baskılayıcı özelliklerinden kaynaklı olabilir.

Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz veriler ışığında absans nöbetler her ne kadar jeneralize yani tüm beyni etkileyen nöbetler olsa da farklı beyin bölgelerinde neonatal dönemde uygulanmış olan kafein biyofiziksel parametreler üzerinden nöbet tetikleyici ya da inhibe edici şekilde davranmıştır.

Son olarak HCA metodunu kullanarak elde ettiğimiz FT-IR spektrumlarının örneklerdeki spektral farklılıklarına göre ayrılıp ayrılmadığını test ettik. Her grup için kümeleme analizindeki dendrograma bakıldığında, kontrol hipokampus ile serebellum ve kafein uygulanan hipokampus ile serebellum gruplarının birbirinden ayrıştırılması %100 özgüllük ve duyarlılık ile gerçekleştirildi.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünyada en çok tüketilen psikoaktif maddelerden biri olan kafeinin uyanıklık, dikkat ve hafıza gibi nörolojik işlevleri değiştirdiği bilinmektedir. Merkezi sinir sistemini uyarıcı bu etkilerinden dolayı neonatal dönemde kafein alınınının ilerde epileptik nöbet ve epilepsi oluşumuna neden olabildiğini destekleyen çalışmalar bulunsa da bu etkilerin altında yatan mekanizmalar açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu bağlamda, konuya biyofiziksel yaklaşım getirmek amacı ile çalışmada neonatal dönemde kafein uygulamasının Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) sıçanların hipokampus ve serebellum beyin bölgelerinde meydana getirdiği moleküler değişiklikleri karşılaştırmalı olarak Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi yöntemiyle incelendi. FT-IR spektroskopisi yöntemiyle elde edilen spektral verilerin analizi sonucunda lipitler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler hakkında detaylı veriler elde edildi. Yapılan analizleri desteklemek için ise biyokimyasal testler uygulandı. Bradford testini uygulayarak protein miktarı, TBARs testi ile lipit peroksidasyonuna bağlı olarak MDA miktarı hakkında bilgi edinildi.

Bulgularımızın sonuçlarına göre, kafein uygulanan hipokampus ile serebellum bölgelerinin moleküler anlamda değişikliklerin olduğunu göstermektedir. Lipit içeriği, membran akışkanlığı kafein uygulanan hipokampusta düşük iken, protein kaynaklı bantların kafein uygulanan hipokampus ve serebellum gruplarında yüksek olduğu görüldü. Tüm bu değişimler göz önüne alındığında nöbetlerin beyin bölgelerinin farklı derecede etkilendiğini göstermektedir. Bu bağlamda bölgeler arası farklılıkların incelenmesi hastalığın patofizyolojisini aydınlatmak açısından oldukça önem göstermektedir. Bu tez çalışmasında, kafeinin nöbetler üzerindeki etkilerini aydınlatılması, yeni tedavilerin ve ilaçların keşfine ışık tutması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hady H., Nasef N., Shabaan A., Nour I., Caffeine Therapy in Preterm Infants, *World J Clin Pediatr*, 2015, **4**(4), 81-93.
- Abu Jawdeh E.G., O’Riordan M., Limrungsikul A., Bandyopadhyay A., Argus B.M., Nakad P.E., Supapannachart S., Yunis K.A., Davis P.G., Martin R.J., Methylxanthine Use for Apnea of Prematurity Among an International Cohort of Neonatologists, *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, 2013, **6**, 251-256.
- Abu-Shaweesh J.M., Martin R.J., Caffeine Use in the Neonatal Intensive Care Unit, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2017, **22**, 342-347.
- Akkas S.B., Severcan M., Yilmaz O., Severcan F., Effects of Lipoic Acid Supplementation on Rat Brain Tissue: An FT-IR Spectroscopic and Neural Network Study, *Food Chemistry*, 2007, **105**(3), 1281-1288.
- Alugoju P., Narsimulu D., Bhanu J.U., Satyanarayana N., Periyasamy L., Role of Quercetin and Caloric Restriction on the Biomolecular Composition of Aged Rat Cerebral Cortex: An FT-IR Study, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, **220**, 117128.
- Alves R.C., Bessada S.M., Oliveira B.P.P., Caffeine-Based Food Supplements and Beverages: Trends of Consumption for Performance Purposes and Safety Concerns, *Food Research International*, 2018, **109**, 310-319.
- Anastassopoulou J., Kyriakidou M., Kyriazisc S., Mavrogenisd A.F., Mamarelie V., Mamarelise I., Petraf M., Malesioub E., Kotoulasg C., Kolovouh P., Koutoulakisi E., Markouizouj A., Theophanidesb T., Oxidative Stress in Ageing and Disease Development Studied by FT-IR Spectroscopy, *Mechanisms of Ageing and Development*, 2018, **172**, 107-114.
- Andreotti J.P., Prazeres P.H.D.M., Magnob L.A.V., Romano-Silvab M.A., Mintz A., Birbraira A., Neurogenesis in the Postnatal Cerebellum After Injury, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2018, **67**, 33-36.
- Aronica E., Mühlebner A., Neuropathology of Epilepsy, *Handbook of clinical neurology*, 2018, **145**, 193-216.
- Atik A., Harding R., De Matteo R., Kondos-Devcic D., Cheong J., Doyle LW., Tolcos M., Caffeine for Apnea of Prematurity: Effects on the Developing Brain, *Neurotoxicology*. 2017, **58**, 94-102.
- Avoli M., A Brief History on the Oscillating Roles of Thalamus and Cortex in Absence Seizures, *Epilepsia*, 2012, **53**(5), 779-789.

Avoli M., Jefferys J.G., Models of Drug-Induced Epileptiform Synchronization in Vitro, *J Neurosci Methods*, 2016, **260**, 26-32.

Babu K.M., Zuckerman M.D., Cherkes J.K., Hack J.B., First-Onset Seizure After Use of 5-hour Energy, *Pediatric Emergency Care*, 2011, **27**(6), 539-540.

Baker M.J., Trevisan J., Bassan P., Bhargava R., Butler H.J., Dorling K.M., Fielden P.R., Fogarty S.W., Fullwood N.J., Heys K.A., Hughes C., Lasch P., Martin-Hirsch P.L., Obinaju B., Sockalingum G.D., Sulé-Suso J., Strong R.J., Walsh M.J., Wood B.R., Gardner P., Martin F.L., Using Fourier Transform IR Spectroscopy to Analyze Biological Materials, *Nat Protoc*, 2014, **9**(8), 1771-1791.

Balan V., Mihai C.T., Cojocaru F.D., Uritu C.M., Dodi G., Botezat D., Gardikiotis I., Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice, *Materials*, 2019, **12**(18), 2884.

Bellisola G., Sorio C., Infrared Spectroscopy and Microscopy in Cancer Research and Diagnosis, *Am J Cancer Res*, 2012, **2**(1), 1-21.

Blass B.E., Animal Models of Disease States, *Basic Principles of Drug Discovery and Development*, 2015, 307-343.

Borges-Martins V.P., Ferreirab D., Arthur Cardoso Soutoa A., Netoc J., Pereira-Figueiredod D., Calazad K., Oliveirac K., Manhãese A., Reisf R., Regina Célia Cussa Kubrusly R., Caffeine Regulates GABA Transport via A1R Blockade and cAMP Signaling, *Neurochemistry International*, 2019, **131**, 104550.

