KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARMODAFİNİL'İN DİPALMİTOİLFOSFATİDİLKOLİN LİPİTLERİ İLE ETKİLEŞMESİNİN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

HANDAN KIRKOÇOĞLU

KOCAELİ 2017

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARMODAFİNİL'İN DİPALMİTOİLFOSFATİDİLKOLİN LİPİTLERİ İLE ETKİLEŞMESİNİN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

HANDAN KIRKOÇOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Sevgi TÜRKER KAYA		
Danışman,	**Kocaeli Üniversitesi**	.....
Doç. Dr. Özlem AKSOY		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniversitesi**	.....
Yrd. Doç. Dr. İpek ŞAHİN		
Jüri Üyesi,	**Ege Üniversitesi**	.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 29.06.2017

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Günümüzde giderek artan uyku apnesi, narkolepsi gibi uyku sorunlarını tedavi etmek üzere piyasaya sunulmuş olan Armodafinil ilacının, moleküler etki mekanizması henüz açıklanabilmiş değildir. Söz konusu ilacın kullanımının gün geçtikçe artması ve piyasada varlığını sürdürmesi açısından, ilacın moleküler etki mekanizmasının araştırılması önem arz etmektedir.

Armodafinilin hücre zarı lipitleri üzerinde etkisinin incelendiği bu tezin hazırlanması esnasında desteklerini esirgemeyen, akademik anlayışıyla birlikte, her türlü desteği, sabrı, özveriyi gösterip, bu tezin hazırlanmasının tüm aşamalarında, sevgi ve hoşgörüsüyle yanımda olan çok değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Sevgi Türker Kaya'ya,

Eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Özlem Aksoy'a teşekkürlerimi borç bilir,

Hayatımı anlamlı kılan sevgili kızım Zeynep Arya, desteğini esirgemeyen eşim Enes Kırkoçoğlu, hayatım boyunca beni destekleyen anneme ve babama da sonsuz minnet duygularımı sunarım.

Haziran - 2017 Handan KIRKOÇOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER i
ŞEKİLLER DİZİNİ ii
TABLOLAR DİZİNİ iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Uyku Bozuklukları 3
1.2. Armodafinil (R-Modafinil, Nuvigil, ARM) 3
1.3. İlaç-Lipit Etkileşmeleri 6
1.4. Çok Tabakalı Model Zarlar (MLV, Lipozomlar) 7
1.4.1. Lipit çift tabakalarının termotropik fazları 9
1.5. Spektroskopi 10
1.5.1. Çalışmada kullanılan spektroskopik yöntemler 10
1.5.1.1. Kızılötesi spektroskopisinin esasları 10
1.5.1.2. Kızılötesi titreşim spektroskopisi 13
1.5.2. Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) 15
1.5.3. Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) 17
2. MATERYAL VE METOD 19
2.1. Kimyasal Maddeler 19
2.2. Çok Tabakalı Model Zar (Lipozomlar, MLVs) Örneklerinin Hazırlanması 19
2.3. FT-IR Spektroskopsi Çalışmaları 19
2.3.1. Spektrum eldesi 19
2.4. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması ve Termogramların Eldesi 21
3. BULGULAR 22
3.1. FT-IR Spektroskopisi Çalışmaları 22
3.1.1. CH_3 simetrik gerilme bandı (~2873 cm^{-1}) 22
3.1.2. CH_2 asimetrik gerilme bandı (~2918 cm^{-1}) 23
3.1.3. C=O gerilme bandı (~1740 cm^{-1}) 23
3.1.4. PO_2^- asimetrik gerilme bandı (~1240^{-1}) 24
3.2. DSC Çalışmaları 25
4. TARTIŞMA 27
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 33
KAYNAKLAR 35
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 42
ÖZGEÇMİŞ 43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Armodafinil'in kimyasal yapısı ve şematize gösterimi 4
Şekil 1.2. Lipozom hazırlama yöntemleri 8
Şekil 1.3 Çok tabakalı lipozomun yapısı 8
Şekil 1.4. Çift tabakalı lipitlerin fazlarının şematik gösterimi 10
Şekil 1.5. Elektromanyetik spektrum bölgeleri 11
Şekil 1.6. Bir elektromanyetik dalganın bileşenlerinin gösterimi 12
Şekil 1.7. Enerji Seviye Diyagramı 12
Şekil 1.8. Triatomik moleküllerde lineer ve lineer olmayan titreşim türleri 15
Şekil 1.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi şematik gösterimi 16
Şekil 1.10. Differansiyel Taramalı Spektroskopisinin (DSC) 18
Şekil 2.1. Tampon çözelti spektrumu çıkartılmamış, MLV spektrumu(A) ve tampon çözelti spektrumu çıkartılmış MLV spektrumu (B) 20
Şekil 3.1. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin CH_3 simetrik band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi 22
Şekil 3.2. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin CH_2 asimetrik band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi 23
Şekil 3.3. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin C=O band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi 24
Şekil 3.4. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin PO_2^- band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi 24
Şekil 3.5. DPPC ve DPPC'nin % 1, %5, %10 ve %20 mol ARM içeren konsantrasyonları termogramları 25
Şekil 3.6. DPPC ve DPPC'nin % 1, %5, %10 ve %20 mol ARM içeren konsantrasyonları için sıcaklığa kooperativite değeri 26

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Kızılötesi Spektrum Bölgeleri 13
Tablo 3.1. Ana faz geçiş sıcaklığı(T_m), yarı yükseklikteki tam genişlik($\Delta T_{1/2}$), ana faz geçiş entalpisi, ΔH^o_{vH} (Vant Hoff Entalpi), Kooperativite(CU).....26

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

c : Işık hızı, (km/s)
E : Enerji, (J)
ΔH^{o}_{vH} : Van`t Hoff Entalpi, (J)
ΔE : İlgili Enerji Seviyesindeki Ayrılma Miktarı, (J)
h : Planck sabiti, (j/s)
λ : Işığın dalga boyu, (m)
V_{vib} : Vibrasyonel Frekans, (s^{-1})

Kısaltmalar

ARM : Armodafinil
DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine (Dipalmitoilfosfatidilkolin)
DSC : Differential Calorimetry Scanning (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
FDA : Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi)
FT-IR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi)
MLV : Multilamellar Vesicles (Çok Tabakalı Vezikül) - Lipozom
VLPO : Ventrolateral Preoptic Lesions (Ventrolateral preoptik lezyonlar)

ARMODAFİNİL'İN DİPALMİTOİLFOSFATİDİLKOLİN LİPİTLERİ İLE ETKİLEŞMESİNİN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

ÖZET

Uyku bozuklukları yaşam kalitesini ciddi derecede etkileyen ve günümüzün en yaygın görülen hastalıklarından biridir. Uyku bozuklukları tedavisinde yaygın olarak kullanılan Armodafinil (ARM) rasemik bileşik olan Modafinilin R-enantiomeridir. ARM'nin hücresel aksiyon mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada ARM'nin uyanıklığı tetikleyici aktivitesi ile ilgili yardımcı bilgiler elde etmek amacıyla değişen konsantrasyonlardaki (%1, %5, %10, %20 mol) ARM'nin dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) lipitlerinden oluşturulmuş lipozomlarla etkileşimi Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile incelendi.

FT-IR sonuçlarına göre artan ARM konsantrasyonlarıyla birlikte CH_3 simetrik, CH_2 asimetrik ve PO_2^- asimetrik gerilme bant frekanslarının, daha düşük değerlere kaydığı, C=O modunun frekans değerinin ise konsantrasyona bağlı olarak farklı etkilendiği tespit edildi. Bu verilere göre ARM'nin, DPPC lipitlerinin kafa gruplarının ve kafa grubuna yakın bölgelerinin hidrojen bağı yapma kapasitelerini değiştirdiğini ayrıca lipitlerin daha düzenli hale geçmesini sağladığı bulundu. DSC verilerine göre ise ARM'nin DPPC ana faz geçiş sıcaklık(Tm), kooperativite(CU) ve ana faz geçiş entalpi (ΔH_{cal}) değerlerini azalttığı görüldü.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara dayanarak, ARM'nin DPPC zar lipitleri ile etkileşime girmesi, hücre zarında yüksek oranda bulunan PC(Fosfatidilkolin) lipitlerinin ARM'nin hücresel aksiyon mekanizmasında belirgin bir role sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Armodafinil (ARM), Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Modafinil.

INVESTIGATION OF THE INTERACTION ARMODAFINIL WITH DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE LIPIDS BY BIOPHYSICAL METHODS

ABSTRACT

Sleep disorders are one of the common and serious diseases affecting the quality of life today. Armodafinil (ARM), R enantiomer of the racemic compound modafinil, is widely used in the treatment of sleep disorders. Cellular mechanism of action of ARM has not been explained yet. In the present study we aiming to obtain additional information about its awakeness stimulating activity the interaction of ARM at varying concentrations (1%, 5%, 10%, 20% mol) with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes by using Fourier Transform Infrared(FT-IR) Spectroscopy and Differantial Scanning Calorimetry (DSC) was investigated.

According to FT-IR results, it was found that, as the ARM concentrations increased, the frequency value of the CH_3 symmetric, the CH_2 asymmetric and PO_2^- asymmentric streching bands were decreased and C=O band frequency value was shifted depending on the different concentrations of ARM. This data reveals that ARM has ability to change the hydrogen bonding capacities head groups and near the head group of DPPC lipids. Additionally, it enable lipids to become more ordered. DSC data showed that ARM towered to main phase transition temperature, cooperativity and the main phase transition entalphy values of DPPC.

Our results revealed that the interaction of ARM with DPPC membrane lipids might mean that phosphatidylcholine lipids, widely found in cell membrane, may have a prominent role in its cellular mechanism of action.

Keywords: Armodafinil (ARM), Differential scanning calorimetry (DSC), Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Modafinil.