Bozkurt O., Severcan M., Severcan F., Diabetes Induces Compositional, Structural and Functional Alterations on Rat Skeletal Soleus Muscle Revealed by FT-IR Spectroscopy: a Comparative Study with EDL Muscle, *Analyst*, 2010, **135**, 3110-3119.

Bozkurt Ö., Haman Bayari S., Severcan M., Krafft C., Popp J., Severcan F., Structural Alterations in Rat Liver Proteins due to Streptozotocin-Induced Diabetes and the Recovery Effect of Selenium: Fourier Transform Infrared Microspectroscopy and Neural Network Study, *Journal of Biomedical Optics*, 2012, **17**(7), 0760023.

Bradford M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2), 248-254.

Brissart H., Forthoffer N., Maillard L., Attention Disorders in Adults with Epilepsy. Determinants and Therapeutic Strategies, *Revue neurologique*, 2018, **6**, DOI: 10.1016/j.neurol.2019.01.394.

Butler K.J., Absence Epilepsy, *Physician Assist Clin*, 2016, **1**, 627-637.

Caine S., Heraud P., Tobin M.J., McNaughton D., Bernard C.A.C., The Application of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy for the Study of Diseased Central Nervous System Tissue, *NeuroImage*, 2012, **59**(4), 3624-3640.

Cakmak G., Zorlu F., Severcan M., Severcan F., Screening of Protective Effect of Amifostine on Radiation-Induced Structural and Functional Variations in Rat Liver Microsomal Membranes by FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 2011, **83**, 2438-2444.

Cakmak G., Togan I., Severcan F., 17Beta-Estradiol Induced Compositional, Structural and Functional Changes in Rainbow Trout Liver, Revealed by FT-IR Spectroscopy: A Comparative Study with Nonylphenol, *Aquatic Toxicology*, 2006, **77**(1), 53-63.

Cappelletti S., Daria P., Sani G., Aromatario M., Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug?, *Current Neuropharmacology*, 2015, **13**, 71-88.

Carmona P., Rodriguez-Casado A., Alvarez I., Miguel E., Toledano A., FTIR Microspectroscopic Analysis of the Effects of Certain Drugs on Oxidative Stress and Brain Protein Structure, *Biopolymers*, 2008, **89**(6), DOI:10.1002/bip.20944

Casares D., Escribá P., Rosselló C., Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 2167.

Chatzikonstantinou A., Epilepsy and the Hippocampus, *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 2014, **34**, 121-142.

Cheetham C.E., Hammond M.S., McFarlane R., Finnerty G.T., Altered Sensory Experience Induces Targeted Rewiring of Local Excitatory Connections in Mature Neocortex, *J. Neurosci*, 2008, **28**, 9249-9260.

Chen J.F., Eltzschig H.K., Fredholm B.B., Adenosine Receptors as Drug Targets-What are the Challenges, *Nat Rev Drug Discov*, 2013, **12**(4), 265-286.

Cheng Y., Wei H., Sun R., Tian Z., Zheng X., Rapid Method for Protein Quantitation by Bradford Assay After Elimination of the Interference of Polysorbate 80, *Analytical Biochemistry*, 2016, **494**, 37-39.

Chroscinska-Krawczyk M., Jargiełło-Baszak M., Andres-Mach M., Łuszczki J., Czuczwar S., Influence of Caffeine on the Protective Activity of Gabapentin and Topiramate in a Mouse Model of Generalized Tonic-Clonic Seizures, *Pharmacological Reports*, 2016, **68**, 680-685.

Coenen A.M., Van Luijtelaar E.L., Genetic Animal Models for Absence Epilepsy: A Review of the WAG/Rij Strain of Rats, *Behav Genet*, 2003, **33**(6), 635-655.

Dall'Igna O.P., Fett P., Gomes M.W., Souza D.O., Cunha R.A., Lara D.R., Caffeine and Adenosine A_{2a} Receptor Antagonists Prevent β -amyloid (25–35) Induced Cognitive Deficits in Mice, *Experimental Neurology*, 2007, **203**(1), 241-245.

Daniel J. Pelchovitz D.J., Goldberger J.J., Caffeine and Cardiac Arrhythmias: A Review of the Evidence, *The American Journal of Medicine*, 2011, **124**, 284-289.

Dede F., Karadenizli S., Ozsoy O.O., Eraldemir F.C., Sahin D., Ates N., Antagonism of Adenosinergic System Decrease SWD Occurrence via an Increment in Thalamic NFkB and IL-6 in Absence Epilepsy, *Journal of Neuroimmunology*, 2019, **326**, 1-8.

Deniz A., Taş F., Tomur A., Koç A., The Toxic Effects of Caffeine in the Pregnancy, *ISJMS*, 2015, **1**(3), 59-63.

Depaulis A., Charprier S., Pathophysiology of Absence Epilepsy: Insights from Genetic Models, *Neuroscience Letters*, 2018, **667**, 53-65.

Depaulis A., van Luijtelaar G., Genetic Models of Absence Epilepsy in the Rat, *Models of Seizures and Epilepsy*, 2006, 233-248. DOI:10.1016/b978-012088554-1/50020-7

Depciuch J., Sowa-Kućma M., Nowak G., Dudek D., Siwek M., Styczeń K., Parlińska-Wojtan M., Phospholipid-Protein Balance in Affective Disorders: Analysis of Human Blood Serum Using Raman and FT-IR spectroscopy. A pilot Study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, **131**, 287-296.

Devasagayam T.P.A., Kamat J.P., Mohan H., Kasevan P.C., Caffeine as an Antioxidant: Inhibition of Lipid Peroxidation Induced by Reactive Oxygen Species, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, **1282**(1), 63-70.

Devinsky O., Vezzani A., O'Brien T.J., Jette N., Scheffer I.E., de Curtis M., Perucca P., *Epilepsy*, Disease Primers, 2018, **3**, 18024.

Diukova A., Ware J., Smith J.E., Evans C.J., Murphy K., Rogers P.T., Wise R.G., Separating Neural and Vascular Effects of Caffeine Using Simultaneous EEG-fMRI: Differential Effects of Caffeine on Cognitive and Sensorimotor Brain Responses, *NeuroImage*, 2012, **62**, 239-249.

Do T., Dao U., Bui H., Nguyen T., Effect of Electrostatic Interaction Between Fluoxetine and Lipid Membranes on the Partitioning of Fluoxetine Investigated Using Second Derivative Spectrophotometry and FT-IR, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2017, **207**, 10-23.

Dobson N., Patel R., Smith P., R.Kuehn D., Clark J., Vyas-Read S., Herring A., M.Laughon M., Carlton D., Hunt C., Trends in Caffeine Use and Association between Clinical Outcomes and Timing of Therapy in Very-Low-Birth-Weight Infants, *Pediatr*, 2014, **164**(5), 992-998.

Dogan A., Siyakus G., Severcan F., FT-IR Spectroscopic Characterization of Irradiated Hazelnut (*Corylus avellana* L.), *Food Chemistry*, 2007, **100**, 1106-1114.

Dow R.S., Fernandez-Guardiola A., Manni E., The Influence of the Cerebellum on Experimental Epilepsy, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1962, **14**, 383-398.

Drinkenburg W.H.I.M., Coenen A.M.L., Vossen J.M.H., Van Luijtelaar E.L.J.M., Spike-Wave Discharges and Sleep-Wake States in Rats with Absence Epilepsy, *Epilepsy*, 1991, **9**(3), 218-224.

Dudek F.E., Staley K.J., The time course of acquired epilepsy: Implications for Therapeutic Intervention to Suppress Epileptogenesis, *Neuroscience Letters*, 2011, **497**, 240-246.

Dunwiddie T.V., Masino S.A., The Role and Regulation of Adenosine in The Central Nervous System, *Annu. Rev. Neurosci*, 2001, **24**, 31-55.

Dutta A., Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, 2017, 73-93.

Eerdenbrugh B., Taylor L., Application of Mid-IR Spectroscopy for the Characterization of Pharmaceutical Systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, **417**, 3-16.

Elibol-Can B., Jakubowska-Dogru E., Severcan M., Severcan F., The Effects of Short-Term Chronic Ethanol Intoxication and Ethanol with Drawal on the Molecular Composition of the Rat Hippocampus by FT-IR Spectroscopy, *Alcohol Clin. Exp. Res*, 2011, **35**, 2050-2062.

Essendoubi M., Toubas D., Lepouse C., Leon A., Bourgeade F., Pinon J.M., Manfait M., Sockalingum G.D., Epidemiological investigation and typing of *Candida Glabrata* Clinical Isolates by FT-IR Spectroscopy, *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **71**(3), 325-331.

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.M., Mosh S.L., Perucca E., Scheffer I.E., Tomson T., Watanabe M., Wiebe S., A Practical Clinical Definition of Epilepsy, *Epilepsia*, 2014, **55**(4),475-482.

Fisher R.S., van Emde Boas W., Blume W., 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.

Freifelder D., Applications to Biochemistry and Molecular Biology, *Physical Chemistry*, Freeman Press, W. H. (Ed), New York, 1982, 145.

Garip Ş., Bozoğlu F., Severcan F., Differentiation of Mesophilic and Thermophilic Bacteria with Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 2007, **61**(2), 186-192.

Garipağaoğlu M., Kuyrukçu N., Çocuk Sağlığı ve Kafein, *Çocuk Dergisi*, 2009, **9**(3), 110-115.

Gaspar S., Ramos F., Caffeine: Consumption and Health Effects, *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, 573-578.

Gaytan S., Pasaro R., Neonatal Caffeine Treatment up Regulates Adenosine Receptors in Brainstem and Hypothalamic Cardio-Respiratory Related Nuclei of Rat Pups, *Experimental Neurology*, 2012, **237**, 247-259

Geiger B.M., E.N. Pothos E.N., Translating Animal Models of Obesity and Diabetes to the Clinic, *Translational Medicine in CNS Drug Development*, 2019, **29**, 1-16.

Germé K., Faure J-B., Koning E., Nehlig A., Effect of Caffeine and Adenosine Receptor Ligands on the Expression of Spike-and-Wave Discharges in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS), *Epilepsy Research*, 2015, **110**, 105-114.

Gerwert K., Kötting C., Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy, *Encyclopedia Of Life Science*, 2010, DOI:10.1002/9780470015902.a0003112.pub2.

Gley K., Murani E., Haack F., Trakooljul N., Zebunke M., Puppe B., Wimmers K., Ponsuksili S., Haplotypes of Coping Behavior Associated QTL Regions Reveal Distinct Transcript Profiles in Amygdala and Hippocampus, *Behavioural Brain Research*, 2019, **372**, 112038.

Goldstein E.R., Ziegenfuss T., Kalman D., Kreider R., Campbell B., Wilborn C., Taylor L., Willoughby D., Stout J., Graves B.S., Wildman R, Ivy JL., Spano M., Smith A.E., Antonio J. International Society of Sports Nutrition Position Stand: Caffeine and Performance, *J Int Soc Sports Nutr*, 2010,**7**(1), 5.

Gomes C.V., Kaster M.P., Tomé A.R., Agostinho P.M., Cunha R.A., Adenosine Receptors and Brain Diseases: Neuroprotection and Neurodegeneration, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, **1808**(5), 1380-1399.

Grace C.E., P. Lakshmi K., Meenakshi S., Vaidyanathan S., Srisudha S., Mary M.B., Biomolecular Transitions and Lipid Accumulation in Green Microalgae Monitored by FT-IR and Raman Analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, **224**, 1173822.

Graham T.E., Caffeine, Coffee and Ephedrine: Impact on Exercise Performance and Metabolism, *Canadian Society for Exercise Physiology*, 2001, **26**(S1), 186-191.

Gupta P., Khobragade S.B., Shingatgeri V.M., Effect of Various Antiepileptic Drugs in Zebrafish PTZ-Seizure Model. *Indian J Pharm Sci*, 2014,**76**(2),157-163.

Güler G., Gärtner R.M., Ziegler C., Mäntele W., Lipid-Protein Interactions in the Regulated Betaine Symporter BetP Probed by Infrared Spectroscopy, *The Journal Of Biological Chemistry*, 2016, **291**(9), 4295-4307.

Hui Yin Y., Ahmad N., Makmor-Bakry M., Pathogenesis of Epilepsy: Challenges in Animal Models, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2013, **16**, 1119-1132.

Hutton JT, Frost JD Jr, Foster J. The Influence of the Cerebellum in Cat Penicillin Epilepsy, *Epilepsia*, 1972, **13**, 401-408.

Iyadurai S., Chung S., New-Onset Seizures in Adults: Possible Association with Consumption of Popular Energy Drinks, *Epilepsy & Behavior*, 2007, **10**(3), 504-508.

İzci Y., Erbaş Y.C., Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları, *Türk Nöroşir Derg*, 2015, **25**(3), 287-295.

Jacques Fantini J., Yahı N., Variations of Brain Lipid Content, *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease*, 2015, DOI:10.1016/B978-0-12-800111-0.00004

Jovel C.A.E., Mejía F.E.S., Caffeine and Headache: Specific r-Remarks Cafeína y Cefalea: Consideraciones Especiales, *Neurología (English Edition)*, 2017, **32**(6), 394-398.

Kapucu A., Sıçanlarda PTZ-Kaynaklı Nöbetlerde Eritropoietinin Hipokampus ve Frontal Kortekste Nitrik Oksit Sentaz Türleri Üzerine Etkileri, *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 2019, **82**(2), 107-15.

Karson A., Onat F., Balcı F., Ateş N., Absans Epilepsisi WAG/Rij Sıçanlarda Lokomotor Aktivite, Öğrenme ve Bellek, *Epilepsi*, 2008, **14**(3), 167-175.

Kayır H., Uzbay T., Santral Adenozinerjik Sistem ve Klinik Önemi, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 2004, **14**(3), 159-167.

Kessler S.K., Shinnar S., Cnaan A., Dlugos D., Conry J., Hirtz D.G., Hu F., Liu C., Mizrahi E.M., Moshé S.L., Clark P., Glauser T.A., Pretreatment Seizure Semiology in childhood Absence Epilepsy, *American Academy of Neurology*, 2017, **89**(7), 673-679.