GİRİŞ

Uyku bozukluğu tedavisinde kullanılan Amodafinil'in (ARM) dopamin reseptör agonisti ve dopamin geri alınım inhibitörü (Loland ve diğ., 2012; Mignot ve diğ., 1994; URL-1) şeklinde literatürde çalışmalar bulunsa da ilacın hücresel etki mekanizması tam olarak hala açıklanamamıştır (Vetrivelan, 2014; Qu ve diğ., 2008; Ferraro ve diğ., 2002; URL-1). ARM'nin etki mekanizmasının açıklığa kavuşturulması tedavisinde kullanıldığı patolojiler için ve sonradan geliştirilecek ilaçlar için önem arzetmektedir. ARM'nin moleküler mekanizması hücre içinde ya da hücre dışında hedefi olan doku ve moleküllere ulaşabilmesi ve etkisini göstermesi onun lipitlerle olan affinitesine bağlıdır. ARM-lipit etkileşimleri onun hücre zarındaki doğru oryantasyonu ve/veya konformasyonunu, dolayısıyla etkin bir şekilde aktivitesini belirler (Ribeiro ve diğ., 2010). Buna bağlı olarak, ARM'nin hücre zarındaki konumunun ve hücreye nüfuz edişinin belirlenmesi onun etkinliğinin ortaya çıkartılması açısından çok önemlidir. Fakat biyolojik zarlar kompozisyon olarak içerdikleri farklı çeşit ve oranlarda lipit ve proteinler nedeniyle çok karmaşık bir yapıya sahiptirler. Ayrıca, hücre zarı yapısındaki lipitlerin kimyasal yapıları ve kompozisyonu hücre zarı bileşenleri arasındaki fiziksel kuvvetleri değiştirdiğinden ajan ile zar etkileşimini doğrudan etkilenir (Ribeiro ve diğ., 2010). Bu durum, ilaç-zar etkileşimleri incelenirken sonuçların değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Bu tarz çalışmalara kontrollü olarak bileşenleri değiştirilebilen model zarlarla başlamak genel bir yaklaşımdır (Turker ve diğ., 2011; Karp, 1999; Severcan ve diğ., 2005; Korkmaz ve Severcan, 2005). Model zar sistemleri sayesinde ilaçların zar lipitleri ile etkileşimi sırasında zar içindeki lokasyonu, hangi fosfolipit molekülleri ile etkileşime girdiği, etkileşim sırasında zarın yapısal ve fonksiyonel parametrelerini nasıl değiştirdiğiyle ilgili bilgiler elde edilmektedir. Bu bağlamda; ARM'nin etki mekanizması hakkında ek ve faydalı bilgiler elde etmek için onun zar lipitleri ile etkileşiminin ayrıntılı olarak incelenmesi büyük önem kazanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında ARM'nin uyarıcı ve uyanıklığı tetikleyici aktivite oluşturmadaki hücresel etki mekanizmasıyla ilgili faydalı bilgiler elde etmek üzere

ARM'nin beyin hücre zarında yaygın olarak bulunan fosfatidilkolin lipitinin türevi olan, dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) lipitinden oluşmuş Çok Tabakalı Lipozomlar (MLV) ile etkileşmesinin incelenmesi amaçlandı.

Bu bağlamda; DSC (Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi) ve FT-IR (Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi) teknikleri kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki ARM'nin;

-lipit faz geçiş eğrisi, faz geçiş entalpisi, kooperativiti parametresi ve faz geçiş sıcaklıkları,

-zar lipit düzeni (lipit açil zincir esnekliği),

-lipit kafa grubu ve sulu kısma yakın gliserol iskeletinde hidrojen bağlanmasının şiddeti araştırıldı.

Elde edilen bilgiler ışığında ARM'nin DPPC lipitleri ile ne tarz etkileşime girdiği tespit edildi. Bu bilgilere dayanarak beyin hücre zarında yaygın olarak bulunan fosfatidilkolin lipitleri ile olası etkileşimleri ve bu lipitlerin ARM'nin etki mekanizmasında olabilecek rolü hakkında bilgiler elde edildi.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Uyku Bozuklukları

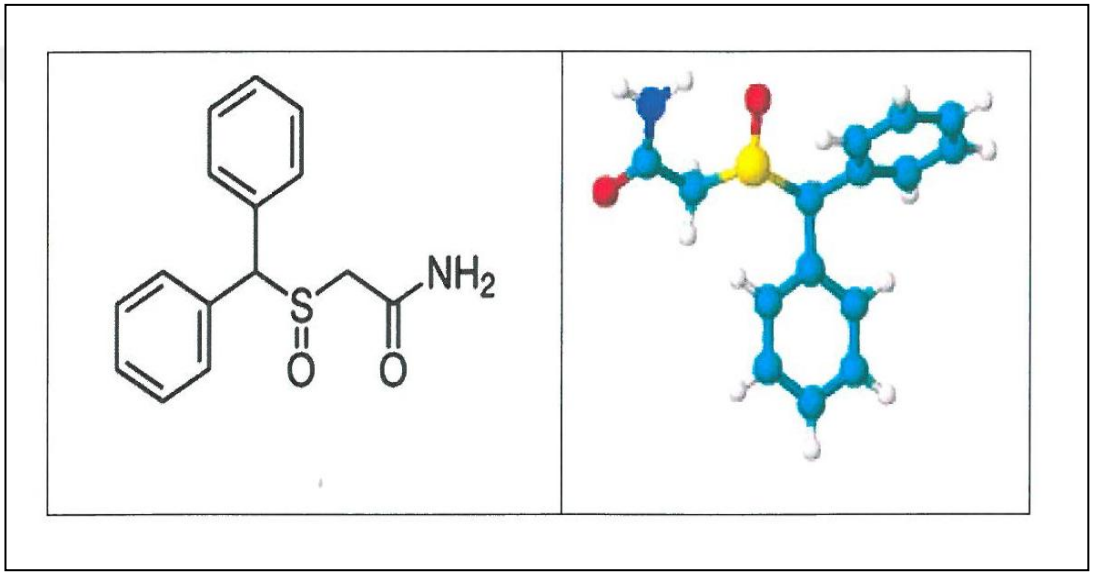
Uyku bozukluğu günümüzün sık görülen ve yaşam kalitesini ciddi derecede etkileyen hastalıklardandır. Uyku bozukluklarından biri olan gün içinde aşırı uykuya eğilim gösterme, genellikle beklenmedik zamanlarda ortaya çıkan ve karşı konulmaz uyku isteği olarak tanımlanabilir (Michael J.T., 2009). Söz konusu durumun oluşmasında yetersiz uyku (insomnia, kötü uyku alışkanlıkların sebep olduğu), bölünmüş uyku (genellikle uyku apnesi kaynaklı), nörolojik hastalıklar (narkolepsi, demans), uykunun belli bir zaman diliminde olmaması ve vardiyalı çalışmalarının yol açtığı sirkadiyen ritim bozukluğu uyku bozukluğu etmenlerinin rol oynadığı rapor edilmiştir (Drake ve diğ., 2004; Akerstedt ve diğ., 2003; Ohayon ve diğ., 2002).

Çeşitli faktörlerin etkisi ile oluşan uyku bozuklukları, bireyin yaşam kalitesini ve gün içindeki aktivitelerini direkt olarak etkilediği için tedavi amaçlı bir çok ilaç geliştirilmiş ve hala da geliştirilmeye devam edilmektedir (Ballas ve diğ., 2009; Stahl 2008; Schwartz 2005; Sulzer ve diğ., 2005; Kanbayashi ve diğ., 2000) Uyku bozukluğu tedavisinde kullanılan ilaçlardan en yaygın olarak kullanılanlardan birisi Armodafinil'dir (ARM).

1.2. Armodafinil (R-Modafinil, Nuvigil, ARM)

Armodafinilin (ARM), ($C_{15}H_{15}NO_2S$) kimyasal ismi 2-[(R)-(difenilmetil)sulfinil]asetamid ve moleküler ağırlığı 273,35 g\mol olup vücutta yarılanma ömrü 15-16 saattir (URL-1). Uyanıklığı destekleyip tetikleyen ağız yoluyla alınan, uyku apnesi, narkolepsi ve vardiyalı çalışma düzensizliklerinin yol açtığı sirkadiyen ritim bozukluğunun tedavisinde kullanılan ARM, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2007 yılında onaylanmıştır (URL-1).

ARM ile gündüz aşırı uyku hali, uyku apnesi ve narkolepsi hastalıkları dışında, Parkinson hastalığı, Kleine-Levin sendromu, şizofreni, bipolar depresyon, kronik yorgunluk, hiperaktivite, fibromyalji, metamfetamin, amfetamin madde bağımlılığı gibi hastalıklar üzerine de tedavi edici özellikleri olduğu belirtilen çalışmalar mevcuttur (Bavle ve Phatak 2013; Lower ve diğ., 2013; Loland ve diğ., 2012; Niemegeers ve diğ., 2012; Mohapatra ve diğ., 2010; Schwartz ve diğ., 2010; Jankoviç 2009; Nieves ve diğ.,2002). Bunların yanı sıra M.Hirskowitz ve ark. yaptıkları 12 haftalık plasebo kontrollü çalışmada ARM'nin epizodik sekonder hafızayı arttırdığı ve yorgunluğu azalttığı rapor edilmiştir (Hirskowitz ve diğ., 2007).



Şekil 1.1. Armodafinil'in kimyasal yapısı ve şematize gösterimi

ARM'nin uyanıklığı tetikleyici mekanizması tam olarak belirlenememesine rağmen ilacın beyindeki olası aksiyonları ile ilgili literatürde çeşitli bulgular mevcuttur (Vetrivelan ve diğ., 2014; Newman ve Katz, 2009 ; Tanda ve diğ., 2009; URL-1; Willie ve diğ., 2005). ARM'nin uyanıklığı tetikleyici aksiyon mekanizması sempatomimetik (amfetamin, metilfenidat) ajanlarla benzer olmasına rağmen farmakolojik profili sempatomimetik aminler gibi değildir (URL-1). Farmakolojik olarak uygun konsantrasyonlarda (50 mg,100 mg, 150 mg) ARM, serotonin, dopamin, adenozin, galanin, melatonin, melanokortin, orexin-1, orpanin, Pitüiter adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP), benzodiazepini gama amine bütirik asit (GABA) taşıyıcısı norepinefrin, kolin ya da fosfodisteraz VI, Katekol–O-metiltransferaz (COMT), GABA transaminaz ve tirozin hidroksilaz gibi potansiyel

olarak uyku ve uyanıklığı düzenleyen bir çok enzim ve reseptörü inhibe etmez ya da bağlanmaz. Ayrıca ARM'nin direkt ya da indirekt bir şekilde dopamin reseptör agonisti olarak çalışmadığı ancak in vitro olarak dopamin taşıyıcısına bağlandığı ve dopaminin geri alınmasını engellediği rapor edilmiştir (URL-1).

Modafinilin enantiomeri olan ARM'nin etki mekanizmasıyla ilgili bilgiler modafinil üzerine yürütülen çalışmalardan elde edilmeye çalışılmaktadır. Örneğin; ARM modafinil ile dopamin, nöradrenalin ve serotonin reseptörleri üzerinde aynı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca haloperidol ve α-metil-p-tirozin amfetaminlerin etkisini bloke ederken modafinilin dolayısıyla R-modafinilin etkisini bloke edemediği bulunmuştur (Simon ve diğ., 1995). İlaveten modafinilin ve ARM'nin etkilerini hipokretin sistemden dopamin ve\veya nörepinefrinle ilişkili basamaklarda veya hücre bağlantılı noktalarındaki elektriksel bağlantıyı arttırarak gerçekleştirdikleri düşünülmektedir (Beck ve diğ., 2008; Murillo Rodrigez ve diğ., 2007; Urbano ve diğ., 2007; De Saint Hilaire ve diğ., 2001). ARM'nin proteinlere bağlanarak aksiyon gösteren ilaçların tersine, vücuda çok iyi bir şekilde dağıldığı ve dokularda yüksek afinite göstermediği görülmüştür (Darwish ve diğ., 2009; URL-1).

2009 yılında yapılan bir çalışmada 100 mg\kg dozda ARM'nin beynin birçok bölgesinde, nöronlarda işaretli Fos bölgelerinin sayısının arttığı görülürken, 30 mg\kg dozda ise ARM minimal aktivite göstermiştir. 100 mg\kg doz ARM Fos-işaretli nöronların yoğunluğunu Striatum da anterior singulat korteks, Tuberomammiller çekirdek (TMN), pedunculopontinus tegmenti (PPTg), Laterodorsal tegmenti (LDTg) , dorsal raphe çekirdeği (DR) ve locus coeruleus (LC)'de arttırdığı, fakat nükleus akümbens çekirdek ve kabukta herhangi bir değişiklik görülmediği belirtilirken, 30 mg\kg doz ARM sadece Fos-işaretli ayna nöronlarının yoğunluğunu arttırdığı gözlenmiştir (Fiocchi ve diğ.,2009). Literatürde modafinille yapılmış bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmakla birlikte bahsi geçen çalışmayla çelişen sonuçlarda mevcuttur (Willie ve diğ., 2005; Scammel ve diğ., 2000; Engber ve diğ., 1998; Lin ve diğ.,1996).