Khan R., Krishnakumar A., Paulose C.S., Decreased Glutamate Receptor Binding and NMDA R1 Gene Expression in Hippocampus of Pilocarpine-Induced Epileptic Rats: Neuroprotective Role of Bacopa Monnieri Extract, *Epilepsy & Behavior*, 2008, **12**(1), 54-60.

Knutsen L.J.S., Williams M., Epilepsy, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2007, **6**, 279-296.

Kong J., Yu S., Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, **39**(8), 549-559.

Kostopoulos G., Veronikis D.K., Efthimiou I., Caffeine Blocks Absence Seizures in the Tottering Mutant Mouse, *Epilepsy*, 1987, **28**(4), 415-420.

Ku H.K., Lim H.M., Oh K.H., Yang H.J., Jeong J.S., Kim S.K., Interpretation of Protein Quantitation Using the Bradford Assay: Comparison with Two Calculation Models, *Analytical Biochemistry*, 2013, **434**(1), 178-180.

Kürtüncü M., Altundere B., Akman Demir G., Epilepsi İle İlişkili Sistemik Otoimmün Hastalıklar, *Epilepsi*, 2016, **22**(S1), 53-66.

Larkin P.J., Infrared and Raman Spectroscopy, *Infrared and Raman Spectroscopy (Second Edition)*, 2018, 1-5.

Lee L., JungChen W., WenChuang Y., ChunWang Y., Neonatal Whisker Trimming Causes Long-Lasting Changes in Structure and Function of the Somatosensory System, *Experimental Neurology*, 2009, **219**(2), 524-532.

Lehmann T.N., Gabriel S., Kovacs R., Eilers A., Kivi A., Schulze K., Lanksch W.R., Meencke H.J., Heinemann U., Alterations of Neuronal Connectivity in Area CA1 of Hippocampal Slices from Temporal Lobe Epilepsy Patients and from Pilocarpine-Treated Epileptic Rats, *Epilepsy*, 2000, **41**(S6), 190-194.

Lehtinen M.K., Tegelberg S., Schipper H., Su H., Zukor H., Manninen O., Kopra O., Joensuu T., Hakala P., Bonni A., Lehesjoki A.E., Cystatin B Deficiency Sensitizes Neurons to Oxidative Stress in Progressive Myoclonus Epilepsy, EPM1, *The Journal of Neuroscience*, 2009, **29**(18), 5910-5915.

Li H.L., Zaghoul N., Ahmed I., Omelchenko A., Firesteine B.L., Huang H., Collins L., Caffeine Inhibits Hypoxia-Induced Nuclear Accumulation in HIF-1 α and Promotes Neonatal Neuronal Survival, *Experimental Neurology*, 2019, **317**, 66-77.

Liu Y., Xu D., Feng J., Kou H., Liang G., Yu H., He X., Zhang B., Chen L., Magdalou J., Wang H., Fetal Rat Metabonome Alteration by Prenatal Caffeine Ingestion Probably due to the Increased Circulatory Glucocorticoid Level and Altered Peripheral Glucose and Lipid Metabolic Pathways, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, **262**(2), 205-216.

Liyanage S., Bouyanfif A., Ramalingam L., Moustaid-Moussa N., Abidi N., Application of FTIR Imaging to Detect Dietary Induced Biochemical Changes in Brown and White Adipocytes, *Vibrational Spectroscopy*, 2018, **97**, 91-101.

Locke T.M., Sode M.E., Miller S.M., Hunker A., Knakal C., Licholai J.A., Dhillon K.S., Keene C.D., Zweifel L.S., Carlson E.S., Dopamine D1 Receptor-Positive Neurons in the Lateral Nucleus of the Cerebellum Contribute to Cognitive Behavior, *Biological Psychiatry*, 2018, **84**(6), 401-412.

Maftoon P., Shakouri N., Ogholgol N., Limbic System and Second Language Acquisition: Reconsidering the Role of Emotion, *Biological Forum – An International Journal*, 2014, **2**, 398-403.

Malkan A., Beran R.G., An Appraisal of the New Operational Definition of Epilepsy-Then and Now, *Epilepsy & Behavior*, 2014, **41**, 217-220.

Marcia'n V., Filip P., Bares M., Bra'zdil M., Cerebellar Dysfunction and Ataxia in Patients with Epilepsy: Coincidence, Consequence, or Cause?, *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*, 2016, **6**, 376.

Martin M., Pfrieger F., Dotti C., Cholesterol in Brain Disease: Sometimes Determinant and Frequently Implicated, *EMBO Reports*, 2014, **15**, 1036-1052.

Masino S.A., Kawamura Jr M., Ruskin D.N., Adenosine Receptors and Epilepsy: Current Evidence and Future Potential, *Int Rev Neurobiol*, 2014, **119**, 233-255.

- McKetta J.J., Cunningham W.A., Encyclopedia of Chemical Processing and Design, *Marcel Dekker Inc*, New York, 1977.
- McLellan T.M., Caldwell J.A., Lieberman H.R., A Review of Caffeine's Effects on Cognitive, Physical and Occupational Performance, *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, **71**, 294-312.
- Meeren H.K.M., Pijn J.P.M., Van Luijelaar E.L.J.M., Coenen A.M.L., da Silva F.H.L., Cortical Focus Drives Widespread Corticothalamic Networks During Spontaneous Absence Seizures in Rats, *The Journal of Neuroscience*, 2002, **22**(4), 1480-1495.
- Meng X., Pan Q., Ding Y., Jiang L., Rapid Determination of Phospholipid Content of Vegetable Oils by FT-IR Spectroscopy Combined with Partial Least-Square Regression, *Food Chemistry*, 2014, **147**, 272-278.
- Metro D., Cernaro V., Santoro D., Papa M., Buemi M., Benvenga S., Manasser L., Beneficial Effects of Oral Pure Caffeine on Oxidative Stress, *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 2017, **10**, 2017, 22-27.
- Miranda A.M., Bravo F.V., Chan R.B., Sousa N., Di Paolo G., Oliveira T.G., Differential Lipid Composition and Regulation Along the Hippocampal Longitudinal Axis, *Miranda et al. Translational Psychiatry*, 2019, **9**, 144.
- Monserrat M., Seixasb A.L.R., Ferreira-Cravo M., Bürguer-Mendon M., Garciae S.C., Kaufmann Jr. C.G., Ventura-Lima J., Interference of Single Walled Carbon Nanotubes (SWCNT) in the Measurement of Lipid Peroxidation in Aquatic Organisms Through TBARS assay, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, **140**, 103-108.
- Mora D., Fajilla G., Austin M., De Simone M., Occupancy Patterns Obtained by Heuristic Approaches: Cluster Analysis and Logical Flowcharts. A Case Study in a University Office, *Energy & Buildings*, 2019, **186**, 147-168.
- Mostaço-Guidolin L.B., Bachmann L., Application of FT-IR Spectroscopy for Identification of Blood and Leukemia Biomarkers: A Review over the Past 15 Years, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2011, **46**(5), 388-404.
- Namdar M., Schepis T., Koepfli P., Gaemperli O., Siegrist P.T., Grathwohl R., Valenta I., Delaloye R., Klainguti M., Wyss C.A., Lüscher T.F., Kaufmann P.A., Caffeine Impairs Myocardial Blood Flow Response to Physical Exercise in Patients with Coronary Artery Disease as well as in Age-Matched Controls, *Plos One*, 2009, **4**(5), 5665.
- Nawrot P., Jordan S., Eastwood J., Rotstein J., Hugenholtz A., Feeley M., Effects of Caffeine on Human Health, *Food Addit Contam*, 2003, **20**(1), 1-30.
- Nehlig A., Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption, *Pharmacol Rev*, 2018, **70**(2), 384-411.

Ngugi A.K., Bottomley C., Kleinschmidt I., Sander J.W., Newton C.R., Estimation of the Burden of Active and Life-Time Epilepsy: a Meta-analytic Approach, *Epilepsia*, 2010, **51**(5), 883-890.

Norden A.D., Blumenfeld H., The Role of Subcortical Structures in Human Epilepsy, *Epilepsy & Behavior*, 2002, **3**(3), 219-231.

Ozek N., Bal I., Sara Y., Onur R., Severcan F., Structural and Functional Characterization of Simvastatin-induced Myotoxicity in Different Skeletal Muscles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, **1840**, 406-415.

Panayiotopoulos C.P., Treatment of Typical Absence Seizures and Related Epileptic Syndromes, *Paediatr Drugs*, 2001, **3**(5), 379-403.

Pandolfo P., Machado NJ., Köfalvi A., Takahashi R.N., Cunha R.A., Caffeine Regulates Frontocorticostratial Dopamine Transporter Density and Improves Attention and Cognitive Deficits in an Animal Model of Attention Deficit Hyperactivity Disorder, *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013, **23**(4), 317-328.

Parmar K., Stadelmann C., Rocca M.A., Langdon D., D'Angelo E., D'Souza M., Burggraaff J., Wegner C., Sastre-Garriga J., Barrantes-Freer A., Dorn J., Uitdehaag BMJ., Montalban X., Wuerfel J., Enzinger C., Rovira A., Tintore M., Filippi M., Kappos L., Sprenger T., The Role of the Cerebellum in Multiple Sclerosis-150 Years After Charcot, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2018, **89**, 85-98.

Pekin E., Enstrümental Analiz, *Paradigma Akademi Yayınları*, 2013, 68-75.

Perucca E., Tomson T., The Pharmacological Treatment of Epilepsy in Adults, *Lancet Neurol*, 2011, **10**(5), 446-456.

Pitkänen A., Lukasiuk K., Dudek F.E., Staley K.J., Epileptogenesis, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, **5**(10), DOI:10.1101/cshperspect.a022822.

Poltev V.I., Rodriguez E., Grokhlina T.L., Gonzalez. D., Computational Study of the Molecular Mechanisms of Caffeine Action: Caffeine Complexes With Adenosine Receptors, *International Journal of Quantum Chemistry*, 2010, **110**, 681- 688.

Pradhan S., Rajamani S., Agrawal G., Dash M., Samal S.K., NMR, FT-IR and raman characterization of biomaterials, *Characterization of Polymeric Biomaterials*, 2017 DOI:10.1016/B978-0-08-100737-2.00007-8.

Przeździk I., Faber M., Fernández G., Beckmann C.F., V.Haak K., The Functional Organisation of the Hippocampus Along its Long Axis is Gradual and Predicts Recollection, *Cortex*, 2019, **119**, 324-335.

Ribeiro J.A., Sebasti A.M., Caffeine and Adenosine, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, **20**(S1), 3-15.

Ribeiro J.A., Sebastião A.M., Mendonça A.D., Adenosine Receptors in the Nervous System: Pathophysiological Implications, *Progress in Neurobiology*, 2003, **68**, 377-392.

Richards D.A., Morrone L.A., Bowery N.G., Hippocampal Extracellular Amino Acids and EEG Spectral Analysis in a Genetic Rat Model of Absence Epilepsy, *Neuropharmacology*, 2000, **39**(12), 2433-2441.

Rogers P.J., Smith J.E., Caffeine, Mood and Cognition, *Lifetime Nutritional Influences on Cognition, Behaviour and Psychiatric Illness*, 2011, 251-271.

Russo E., Citraro R., Pharmacology of Epileptogenesis and Related Comorbidities in the WAG/Rij Rat Model of Genetic Absence Epilepsy, *Journal of Neuroscience Methods*, 2018, **310**, 54-62.

Rutlanda W.J., Feldmana R.E., Delmanb B.N., Panovc F., Fieldsd M.C., Marcused L.V., Hofe P.R., Linf H.M., Balchandania P., Subfield-specific Tractography of the Hippocampus in Epilepsy Patients at 7 Tesla, *European Journal of Epilepsy*, 2018, **62**, 3-10.

Sarkisian M., Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders, *Epilepsy & Behavior*, 2001, **2**, 201-216.

Sarkisova K., van Luijelaar G., The WAG/Rij strain: A Genetic Animal Model of Absence Epilepsy with Comorbidity of Depression, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2011, **35**(4), 854-876.

Scammell, T.E., Arrigoni, E., Lipton O., Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep, *Neuron*, 2017, **93**, 747-765.

Scheffer I.E., Berkovic S., Capovilla G., Connolly M.B., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Gary W. Mathern G.W., Mosh S.L., Nordli D.R., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y.H., Zuberi S.M., ILAE Classification of the Epilepsies: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology, *Epilepsia*, 2017, **58**(4), 512-521.

Schmidt B., Roberts R.S., Davis P., Doyle L.W., Barrington K.J., Ohlsson A., Solimano A., Tin., Caffeine Therapy for Apnea of Prematurity, *N Engl J Med*, 2006, **354**, 2112-2121.

Sendrowski K., Sobaniec W., Hippocampus, Hippocampal Sclerosis and Epilepsy, *Pharmacological Reports*, 2013, **65**, 555-565.

Setiowaty G., Che Man Y., A rapid Fourier Transform Infrared Spectroscopic Method for the Determination of 2-TBARS in Palm Olein, *Food Chemistry*, 2003, **81**, 147-154.

Severcan F., Gorgulu G., Turker Gorgulu S., Guray T., Rapid Monitoring of Diabetes-Induced Lipid Peroxidation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Evidence from Rat Liver Microsomal Membranes, *Analytical Biochemistry*, 2005, **339**(1), 36-40.

Severcan M., I.Haris P., Severcan F., Using Artificially Generated Spectral Data to Improve Protein Secondary Structure Prediction from Fourier Transform Infrared Spectra of Proteins, *Analytical Biochemistry*, 2004, **332**(2), 238-244.

Sevinç A., Yonar D., Severcan F., Investigation of Neurodegenerative Diseases from Body Fluid Samples Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 2015, **4**, 341-357.

Shoykhet M., Land, P.W., Simons, D.J., Whisker Trimming Begun at Birth or on Postnatal Day 12 Affects Excitatory and Inhibitory Receptive Fields of Layer IV Barrel Neurons, *J.Neurophysiol*, 2005, **94**, 3987-3995.