2014'te ARM'nin mekanizmasına yönelik yapılan bir başka çalışmada, ARM'nin hayvanlarda uyanıklığı ventrolateral preoptik lezyonlar (VLPO) yoluyla tetiklediği rapor edilmiştir (Vetrivelan ve diğ., 2014). Uyanıklık süresince beyin kökü

monaminerjik uyarı sistemleri (dopaminerjik ve noradrenerjik) tarafından uyku-aktif VLPO nöronları inhibe edilmektedir (Saper ve diğ., 2010). Bu çizgi dahilinde Vetrivelan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ARM'nin uyanıklığı tetikleyici mekanizmasında VLPO'nun olası rolüne hipotezlerinde destekleyici olarak;

1) rasemik karışım olan Modafinilin VLPO noradrenerjik inhibisyonu (Gallopin ve diğ., 2004),

2) dopaminin α2 adrenoreseptörün aktive etmesiyle VLPO inhibisyonu (Cornil ve diğ., 2012),

3) c-fos işaretli VLPO ların modafinil tedavisiyle azalması (Scammel ve diğ., 2000) destek olarak gösterilmiş ve ARM'nin sıçanlarda uyanıklığı tetikleyici etkisi VLPO lezyonlarıyla test edilmiştir (Vetrivelan ve diğ., 2014).

Sonuç olarak; ARM'nin etki mekanizması ve farmakokinetiği ile ilgili literatürde farklı bulgulara sahip birçok çalışma mevcuttur (Vetrivelan ve diğ., 2014; Loland ve diğ., 2012; Mignot ve diğ., 1994; URL-1). Fakat ARM'nin etki mekanizması hala açıklanamamıştır (Qu ve diğ., 2008; URL-1; Ferraro ve diğ., 2002). Moleküler etki mekanizması tam olarak bilinmeyen bu ilacın uyku bozukluğu tedavisindeki rollerini açıklamaya yönelik bilgiler elde etmek ve söz konusu bozukluğun tedavisinde kullanılabilecek en uygun ilacın karakterizasyonunun belirlenmesi için ilacın zar lipitleri ile etkileşmesinin araştırılması çok önemlidir.

İlaç-zar etkileşmeleri polar, arayüzey, hidrofobik domain ya da sipesifik domain (raftlar gibi) ve zar yanal yüzeyiyle gerçekleşmektedir. İlaç-lipit etkileşmeleri zarın akışkanlığı, geçirgenliğini ve difüzyon kabiliyetini gibi zarın özelliklerini değiştirebilmektedir (Berquand ve diğ., 2005; Seydel ve diğ., 1994).

1.3. İlaç-Lipit Etkileşmeleri

İlaçların hücre içinde etkilerini gösterebilmeleri hücre zarı ile etkileşimleri ile başlar ve bu etkileşim sırasında zarda yapısal ve dinamik açıdan birçok değişim meydana gelir (Karp, 2009). Bu değişimler zar lipit kalınlığı, faz geçiş eğrisi, faz geçiş sıcaklıkları (ön geçiş ve ana geçiş) ile lipit dinamiği, açil zincir esnekliği (düzen), lipit kafa grubu ve sulu kısma yakın gliserol iskelet üzerindeki hidrojen bağlanmasının şiddeti gibi parametreleri kapsar. Bu nedenle ilaç-lipit etkileşmelerinde ilacın bu parametreler üzerindeki etkisi incelenerek zarda meydana

gelebilecek konsantrasyon, yapı, kompozisyon, ve dinamik gibi fonksiyona bağlı değişimler saptanabilmektedir (Türker ve diğ., 2011; Korkmaz ve Severcan, 2005; Severcan ve diğ., 2005; Boyar ve Severcan, 1997; Severcan ve Cannistaro, 1990).

Zar lipitlerinin özeliklerinin ve bu özelliklerde meydana gelebilecek değişimlerin belirlenmesi, zar fonksiyonları hakkında bilgi edinebilmek adına büyük önem taşımaktadır.

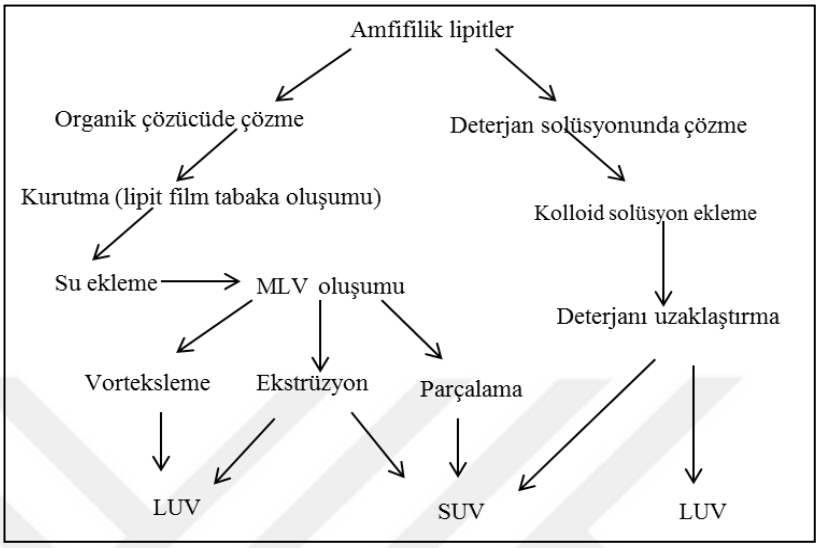
Makromoleküllerin zarların yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler, ayrıntılı ve güvenilir bir biçimde spektroskopik yöntemler kullanılarak saptanabilmektedir (Hemminga, 1992). Bu etkileşimlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan iki teknik Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ve Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC)'dir. (Türker ve diğ.,2011; Hemminga, 1992; Goni ve diğ., 1988)

1.4. Çok Tabakalı Model Zarlar (MLV, Lipozomlar)

Hücre zarı çok kompleks ve karmaşık yapıda olduğundan molküller arası etkileşimleri yorumlamak oldukça zordur, bu nedenle gerçek hücre zarı yapısına oldukça benzeyen model zarlar bu tür etkileşimlerin araştırıldığı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle ilaç-lipit etkileşmelerinin incelenmesinde çok tabakalı model zarlar (lipozomlar) kullanılmaktadır. Lipozomlar, katman sayılarına ve büyüklüklerine göre sınıflandırılırlar. Hazırlama yöntemlerine bağlı olarak çok katmanlı veziküller (MLV) ve tek katmanlı (küçük tek tabakalı veziküller=SUV, büyük tek tabakalı vezikülller=LUV) lipozomlar oluşturulabilmektedir (Wang, 2005).

Lipozomlar fosfolipit moleküllerinin tampon çözeltiler içerisinde biraraya gelip küresel bir şekil oluşturarak meydana getirdikleri yapay zarlardır. Model zar oluşumunda kullanılan fosfolipitler nötr ya da yüklü (+ / -) olabilmektedirler. Model zar oluşumlarında kullanılan lipitlerin tür ve özelliklerine bağlı olarak iki katmanlı bir lipit tabakası formunda olup hücre zarı ile benzer özellikler göstermektedir. Bu nedenle zar çalışmalarında kullanımları çok yaygındır. Model zarlar sayesinde ilaçların zar lipitleri ile etkileşimleri detaylı bir biçimde incelenebilmekte, böylece lipitlerde ilaçlardan kaynaklı olarak meydana gelebilen yapısal ve fonksiyonel

değişimler hakkında bilgi edinilebilmektedir (Türker ve diğ., 2011; Toyran ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005; Toyran ve diğ., 2004; Severcan ve diğ., 2000a; Severcan ve diğ., 2000b; Karp, 1999; Melin ve diğ., 1999; Boyar ve diğ., 1997).



Şekil 1.2. Lipozom hazırlama yöntemleri (Lasch ve diğ., 2003)

Şekil 1.3'de görülen yapılar temel olarak hidrofobik etkileşimler sebebiyle oluşur, ancak elektrostatik etkileşimler van der Waals çekici kuvvetleri, ve hidrojen bağlarının oluşumu da bu yapıların kararlılığına etkilidir (Alberts de diğ., 2002; Israelachvili ve Wennerström, 1996; Stryer, 1995; Boggs, 1987; Tanford, 1980).



Şekil 1.3 Çok tabakalı lipozomun yapısı

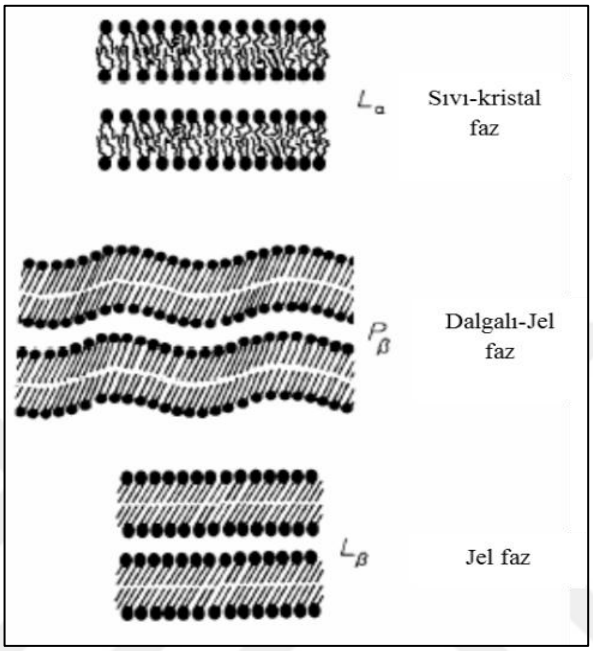
Lipozomlar düşük sıcaklıklarda jel fazdadır. Bu fazda lipitler güçlü Van der Waals bağları ile sıkıca paketlenmiş gibidirler. Faz geçiş sırasında lipitler kooperatif olarak erirler (Chapman, 1975). Sıvı-kristal fazda lipitlerdeki bu kooperatif durum, açil zincirler arasındaki Van der Waals bağlarının zayıflaması sebebiyle azalır. Söz