Silva C.G., Métin C., Fazeli W., Machado N.J., Darmopil S., Launay P.S., Ghestem, A., Nesa M.P., Bassot E., Szabó E., Baqi Y., Müller C.E., Tomé A.R., Ivanov A., Isbrandt D., Yuri Zilberter Y., Rodrigo A. Cunha R.A., Esclapez M., Bernard C., Adenosine Receptor Antagonists Including Caffeine Alter Fetal Brain Development in Mice, *Science Translational Medicine*, 2013, **5**(197), 197ra104.

Simons D.J., Land, P.W., Early Experience of Tactile Stimulation Influences Organization of Somatic Sensory Cortex, *Nature*, 1987, **326**, 694-697.

Sitnikova E., Neonatal Sensory Deprivation Promotes Development of Absence Seizures in Adult Rats with Genetic Predisposition to Epilepsy, *Brain Research*, 2011, **1377**, 109-118.

Sivakumar S., Khatiwada C.P., Sivasubramanian J., Raja B., Protective Effects of Deferiprone and Desferrioxamine in Brain Tissue Of aluminum Intoxicated Mice: An FTIR Study, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2014, **4**(1), 53-61.

Skoog D.A., Holler F.J., Land Nieman T.A., Enstrümantal Analizin İlkeleri, Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Bilim yayıncılık, İstanbul, 846s, 1998.

Sloviter R.S., The Neurobiology of Temporal Lobe Epilepsy: to much Information, not Enough Knowledge, *Comptes Rendus Biologies*, 2005, **328**(2), 143-153.

Snell R., Clinical Neuroanatomy, 7rd edition, the point, Washington, 2000.

Soman S., Anju T.R., Jayanarayanan S., Antony S., Paulose C.S., Impaired Motor Learning Attributed to Altered AMPA Receptor Function in the Cerebellum of Rats with Temporal Lobe Epilepsy: Ameliorating Effects of withania Somnifera and withanolide A, *Epilepsy & Behavior*, 2013, **27**(3), 484-491.

Songur A., Özen O.A., Sarsılmaz M., Hippocampus, *T Klin J Med Sci*, 2001, **21**, 427-431.

Sridharan K., IR Spectroscopy, *Spectral Methods in Transition Metal Complexes*, 2016, 69-97.

Stafstrom C.E., Carmant L., Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, **5**(6), DOI: 10.1101/cshperspect.a022426.

Staniszewska E., Malek K., Baranska M., Rapid Approach to Analyze Biochemical Variation in Rat Organs by ATR FT-IR Spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **118**, 981-986.

Stefanello N., Spanevello R.M., Passamontic S., Porciúnculad L., Bonane C.D., Olabiyif A., Rochaa J., Coffee, Caffeine, Chlorogenic Acid, and the Purinergic System, *Food and Chemical Toxicology*, 2019, **123**, 298-313.

Steinhoff B.J., Hirsch E., Mutani R., Nakken K.O., The Ideal Characteristics of Antiepileptic Therapy: an Overview of Old and New AEDs, *Acta Neurol Scand*, 2003, **107**(2), 87-95.

Stoodley C.J., Limperopoulos C., Structure Function Relationships in the Developing Cerebellum: Evidence from Early-Life Cerebellar Injury and Neurodevelopmental Disorders, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2016, **21**(5), 356-364.

Sultan F., Cerebellum: Anatomy and Physiology, *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference*, 2015, 243-249. DOI:10.1016/B978-0-12-397025-1.00218-9

Suresh S., Karthikeyan S., Jayamoorthy K., FTIR and Multivariate Analysis to Study the Effect of Bulk and Nano Copper Oxide on Peanut Plant Leaves, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 2016, 343-350.

Suzuki M., Hagin H., Nohara S., Zhou S.Y., Kawasaki Y., Takahashi T., Matsui M., Seto H., Ono T., Kurachi M., Male-specific Volume Expansion of the Human Hippocampus during Adolescence, *Cerebral Cortex*, 2005, **15**(2), 187-193.

Svennerholm L., Boström K., Jungbjer B., Changes in Weight and Compositions of Major Membrane Components of Human Brain During the Span of Adult Human Life of Swedes, *Acta Neuropathol*, 1997, **94**(4), 345-352.

Sysoeva M.V., Vinogradova L.V., Kuznetsova G.D., Sysoev I.V., van Rijn C.M., Changes in Corticocortical and Corticohippocampal Network During Absence Seizures in WAG/Rij Rats Revealed with Time Varying Granger Causality, *Epilepsy & Behavior*, 2016, **64**(pta), 44-50.

Szalontai B., Nishiyama Y., Zoltan Gombos Z., Murata N., Membrane Dynamics as seen by Fourier Transform Infrared Spectroscopy in a Cyanobacterium, *Synechocystis PCC 6803* The effects of Lipid Unsaturation and the Protein-to-Lipid Ratio, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, **1509**, 409-419.

Tarnopolsky M.A., Effect of Caffeine on the Neuromuscular System-Potential as an Ergogenic Aid, *Appl. Physiol. Nutr. Metab*, 2008, **33**(6), 1284-1289.

Taşkıran E., Gürses C., Electroencephalography Findings in the Epilepsy Animal Models, *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*, 2017, **10**(1), 35-40.

Tchekalarova J., Kubová H., Mareš P., Postnatal Period of Caffeine Treatment and Time of Testing Modulate the Effect of Acute Caffeine on Cortical Epileptic After Discharges in Rats, *Brain Research*, 2010, **1356**, 121-129.

Tchekalarova J., Kubova H., Mares P., Postnatal Caffeine Treatment Affects Differently Two Pentylentetrazol Seizure Models in Rats, *Seizure*, 2009, **18**, 463-469.

Tchekalarova J.D., Kubová H., Mare P., Early Caffeine Exposure: Transient and Long-Term Consequences on Brain Excitability, *Brain Research Bulletin*, 2014, **104**, 27-35.

Thijs R.D., Surges R., O'Brien T.J, Sander J.W., Epilepsy in Adults, *Lancet*, 2019, **393**, 689-701.

Thurmana D.J., Faughta E., Helmersa S., Kimb H., Kalilanic L., New-onset Lesional and Nonlesional Epilepsy in the US Population: Patient Characteristics and Patterns of Antiepileptic Drug Use, *Epilepsy Research*, 2019, **157**, 106210.

Touret M., Parrot S., Denoroy L., Belin M.F., Didier-Bazes M., Glutamatergic Alterations in the Cortex of Genetic Absence Epilepsy Rats, *BMC Neuroscience*, 2007, **8**, 69.

Toyran N., Turan B., Severcan F., Selenium Alters the Lipid Content and Protein Profile of Rat Heart: An FT-IR Microspectroscopic Study, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, **458**(2), 184-193.

Toyran N., Lasch P., Naumann D., Turan B., Severcan F., Early Alterations in Myocardia and Vessels of the Diabetic Rat Heart: an FT-IR Microspectroscopic Study, *Biochem. J.*, 2006, **397**, 427-436.

Toyran N., Zorlu F., Dönmez G., Öge K., Severcan F., Chronic Hypoperfusion Alters the Content and Structure of Proteins and Lipids of Rat Brain Homogenates: a Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study, *Eur Biophys J*, 2004, **33**, 549-554.

Turker S., Application of Infrared Spectroscopy in the Study of Neurological Diseases, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 2012, 303-323.