konusu durum Van der Waals bağlarının zar yapısını belirleyen bir unsur olmasından kaynaklanır. Açil zincir uzunluğu ve fosfolipit kafa grubu çeşidi doğal Tm sıcaklığının değişimine majör etkide bulunur (Chapman, 1975; Szoka ve Papahadjopoulos, 1980). Kısa zincirler düşük sıcaklıklarda erirken, uzun zincirler yüksek sıcaklıklarda erirler (Phillips ve ark., 1970). DSC tekniği zarların faz değişim sıcaklığı (Tm) ve zar yapısını belirlemede önemli rol oynamaktadır. Birçok lipozom, kafa gruplarındaki hareketliliği araştırmak için kullanılmaktadır (Yeagle, 2011). Literatürde Tm lipit tabakalarındaki asil zincirlerin kooperatif erimesi olarak tanımlanır. DSC zar incelemelerinde alınan termogramlarda Ön geçiş sıcaklığı ve Faz geçişleri belirgin bir şekilde saptanabilir. Ön geçiş sıcaklığı, sentetik fosfolipidlerin DSC'sinde, geçişin sınırlı kooperatifliği sebebiyle, ana erime tepesine göre daha düşük bir sıcaklıkta ana erime geçişinin genişlemesine neden olan, küçük bir zirve şeklinde gözlemlenen eğridir.(Ohline ve diğ., 2001; Koyama ve diğ., 1999; Chapman, 1975). Normal vücut sıcaklığı olan 37 ^{o}C ‘de zarın iki tabakalı yapısı sıvı kristal faz şeklinde isimlendirilir. Bu fazda fosfolipit moleküllerinin zincirleri birbirine paralel şekilde konumlanır fakat her bir molekül kendi ekseni etrafında ve zar katmanları arasında hareket edebilir. Sıcaklık düştüğü zaman lipitler normal sıvı kristal fazdan jel faza geçerler ve bu fazda fosfolipit hareketliliği çok kısıtlıdır. Lipitlerin bu şekilde jel fazdan sıvı kristal faza geçmeleri onların ana faz geçişi(Tm) olarak değerlendirilir (Karp., 1999). Tm ana geçiş sıcaklığının orta noktası, ana faz geçiş entalpisi ise trans-gouche izomerlerinin ve molekül içi ve moleküller arası Van der Walls bağlarının bozulması ile oluşan, faz geçişi sırasındaki enerji olarak tanımlanmaktadır (Koyama ve diğ., 1999). Kooperativite faz geçişine katılan lipit moleküllerinin yaklaşık miktarı ile ilgili olup lipit düzeni ile ilgili bilgi veren bir parametredir. Yüksek kooperativitenin anlamı faz geçişine daha fazla lipitin katılması demektir (Ceckler ve Cunningham., 1997).

1.4.1. Lipit çift tabakalarının termotropik fazları

Fosfolipitlerin lipit çift tabakalarındaki moleküler organizasyonu kristal jel, jel, dalgalı (rippled) jel ve sıvı kristal faz olmak üzere dört farklı durumda bulunmaktadırlar. Bunlardan üçü jel faz olup dördüncü faz ise sıvı kristal fazdır. Faz geçişleri jel fazdan sıvı kristal faza doğru sıcaklık yükselmesiyle gerçekleşir. Fosfolipit tabakalarının düzenli organizasyonu sıcaklık artışıyla birlikte düzenli

durumdan düzensiz duruma geçişiyle tabakaların yanal genişliği, kalınlığı ve yoğunluğu da azalıp değişmektedir. Bu geçiş aralığında jel ve sıvı kristal olmak üzere iki ana alan olup bu aralık dahilinde zar jel ya da sıvı fazda bulunmaktadır (Yeagle, 2011; Seydel ve diğ., 1994; Jain ve diğ., 1975).



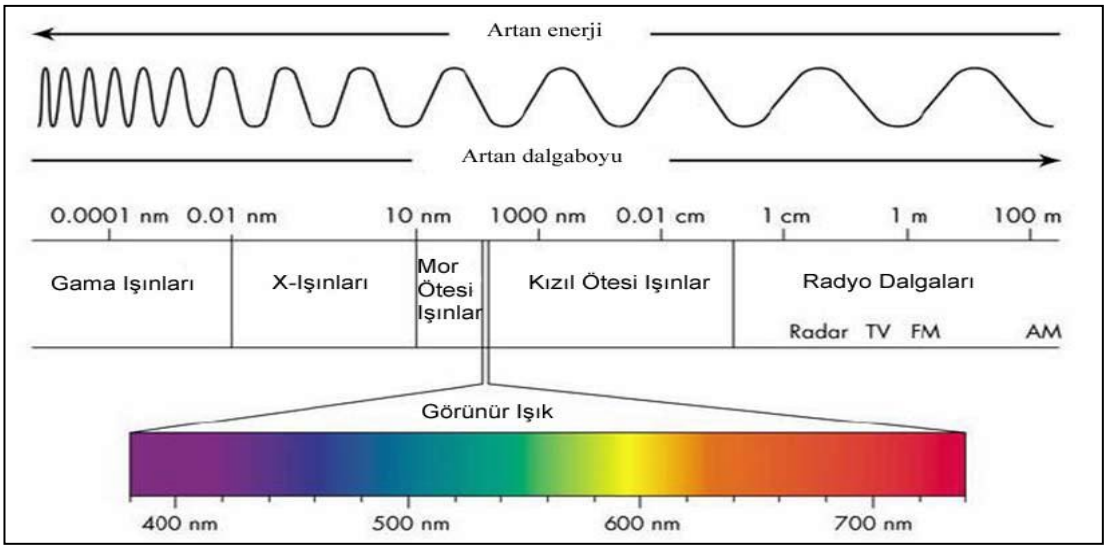
Şekil 1.4. Çift tabakalı lipitlerin fazlarının şematik gösterimi

1.5. Spektroskopi

1.5.1. Çalışmada kullanılan spektroskopik yöntemler

1.5.1.1. Kızılötesi spektroskopisinin esasları

Spektroskopi, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşimi olarak tanımlanmaktadır. Spektroskopik teknikler örneği elektromanyetik radyasyonun çeşitli formlarından oluşan ışına maruz bırakmayı kapsamaktadır. Saçılım, soğrulma, emisyon gibi parametrelerin ölçülmesi ve bu ölçülen parametrelerin yorumlanması önemli bilgiler elde etmeyi sağlamaktadır. Şekil 1.5'de elektromanyetik spektrum bölgeleri gösterilmektedir.



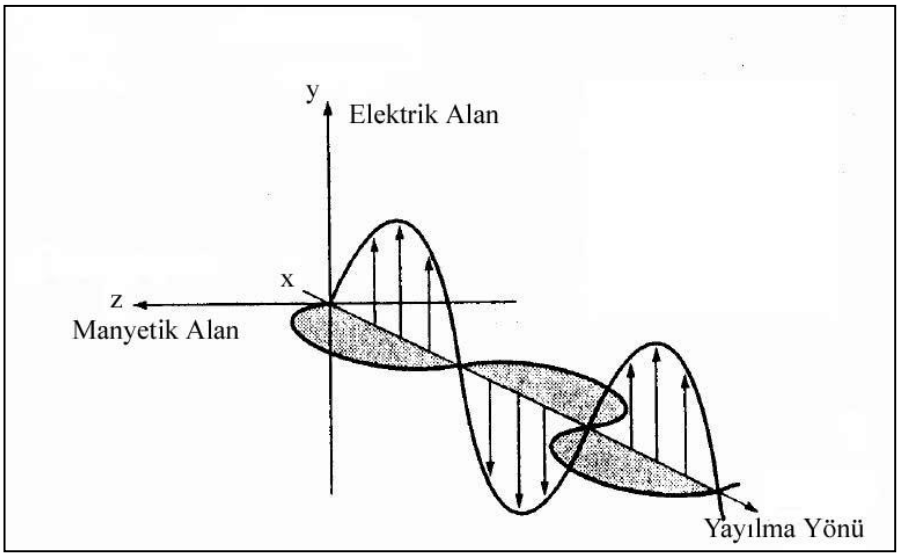
Şekil 1.5. Elektromanyetik spektrum bölgeleri

Toplam enerji denklemi aşağıdaki formülde verilmiştir (Campbell ve Dwek., 1984).

$E_{toplam}=E_{translasyon}+E_{rotasyon}+E_{vibrasyon}+E_{elektronik}+E_{elektronikspinrotasyon}+E_{nükleerspin\ oryantasyon}$

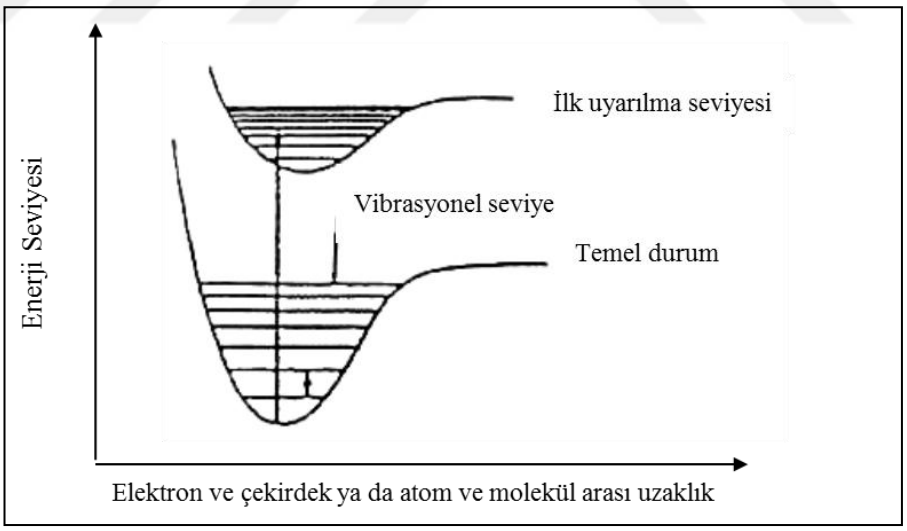
İlgili enerji seviyesi arasındaki ayrılma çok küçük olduğu zaman $E_{translasyon}$, $E_{elektronikspinrotasyon}$ ve $E_{nükleerspin\ oryantasyon}$ katkısı ihmal edilebilir. $E_{rotasyon}$,$E_{vibrasyon}$ ve $E_{elektronik}$ ile ilgili olan komşu bölgelerdeki enerji seviyesindeki ayrılma sırasıyla mikrodalga, kızılötesi, elektromanyetik spektrumun morötesi görünür bölge ile ilişkilidir (Campbell ve Dwek., 1984).

Elektromanyetik dalga elektrik alan ve manyetik alan olmak üzere birbirine dik iki bileşenden meydana gelir. Şekil 1.6'da x ekseni manyetik alanı, y ekseni elektrik alanı göstermektedir (Stuart, 1997).



Şekil 1.6. Bir elektromanyetik dalganın bileşenlerinin gösterimi

Elektromanyetik ışınım ve madde arasındaki etkileşim ile atom ve moleküller arasındaki ışınımı yönlendirmesiyle, enerji molekülü uyararak yüksek enerji seviyesine çıkarır. Uyarılma şekli ışığın dalga boyuna bağlıdır (Freifelder ve diğ., 1982). Şekil 1.7 enerji seviye diyagramını göstermektedir.



Şekil 1.7. Enerji Seviye Diyagramı (Freifelder, 1982)

Örnekteki moleküllerin farklı enerji seviyelerine geçişine bağlı olarak enerji soğrulduğunda frekansa bağlı emilim ortaya çıkar. Molekül ile gelen radyasyon arasında kuvvetli bir etkileşim oluştuğunda bir üst enerji seviyesine geçiş gerçekleşir. Söz konusu geçişin ifadesi aşağıdaki gibidir.

$$\Delta E = h\nu \quad (1.1)$$

-ΔE: ilgili enerji seviyesindeki ayrılma,
-ν: uygulanan radyasyon frekansı,
-h: Planck sabiti (h = 6.6×10^{-34} joule/saniye) olarak adlandırılır.

$$c = \lambda \nu \quad (1.2)$$

-c: vakumda ışık hızı (3.0×10^{8} ms^{-1}),
-λ: ışığın dalga boyudur.

Dalga sayısı ise aşağıdaki gibi hesaplanır;

$$\nu = \text{dalga sayısı} = (1/\lambda) \text{ [birimi: } cm^{-1}] \quad (1.3)$$

Böylelikle aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$E = h\bar{\nu} = hc \quad (1.4)$$

Bu eşitliklerden, dalga sayısı ve frekansın direkt olarak enerji ile doğru orantılı olduğu açıktır.

1.5.1.2. Kızılötesi titreşim spektroskopisi

Kızılötesi, elektromanyetik spektrumda 0,78 ve 1000 μm arasındaki alanı kapsamaktadır. Kızılötesi (IR) bölgesi üç ana bölgeye bölünmüştür (Smith., 1999).

Tablo 1.1. Kızılötesi Spektrum Bölgeleri

Bölüm	Dalgasayısı Aralığı (cm^{-1})
Yakın	1400-4000
Orta	4000-400
Uzak	400-4

Bir molekülün IR ışınını absorbe edebilmesi için, molekülün titreşmesi veya dönme hareketi sonucunda, molekülün dipol momentinde net bir değişme meydana gelmelidir. Söz konusu şartlar sağlandığında, ışının değişen elektrik alanı ile molekül

etkileşebilir ve moleküldeki hareketlerin birinin genliğinde bir değişmeye neden olabilir. Işının frekansı molekülün doğal titreşim frekansına uyarsa, moleküler titreşimin genliğinde bir değişme meydana getiren net bir enerji alış verişi gerçekleşir. Söz konusu durum ışının absorbe edildiği anlamına gelmektedir. Bir molekülde atomlar titreşir, kütle merkezleri etrafında döner. Eğer titreşim enerjisi az ise, hareket Basit Harmonik Harekete yaklaştırılabilir. Bu vibrasyonel ve rotasyonel olgu maddeyi oluşturan bileşikleri ve yapılarını tayin etmede kullanılmaktadır.

Vibrasyonel frekans (V_{vib}) denklemi;

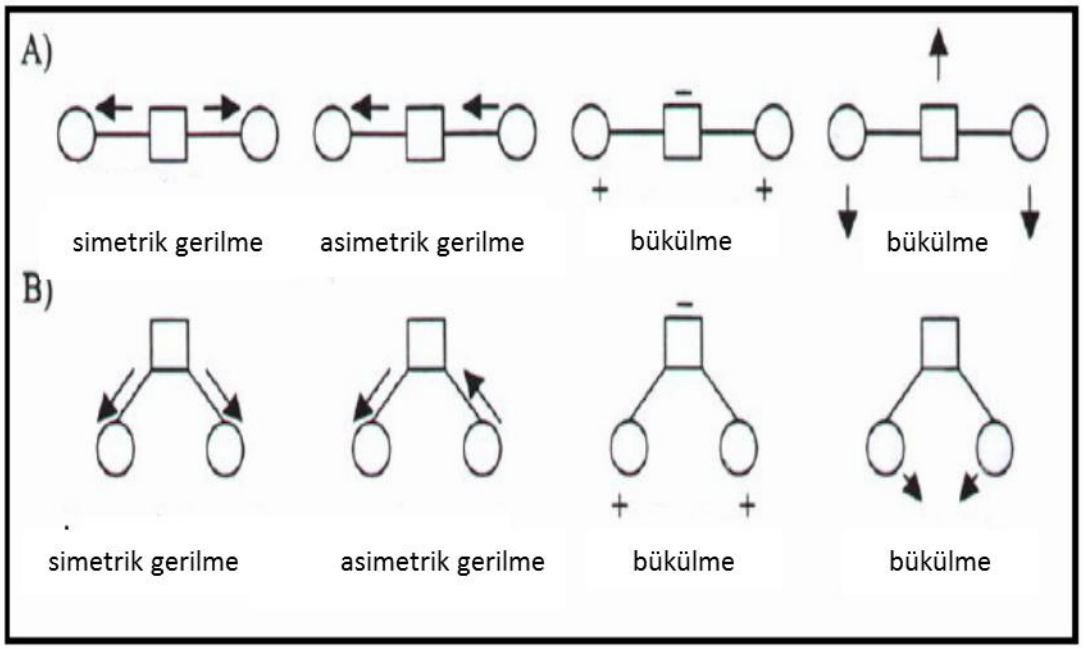
$$[\, V_{vib"} = 1/2\, \sqrt{(k\,/\mu)}] \qquad (1.5)$$

şeklinde olacaktır.

Burada, k, kuvvet sabiti, μ, indirgenmiş kütle olmak üzere, indirgenmiş kütle de aşağıdaki Denklem (2.6)'daki gibi tarif edilir.

$$\mu = mA\ mB\ /\ (mA+mB) \qquad (1.6)$$

Öteleme hareketleri, bir eksen etrafında dönme hareketleri ve bir kimyasal bağın uzunluğunun periyodik olarak azalıp çoğalması veya moleküldeki açıların periyodik olarak değişmesi gibi titreşim hareketleri, molekülü oluşturan atomların sürekli bir hareket içinde olmalarından kaynaklı olarak ortaya çıkar. Ortaya çıkan bu titreşimler, gerilme ve eğilme hareketlerini oluşturur. Gerilme titreşiminde iki atomlu bağ ekseni boyunca atomlar arasındaki uzaklık sürekli değişirken, eğilme titreşimleri iki bağ arasındaki açının değişmesi ile meydana gelir. Bu iki ana tip titreşim türleri simetrik ve asimetrik olmak üzere ikiye ayrılır (Volland, 1999). Başlıca titreşim türleri Şekil 1.8'de şematik olarak gösterilmektedir.



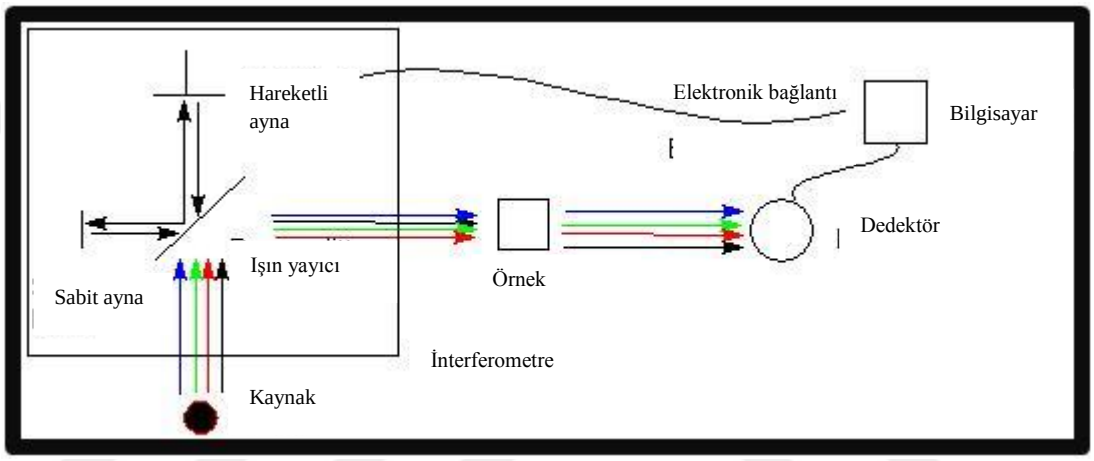
Şekil 1.8. Triatomik moleküllerde lineer ve lineer olmayan titreşim türleri. A) Lineer olmayan 3 atomlu molekülleri, B) (+) ve (-) işareti düzlem dışı bükülmeyi göstermektedir (Arrando ve diğ., 1993)

1.5.2. Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), moleküllerin değişik dalga boylarındaki titreşimlerini ölçen ve değişik titreşim gruplarını görüntüleyip onların karakterize edilmesini sağlayan önemli bir tekniktir (Türker-Kaya ve Huck, 2017; Türker-Kaya ve diğ., 2016; Türker ve diğ., 2016; Türker ve diğ., 2014a; Türker ve diğ., 2014b; Türker ve diğ., 2011; Toyran ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005; Toyran ve diğ., 2004; Severcan ve diğ., 2000a; Severcan ve diğ., 2000b; Melin ve diğ., 1999; Boyar ve diğ., 1997)

FT-IR oluşturan aksamlar; ilgili bölüme ışık üreten bir kaynak, monokromotör, örnekten saçılan dalga boylarını toplayan bir oluk, çift ışın (yarısı örneğe, yarısı referansa olmak üzere, ışın dağıtıcı ışını böler) işlemidir. Numune kimyasal özelliklerine bağlı olarak ışığı emer ve bir detektör örneğin içerisinden geçen radyasyonu toplar, çift ışın işlemi, referanstan geçen enerjiyle karşılaştırır, normal olarak analog kaydediciye gönderilen detektör elektriksel sinyal üretir, monokromotör ve kaydedici arasında bağlantı kurulur. Kaydedicinin nasıl kalibre edildiğine bağlı olarak kaydedilen enerjinin frekans fonksiyonu ya da dalga boyu olarak kaydedilmesini sağlar. Pozisyonu kesin olarak bilinen tarayan, hareketli bir

ayna kızılötesi bant konumunu kesin olarak belirlenmesini sağlar. Bu pozisyonu tam olarak belirleyebilmek için, ışın kaynağına helyum-neon lazer ışığı dahil edilir. Bu lazer ışığı ile başarılı taramaları eleyip sıralayarak hareketli aynanın pozisyonunu belirleyen standart bir parmak izi üretir (Skoog ve diğ., 2007; George and Mclyntyre, 1987). Hassasiyet (detektör hassasiyeti, jackquinot avantajı), hızlılık (aynı anda tüm frekansların ölçümü, fellget avantajı), mekanik basitlik ve iç kalibrasyona (helyum-neon lazer ışığı, Connes avantajı), sahip olma FT-IR cihazının belli başlı avantajlarındandır (Skoog ve diğ., 2007).



Şekil 1.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi şematik gösterimi

Kızılötesi ışığın bir organik bileşikten geçmesiyle birlikte, ışığın bazı frekansları organik bileşik tarafından absorbe edilirken, bazıları absorbe edilmeden organik bileşikten geçer. Söz konusu durum, frekansa ya da dalga sayısına karşı bir grafik şeklinde yansıtılırsa bir infrared (titreşim) spektrumu elde edilir. Bir bileşiğin titreşim spektrumu kendine özgüdür. Birçok fonksiyonel gruplara ait titreşim frekansları, daha önce hazırlanan tablolardan veya atlaslardan faydalanılarak tayin edilmeye çalışılır.

Biyolojik sistemlere zarar vermeden moleküler düzeyde çalışmalar yapılabilmesine olanak sağlaması nedeniyle literatürde ilaç-lipit etkileşiminin FT-IR spektroskopisi ile araştırıldığı bir çok çalışma mevcuttur (Ergun ve diğ., 2014; Türker ve diğ., 2011; Sahin ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2007; Garip ve diğ., 2007; Cakmak ve diğ., 2006; Korkmaz ve Severcan, 2005; Severcan ve diğ., 2005; Melin ve diğ., 2001;

Turan ve diğ., 2000; Severcan ve diğ., 2000a; Severcan ve diğ., 2000b; Boyar ve Severcan., 1997).