Turker S., İlbay G., Severcan, M., Severcan F., Investigation of Compositional, Structural, and Dynamical Changes of Pentylentetrazol-Induced Seizures on a Rat Brain by FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 2014a, **86**, 1395-1403.

Turker S., Severcan M., İlbay G., Severcan F., Epileptic Seizures Induce Structural and Functional Alterations on Brain Tissue Membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014b, **1838**, 3088-3096.

Turker-Kaya S., Komsuoğlu-Çelikyurt İ., Çelikyurt U., Kına A., Inhibition of PDE4 by Low Doses of Rolipram Induces Changes in Lipid and Protein Components of Mice Heart, *General Physiology and Biophysics*, 2018, **37**(1), 1-12.

Turker-Kaya S., Mutlu., Çelikyurt İ., Akar F., Ulak G., Tianeptine, Olanzapine and Fluoxetine Show Similar Restoring Effects on Stress Induced Molecular Changes in Mice Brain: An FT-IR study, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, **161**, 178-185.

Turnbull D., Rodricks J.V., Gregory F. Mariano G.F., Caffeine and Cardiovascular Health, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2017, **89**, 165-185.

van Koert R.R., Bauer P.R., Schuitema I., Sander J.W., Visser G.H., Caffeine and Seizures: A Systematic Review and Quantitative Analysis, *Epilepsy & Behavior*, 2018, **80**, 37-47.

van Lujtelaar G., Sitnikova E., From Generalized to Focal Absence Seizures, *Epilepsi*, 2004, **10**(2), 112-128.

van Lujtelaar G., Sitnikova E., Global and Focal Aspects of Absence Epilepsy: The Contribution of Genetic Models, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2006, **30**(7), 983-1003.

van Lujtelaar G., Onat FY., Gallagher MJ., Animal Models of Absence Epilepsies: What do They Model and do Sex and Sex Hormones Matter?, *Neurobiol Dis.* 2014, **72**, 167-79.

van Vliet E.A., Aronica E., Gorter J.A., Blood-brain Barrier Dysfunction, Seizures and Epilepsy, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, **38**, 26-34.

Vickers M.H, Guan J., Gustavsson M., Krägeloh C.U., Breier B.H., Davison M., Fong B., Norris C., McJarrow P., Hodgkinson S.C., Supplementation with a Mixture of Complex Lipids Derived from Milk to Growing Rats Results in Improvements in Parameters Related to Growth and Cognition, *Nutrition Research*, 2009, **29**(6), 426-435.

Wadhwa M., Sahu S., Kumari P., Kauser H., Ray K., Panjwani U., Caffeine and Modafinil Given During 48 h Sleep Deprivation Modulate Object Recognition Memory and Synaptic Proteins in the Hippocampus of the rat, *Behavioural Brain Research*, 2015, **294**, 95-101.

Weber Y.G., Lerche H., Genetik der Idiopathischen Epilepsien, *Der Nervenarzt*, 2013, **84**(2), 151-156.

Yin Y.H., Ahmad N., Makmor-Bakry M., Pathogenesis of Epilepsy: Challenges in Animal Models, Pathogenesis of Epilepsy: Challenges in Animal Models, *Iran J Basic Med Sci*; 2013, **16**(11), 1119-1132.

Zand-Rajabi H., Madadlou A., Citric Acid Cross-Linking of Heat-set whey Protein Hydrogel Influences its Textural Attributes and Caffeine Uptake and Release Behaviour, *International Dairy Journal*, 2016, **61**, 142-147.

Zeidman P., Maguire E.A., Anterior Hippocampus: the Anatomy of Perception, Imagination and Episodic Memory, *Nature Reviews Neuroscience*, 2016, **17**, 173-182.

Zohdi V., Whelan D.R., Wood B.R., Pearson J.T., Bambery K.R., Black M.J., Importance of Tissue Preparation Methods in FT-IR Micro-Spectroscopical Analysis of Biological Tissues: 'Traps for New Users', *PLoS ONE*, 2015, DOI:10.1371.

Zsarnovszky A., Kiss D., Jocsak G., Nemeth G., Toth I., Horvath T.L., Thyroid Hormone and Estrogen Receptor Interactions with Natural Ligands and Endocrine Disruptors in the Cerebellum, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2018, **48**, 23-36.



EKLER

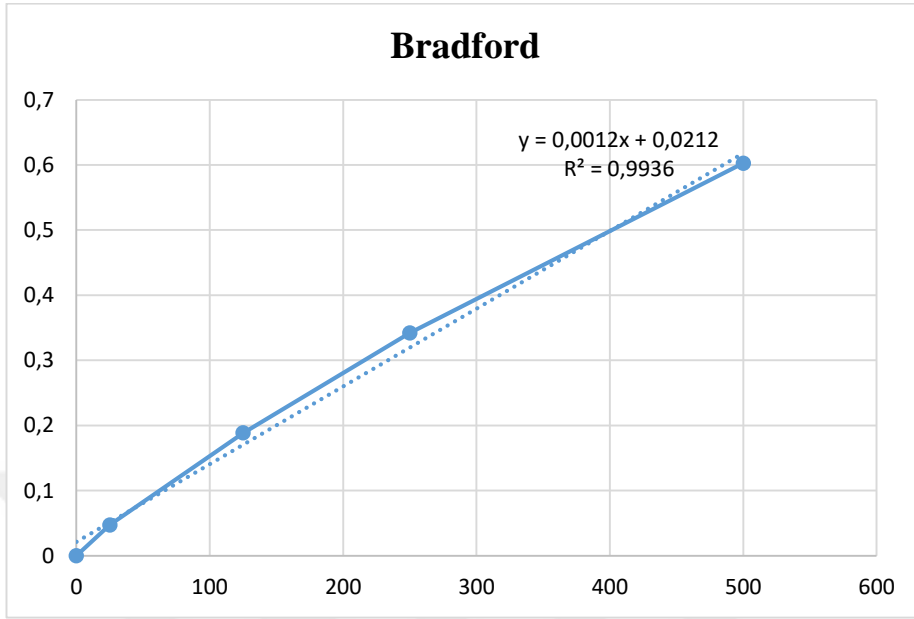
Ek-A

Kontrol hipokampus ile serebellum ve kafein uygulanan hipokampus ile serebellum gruplarının spektral parametre değerleri Tablo A.1’de gösterilmektedir. Değerler her örnek için ortalama \pm standart sapma şeklinde belirtilmiştir. İstatistiksel anlamlılık derecesi ($p < 0,05^*$) ve ($p < 0,001^{**}$) şeklinde belirtilmiştir.