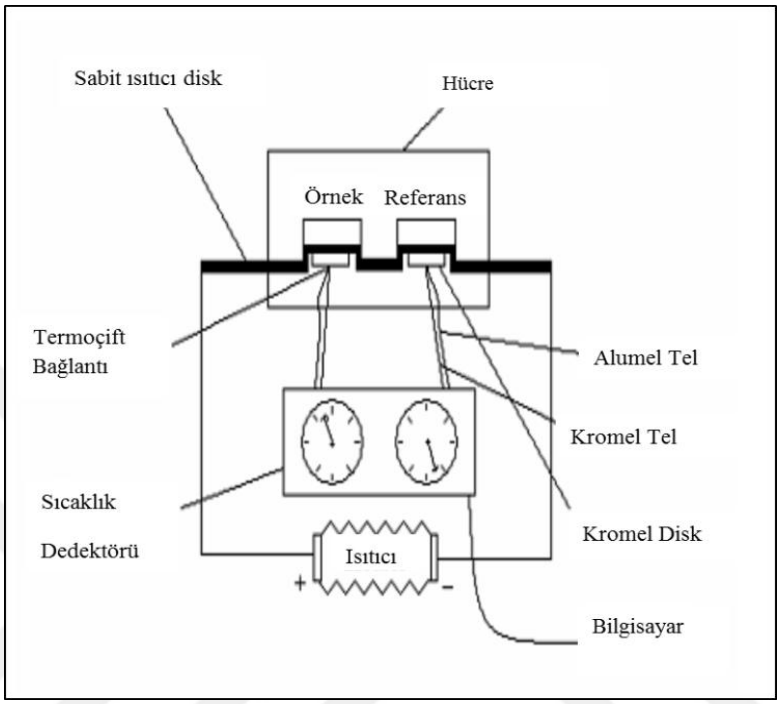
Özellikle model zar örneğinden elde edilen bir FT-IR spektrumundaki bantların frekans ve bant genişliği analizleri ile incelenen ajanın zar yapısı, faz geçişi, düzeni ve akışkanlığı üzerinde yaptığı etkiler saptanabilmektedir (Ergun ve diğ., 2014;Turker ve diğ., 2011; Deniz ve diğ., 2010; Sade ve diğ., 2010; Sahin ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2007; Hynes ve diğ., 2005; Severcan ve diğ., 2005a; Korkmaz ve Severcan, 2005; Severcan ve diğ., 2005a; Korkmaz ve Severcan, 2005; Toyran ve Severcan, 2003; Kazancı ve diğ., 2001; Severcan ve diğ., 2000; Severcan, 1997). Bu bağlamda ARM ile model zar etkileşiminin araştırılmasında FT-IR tekniği önemli bir yere sahiptir.

1.5.3. Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC)

Diferensiyal tarama kalorimetresi (DSC) biyomoleküllerin, biyolojik yapıların termal ve buna bağlı termodinamik özellikleri hakkında hassas bilgiler veren bir tekniktir (Turker ve diğ., 2011; Sahin ve Diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005; Korkmaz ve Severcan 2005; Castelli ve diğ., 2001; Inoue ve diğ., 2001; Kazancı ve diğ., 2001). Yüksek duyarlılığa sahip DSC, farklı sıcaklıklarda, maddede oluşan fiziksel ve kimyasal olaylar esnasında ısı değişiminin zaman ve sıcaklığa karşı ölçülmesi prensibine dayalıdır. Güç telafisi prensibiyle çalışan DSC'lerde, numune sıcaklığı ile referans sıcaklığı aynı tutulur. Eğer numune ile referans arasında bir sıcaklık farkı saptanırsa, sıcaklığı aynı tutmak için numuneye verilen enerji miktarı değiştirilir. Bu şekilde numunedeki faz değişimi esnasındaki ısı transferi miktarı saptanabilmektedir (Yeagle, 2011; Skoog ve diğ., 2007; Castelli ve diğ., 2003; Bradrick ve diğ., 1989).

DSC bileşim hidrasyon etkisi, pH ve çözücü faz-geçiş sıcaklıkları üzerinde, model zar ve ilaçlar (Türker ve diğ., 2011; Severcan ve diğ., 2005; Korkmaz ve Severcan, 2005); protein denatürasyonu ve polimerlerin camlaşmasında spesifik ısı ölçümleri gibi kompleks yöntemlerin termal karakteri tayininde kullanılmaktadır (Ceckler ve Cunningham, 1997). Lipit çift tabakalarındaki termal değişikliklerin ölçülmesinde ve model zar sistemler ile ilave edilen maddelerin moleküler etkileşimlerinin çalışılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, özellikle ilaç zar

etkileşmesinin araştırılmasında ilaçların zar Tm üzerine etkilerini araştırmada önemli bir yere sahiptir (Severcan ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005; Korkmaz ve Severcan, 2005).



Şekil 1.10. Differansiyel Taramalı Spektroskopisinin (DSC) şematik gösterimi

Tm, kooperativite, faz geçiş entalpisi (ΔH, kkal/mol) DSC ile zar çalışmalarında analiz edilir (Türker ve diğ., 2011; Mavromoustakos ve diğ., 1997; Jain ., 1988). Ayrıca kooperativiti, Denklem (1.7) ve entalpi değerleri Denklem (1.8) gibi olur.

Kooperativiti Birimi= $\Delta H^{o}_{vH} / \Delta H^{o}$ kal (1.7)

-ΔH^{o} kal: ana geçiş sıcaklıgının altındaki alanı,

-ΔH^{o}_{vH} : van`t Hoff entalpi değerini ifade etmektedir.

$$-\Delta H^{o}_{vH} = Tm^{2} / [(T_2-T_1) / 2] \quad (1.8)$$

-Tm: faz geçiş ortak noktası (^{o}K),

-T_1: başlangıç sıcaklığı (^{o}K),

-T_2: bitiş sıcaklığı (^{o}K)

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Kimyasal Maddeler

(-)-2-[(R)-(difenilmetil)sülfinil] asetamid (armodafinil, ARM), dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), fosfat tampon tablet, triklorometan (kloroform). Tüm kimyasallar Sigma firmasından temin edildi. Örnekler hazırlanmadan önce kimyasallar ekstra saflaştırma işlemine tabi tutulmadı.

2.2. Çok Tabakalı Model Zar (Lipozomlar, MLVs) Örneklerinin Hazırlanması

İlk olarak fosfat tampon çözeltisi hazırlandı. 200 ml distile suda 1 fosfat tampon tuz tableti çözüldü. (Bir fosfat tampon tuz tableti 200 ml suda çözündüğünde 0,01 M fosfat tamponu, 0,0027 M potasyum klorit ve 0,137 M sodyum klorit içerir, 25°C'de pH=7,4'tür). Çok tabakalı model zarlar literatüre göre hazırlandı (Türker ve diğ., 2011; Severcan ve diğ., 2005). İlk aşamada %0, % 1, %5, % 10, %20 mol yüzdeleri için gerekli olan ARM miktarları hesaplandı. 2 mg DPPC ve 1 mg Armodafinil 1000 µl kloroformda çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden gerekli ARM ve DPPC miktarları alınarak ependorf kaplarına konularak, 2 dakika süresince vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. Örnek kaplarında ince lipit tabakaları oluşturmak için karışımlardaki organik çözücüler önce azot gazı ile sonra dondurarak kurutma sisteminde (Labconco, Freeze Dry System) 24 saat boyunca vakumlanarak uzaklaştırıldı. İnce lipit tabakası içeren kaplara 50 µl tampon çözelti (fosfat tampon çözeltisi, ph=7.4) ilave edildi. Elde edilen karışım, 20-30 dakika süre ile 2 dakika lipit Tm'nin 20°C üzerinde (60°C) 2 dakika, vorteks karıştırıcıda 2 dakika olmak üzere döngüsel olarak tamamlanarak süt renginde çok katlı lipozomlar elde edildi.

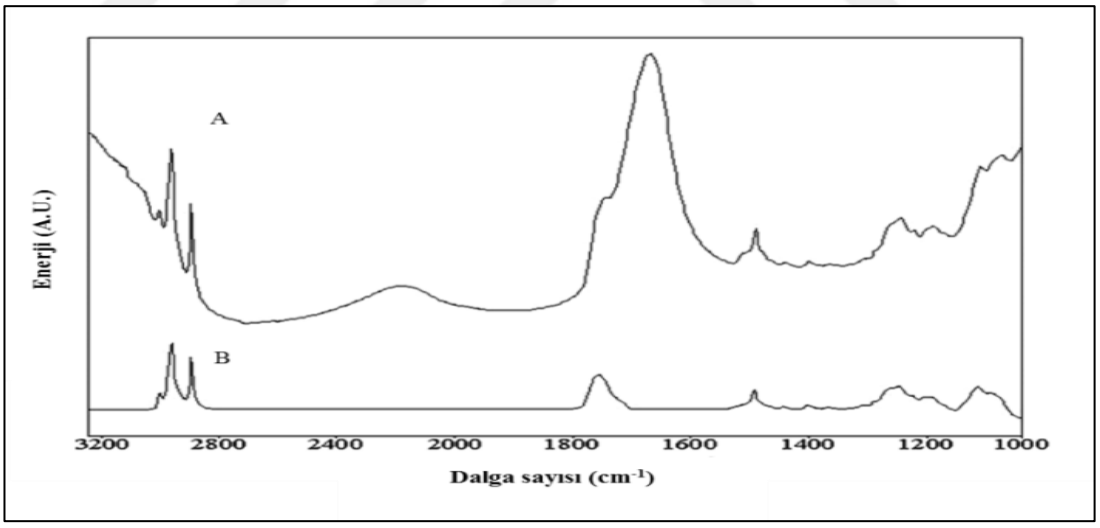
2.3. FT-IR Spektroskopsi Çalışmaları

2.3.1. Spektrum eldesi

Örneklerin incelenmesinde dötoryumlu triglisin sülfat (DTGS) detektörlü Perkin Elmer FT-IR Spektrum One FT-IR spektroskopisi kullanıldı (Perkin Elmer, Norwalk,

CT, USA). Uygulanan teknikte örnekler devamlı olarak kuru hava ile arındırıldı. Aletin içinden geçen havadaki su buharı ve karbondioksit örnek spektrumlarını etkilediğinden her tarama yapılmadan önce havanın spektrumu elde edildi (Şekil 2.1).

Örnek spektrumlarından havanın spektrumu Perkin Elmer Spectrum One programı ile otomatik olarak çıkartıldı. Hazırlanan lipozom örneklerinden 10 µl alındı ve 12 µm'lik teflon hücre kalınlıklı suda çözünmez CaF_2 (Kalsiyum Florid) camlar arasına yerleştirildi. Örnekler 28°C ile 61°C arasında 3°C aralıklar ile her sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilerek spektrumları elde edildi. Her örneğin 4000 cm^{-1} -1000 cm^{-1} frekans aralığında, 2 cm^{-1} çözme gücü ile 10 tarama sayısı ile literatüre uygun olarak IR spektrumu elde edildi (Türker ve diğ., 2011). İncelenen örnek sistemi sulu sistem olduğu için su moleküllerine ait infrared bantları, özelikle 3050-2800 cm^{-1} ve 1700-1500 cm^{-1} bölgesindeki bantları kapatması nedeniyle tampon çözelti spektrumu her örnek spektrumundan dijital çıkartma yöntemi olan Spektrum One programı kullanılarak çıkartıldı.



Şekil 2.1. Tampon çözelti spektrumu çıkartılmamış, MLV spektrumu (A) ve tampon çözelti spektrumu çıkartılmış MLV spektrumu (B)

Elde edilen spektrumlardaki bantların frekans değerleri, band genişlikleri açısından detaylı olarak analiz edildi. Band pozisyonları ağırlık merkezi üzerinden değerlendirilerek pik yüksekliğinin %80'i alınarak hesaplandı. ARM ile DPPC model zarların etkileşimi incelenirken CH_3 gerilme bandının frekansının (~2956 cm^{-1}), CH_2 asimetrik (~2918 cm^{-1}), C=O gerilme bandı (~1740 cm^{-1}) ve PO^-_2

asimetrik gerilme bandının (~1240 cm^{-1}) frekans değerleri ölçülen tüm sıcaklıklarda (28°C -61°C) değişimi incelendi. Tüm deneyler 2 kez tekrar edildi.

2.4. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması ve Termogramların Eldesi

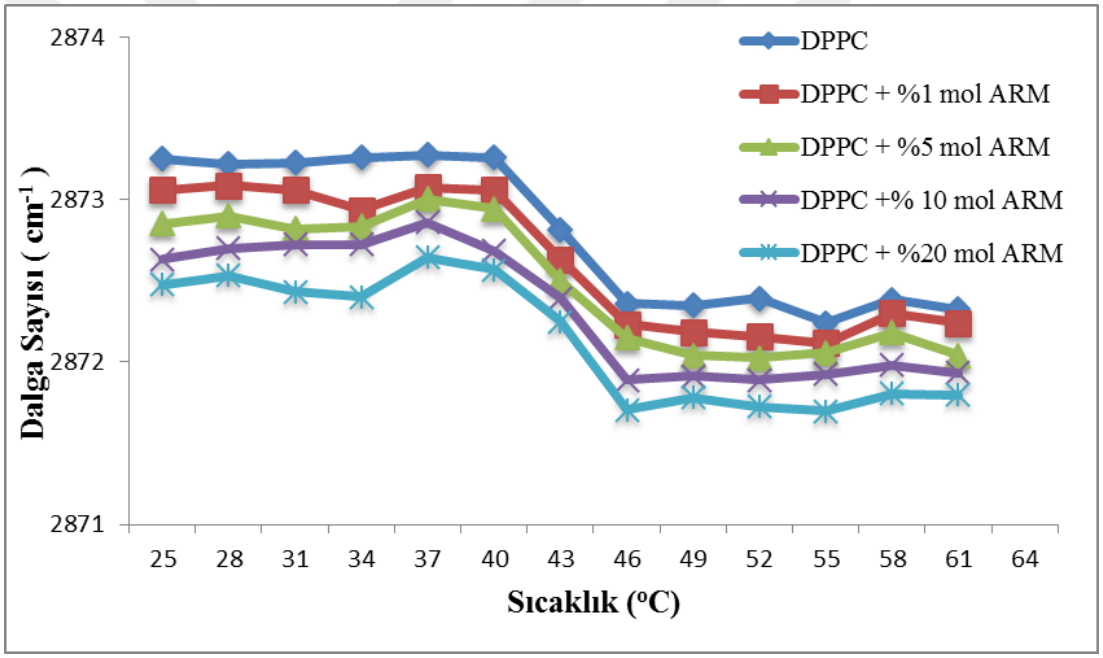
DSC çalışmaları için FT-IR örnek hazırlama yöntemi ile aynı yöntem kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda (%1, %5, %10, %20) ARM içeren ve içermeyen DPPC MLVs hazırlandı. FT-IR örnek hazırlama yönteminden farklı olarak örnekleri hidrate etmek için 50 microlitre fosfat tampon çözeltisi eklendi. DSC çekimleri 50 µl'lik miktarlarda özel alüminyum panlar kullanılarak gerçekleştirildi. Çekimler 20–70 ^{o}C aralığında 1^{o}C/dak sıcaklık artış oranıyla termogramlar elde edildi.

3. BULGULAR

3.1. FT-IR Spektroskopisi Çalışmaları

DPPC ve DPPC'nin değişen konsantrasyonlarda ARM içeren örneklerinde genel olarak jel fazdan sıvı kristal faza geçişin yaklaşık 40 ^{o}C'de gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu sonuç literatürle uyum içindedir (Turker ve diğ., 2011).

3.1.1. CH_3 simetrik gerilme bandı (~2873 cm^{-1})

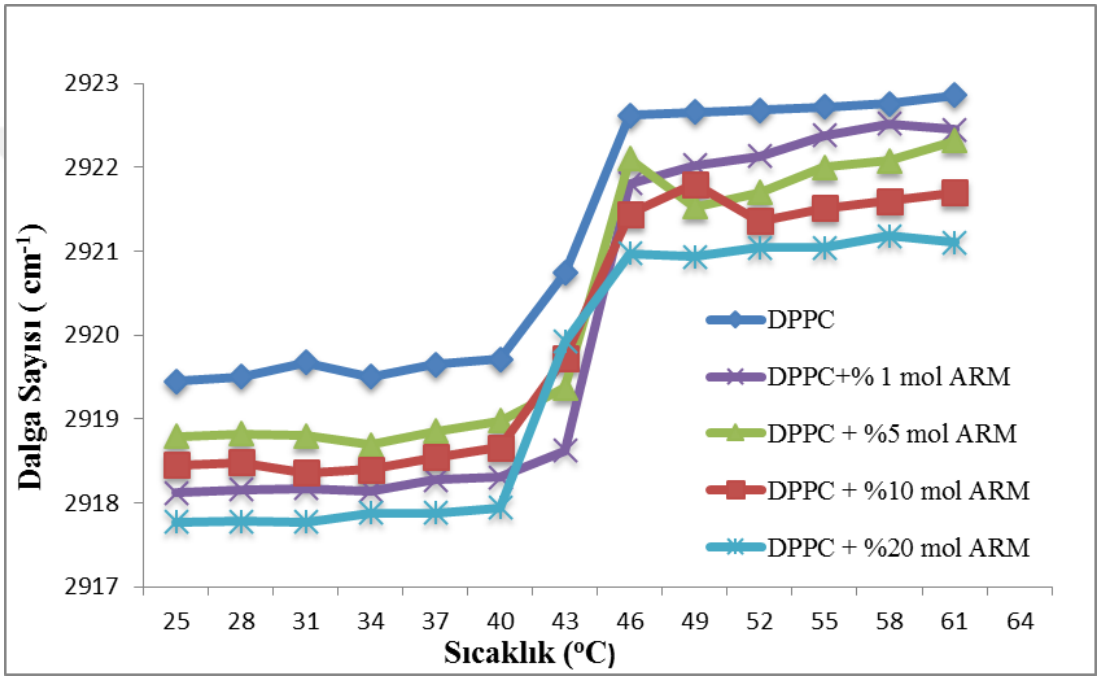


Şekil 3.1. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin CH_3 simetrik band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi

Şekil 3.1 değişen ARM konsantrasyonları içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerinin CH_3 gerilme bandı frekansının sıcaklığa bağlı değişimini göstermektedir. ARM'nin DPPC MLV'lerine eklenmesi ile hem jel hem de, sıvı kristal fazda artan ARM konsantrasyonlarına bağlı olarak frekans değerlerinde kademeli azalma gözlemlendi.

3.1.2. CH_2 asimetrik gerilme bandı (~2918 cm^{-1})

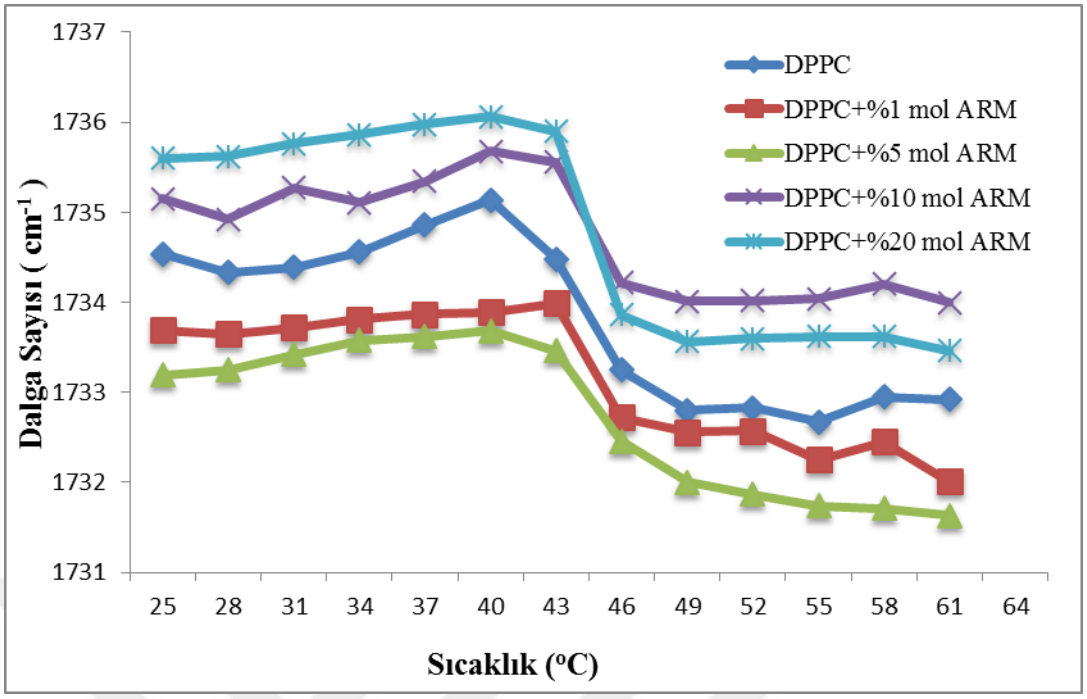
Şekil 3.2 ARM'siz ve ARM'nin değişen konsantrasyonlarda elde edilen CH_2 asimetrik band frekanslarını göstermektedir. Farklı konsantrasyonlardaki ARM'nin jel fazda, frekans değerlerinde artan ARM konsantrasyonu ile birlikte, azalma gözlemlenmiş olup, Tm'nin üstündeki değerlerde yani sıvı kristal fazda ARM'nin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak frekans değerlerinde kademeli bir azalma tespit edildi.