Tablo A.1. Kontrol hipokampus ile serebellum ve kafein uygulanan hipokampus ile serebellum gruplarının spektral parametre değerleri

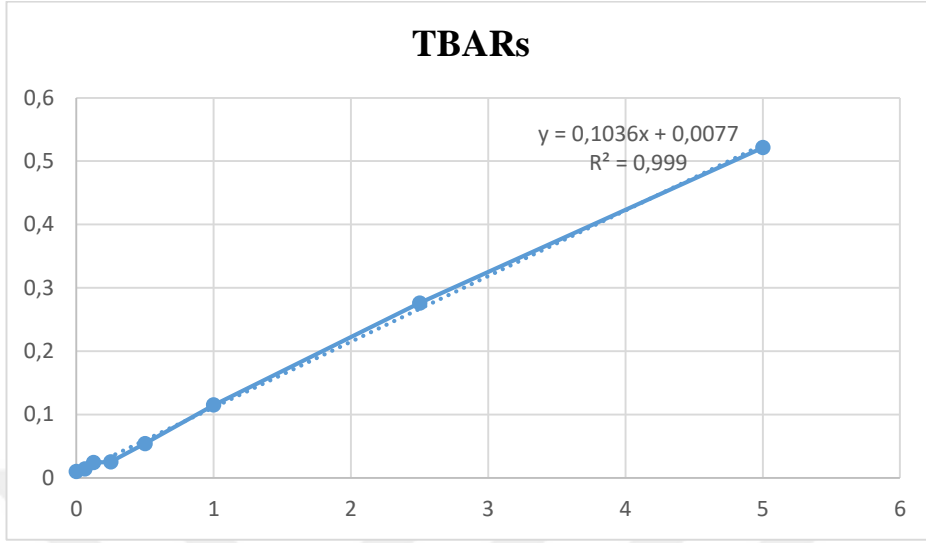
	Kontrol Hipokampus (n=6)	Kafein Hipokampus (n=6)	Kontrol Serebellum (n=6)	Kafein Serebellum (n=6)
Frekans				
CH₂ asimetric	2923.54 \pm 0.26	2922.57 \pm 0.86**	2922.33 \pm 0.58	2924.18 \pm 0.10*
CH₂ simetric	2852.54 \pm 0.16	2851.19 \pm 0.28*	2851.97 \pm 0.18	2852.65 \pm 0.08*
C=O	1736.59 \pm 0.44	1737.39 \pm 0.80*	1737.44 \pm 0.60	1737.61 \pm 0.38*
PO₂ asimetric	1235.00 \pm 0.67	1231.17 \pm 0.71	1230.54 \pm 1.88	1234.47 \pm 1.19*
PO₂ simetric	1073.16 \pm 0.33	1071.95 \pm 0.84	1074.00 \pm 0.79	1071.67 \pm 0.67*
Bant alanları				
Olefinik	1.24 \pm 0.14	1.37 \pm 0.22*	1.43 \pm 0.23	1.02 \pm 0.081
CH₂ asimetric	4.36 \pm 0.57	5.83 \pm 0.53*	3.16 \pm 0.80	4.44 \pm 0.69
CH₂ simetric	9.01 \pm 0.87	8.08 \pm 0.69*	2.14 \pm 1.31	7.39 \pm 0.59
C=O	2.20 \pm 0.49	3.33 \pm 0.80*	3.08 \pm 0.60	1.97 \pm 0.38
Amid I	7.60 \pm 1.76	11.07 \pm 0.35*	11.8 \pm 1.03	6.72 \pm 0.74
Amid II	5.21 \pm 0.76	6.73 \pm 0.37*	7.89 \pm 0.59	6.63 \pm 0.05
PO₂ asimetric	3.02 \pm 0.46	4.37 \pm 0.59*	5.23 \pm 0.59	3.45 \pm 0.88
PO₂ simetric	4.54 \pm 0.54	5.45 \pm 0.59*	0.50 \pm 0.73	5.04 \pm 0.59
Bant alan oranları				
Olefinik/lipit	0.087 \pm 0.014	0.091 \pm 0.0008	0.086 \pm 0.003 *	0.090 \pm 0.006*
C=O/lipit	0.175 \pm 0.014	0.170 \pm 0.009	0.193 \pm 0.011 *	0.165 \pm 0.015*
Lipit/protein	0.919 \pm 0.098	0.942 \pm 0.002	0.898 \pm 0.0008*	0.989 \pm 0.002*
Bant genişliği				
CH₂ asimetric	21.33 \pm 0.39	20.42 \pm 0.77*	20.47 \pm 0.13	21.92 \pm 0.61**
CH₂ simetric	9.81 \pm 0.11	9.6 \pm 0.10*	9.71 \pm 0.008	9.77 \pm 0.07*
Bradford Test				
	0.53 \pm 1.2	0.57 \pm 0.09*	0.60 \pm 1.49	0.53 \pm 1.59*
TBARs Test				
	0.23 \pm 1.01	0.25 \pm 0.11*	0.27 \pm 1.28	0.22 \pm 1.48*

Ek-B



Şekil B.1. Bradford standart eğri grafiği

Ek-C



Şekil C.1. TBARs standart eğri grafiği



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2016/33	ARAŞTIRMANIN ADI	Neonatal dönemde kafein uygulananın nöbet modellerinde davranışsal, elektroensefalografik, nöroanatomik etkilerinin araştırılması.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Doç.Dr.Gül İLBAY / Kocaeli Tıp Fak.
BAŞVURU BİLGİLERİ	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Prof.Dr.Melda YARDIMOĞLU YILMAZ, Fizyoterapist Zeynep İkbal DOĞAN, Uzman Fizyoterapist Aymen BALIKÇI, Dr.Öğr.Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	DİLEKÇE	x
------------------------------	----------------	---

KARAR BİLGİLERİ	24.11.2016 tarihli Etik Kurul Oturumunda KOU HADYEK 7/1-2016 karar sayısı ile onaylanmış bulunan çalışma için talep edilen değişiklikler değerlendirilmiş olup çalışmaya beyin dokularında FTIR analizi yapılması ve Dr.Öğr.Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA'nın yardımcı araştırmacı olarak çalışmaya eklenmesi uygun bulunarak onaylanmıştır.
	KARAR NO: KOU HADYEK 1/6-2018 KARAR TARİHİ: 18.10.2018

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Noroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Raportör	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Dr.Öğr. Üyesi Sabri CORA Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Dr.Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	KOU Tıp Fakültesi Biyostatistik ve Tıbbi Bilgi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç Dr. Gürler AKPINAR Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

Şekil D.1. Hayvan deneyleri etik kurul belgesi

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Şentürk D., Türker-Kaya S., İlbaý G., WAG/Rij Sıçanlarda Neonatal Dönemde Uygulanan Kafeinin Hipokampus ve Serebellum Bölgelerindeki Biyofiziksel Etkilerinin İncelenmesi, *Imascon 2019 Spring (Uluslararası Marmara Fen Ve Sosyal Bilimler Kongresi)*, Kocaeli, Nisan 2019.

Şentürk D., Türker-Kaya S., İlbaý G., Kafeinin Sıçan Beyni Hipokampus Ve Serebellum Bölgelerinde Meydana Getirdiđi Moleküler Değişikliklerin FT-IR Spektroskopisiyle İncelenmesi, *24. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Manisa, Eylül 2018.

Türker-Kaya S., Yıldırım D., **Şentürk D.**, Dağcı K., İlbaý G., Comparative Analysis of Different Regions of Rat Brain Tissue by FT-IR Spectroscopy, *Advances in Health and Natural Sciences*, Chapter 11, Nova Medicine & Health, Aralık 2018.

ÖZGEÇMİŞ

30 Haziran 1994 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı lisans eğitimini 2017 yılında tamamladı. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde başladığı yüksek lisans eğitimine halen devam etmektedir.