Şekil 3.2. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin CH_2 asimetrik band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi

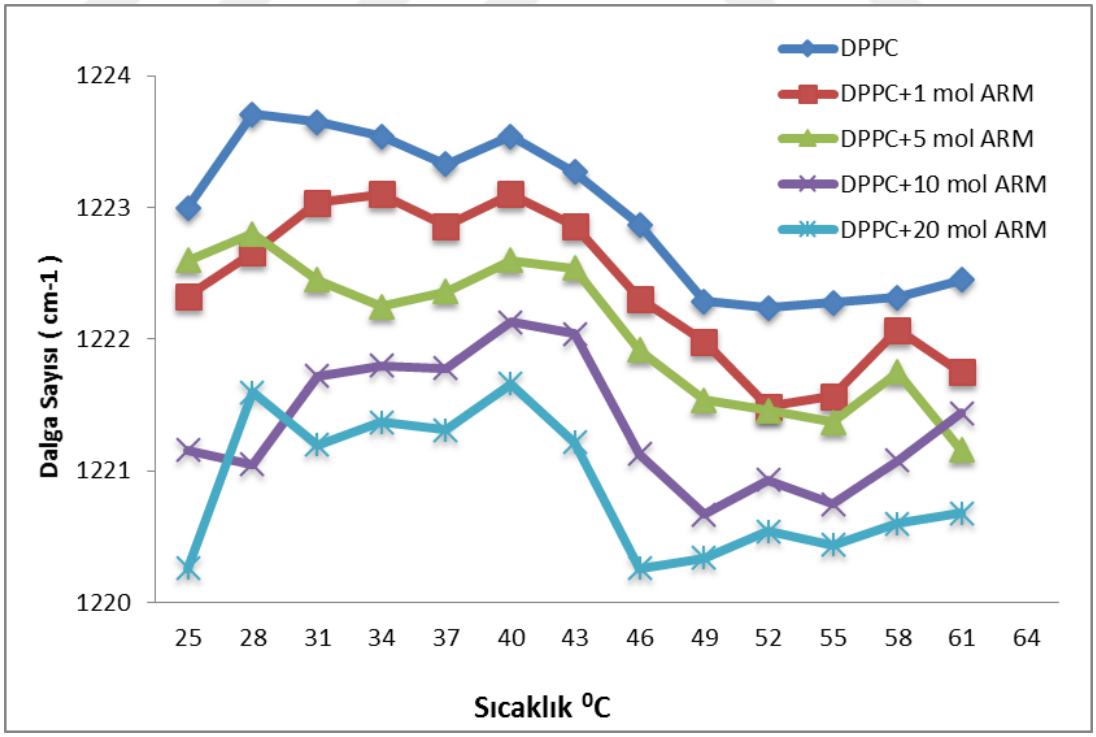
3.1.3. C=O gerilme bandı (~1740 cm^{-1})

C=O gerilme frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde (Şekil 3.3); düşük konsantrasyon (% 1 ve % 5) ARM içeren DPPC MLV'lerde jel ve sıvı-kristal faz frekanslarında azalma, yüksek konsantrasyon (% 10, % 20) ARM içeren DPPC MLV'de hem jel fazda frekans değerlerinde ise kademeli artış görülürken, sıvı-kristal fazda C=O gerilme bandı frekans değerlerinde konsantrasyona bağlı olmayan artış görüldü.



Şekil 3.3. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin C=O band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi

3.1.4. PO_2^- asimetrik gerilme bandı (~1240^{-1})

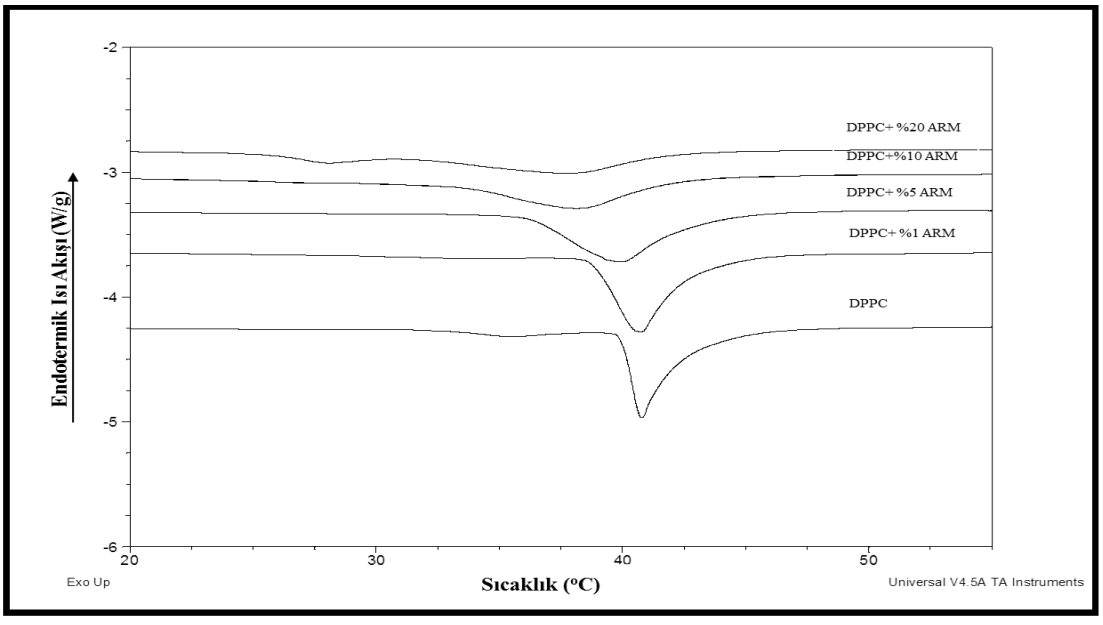


Şekil 3.4. Değişen konsantrasyonlarda ARM içeren ve içermeyen DPPC MLV'lerin PO_2^- band frekanslarının sıcaklığa bağlı değişimi

Şekil 3.4 de PO_2^- gerilme bandı frekansında hem jel hem de sıvı kristal fazda, ARM'nin artan konsantrasyonlarına bağlı bir şekilde, frekanslarda kademeli olarak azalma görüldü.

3.2. DSC Çalışmaları

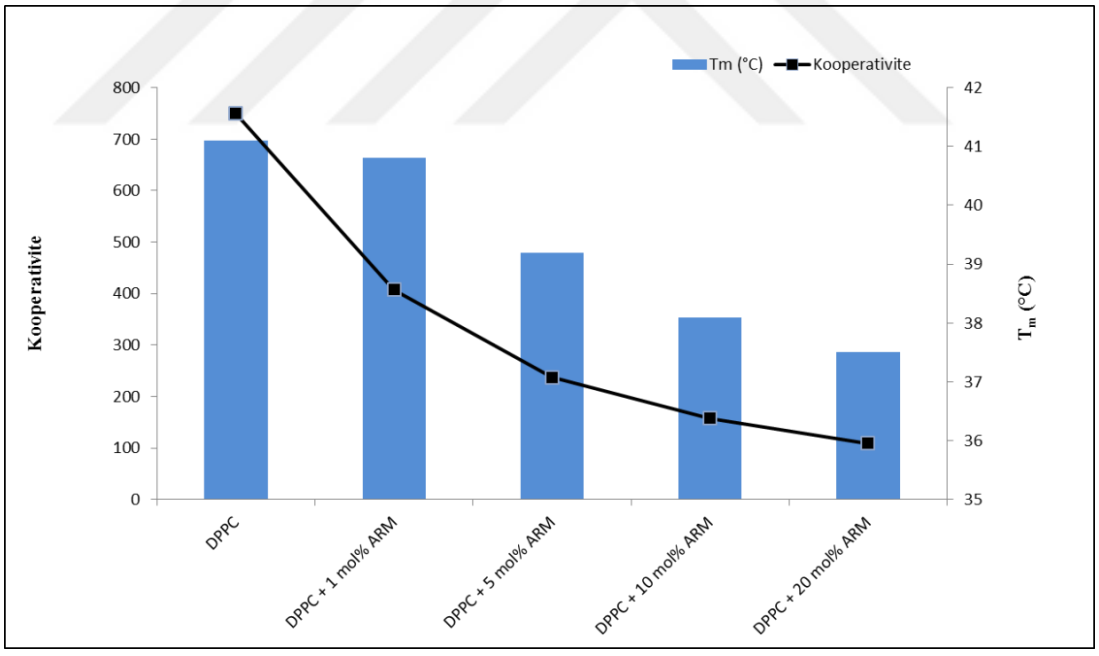
Şekil 3.5 DPPC ve DPPC'nin % 1, %5, %10 ve %20 mol ARM içeren konsantrasyonları için sıcaklığa bağlı ısı akışını göstermektedir. Şekilden görüldüğü üzere saf DPPC'de faz değişim sıcaklığı yaklaşık 40 ^oC olarak tespit edilmiş olup FT-IR CH_2 asimetrik bandından da elde edildiği şekilde bu değer literatürle uyuşmaktadır (Türker ve diğ., 2011; Casal ve Mantsch, 1984; Cameron and Charlette,1981; Umemura ve diğ., 1980). Artan ARM konsantrasyonuna bağlı olarak, ARM'nin, DPPC MLV'lerinin Tm değerlerini daha düşük sıcaklıklara kademeli olarak gerilettiği görülmüştür. ARM'nin, DPPC MLV'lerinin Tm değerlerini etkileyip daha düşük sıcaklıklara kaymasına neden olduğu tesit edildi. Bu değişiklik özellikle ARM'nin %10 ve %20'lik konsantrasyonlarında daha dramatiktir. Ayrıca artan ARM konsantrasyonu ile birlikte ana faz geçiş pikinin genişleme eğilimi tespit edildi (Şekil 3.5). Tablo 3.1 Şekil 3.5 ve 3.6 da, DPPC MLV'lerine ARM eklenmesi ile birlikte Tm, kooperativite (CU) ve , $\Delta H^o_{V_H}$ değerlerinin kademeli olarak azaldığı görüldü.



Şekil 3. 5. DPPC ve DPPC'nin % 1, %5, %10 ve %20 mol ARM içeren konsantrasyonları termogramları

Tablo 3.1.Ana faz geçiş sıcaklığı (Tm), yarı yükseklikteki tam genişlik (ΔT1/2), ana faz geçiş entalpisi, $\Delta H^{o}v_H$(Vant Hoff Entalpi), Kooperativite (CU)

Örnek	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$(°C)	ΔH (J/g)	ΔH^{o}_{vH}	Kooperativite
DPPC	41,1	1,60	9,72	7284,72	749,38
DPPC + 1 mol% ARM	40,8	2,50	11,27	4594,40	407,54
DPPC + 5 mol% ARM	39,2	3,70	12,09	2865,63	237,11
DPPC + 10 mol% ARM	38,1	5,10	12,44	1963,94	157,82
DPPC + 20 mol% ARM	37,5	6,20	14,33	1565,02	109,21



Şekil 3.6. DPPC ve DPPC'nin % 1, %5, %10 ve %20 mol ARM içeren konsantrasyonları için sıcaklığa kooperativite değeri

4. TARTIŞMA

Biyolojik zarlar hücrelerin ana bileşeni olmakla beraber, hücre bütünlüğü ve işleyişinde de hayati rol oynamaktadırlar (Jane B. Reece, 2008). Hücrelerin yapısı, fonksiyonu ve kararlılığı, hücre zarını oluşturan lipitlerin yapı ve faz geçiş davranışlarına bağlıdır (Turker ve diğ., 2011; Castelli ve diğ., 2003; Saija ve diğ., 1995). Bu nedenle, ilaçların hücredeki aktivitelerini gerçekleştirebilmeleri, hücre içi hedeflerine ulaşabilmeleri için lipit tabakaları ile etkileşimleri kaçınılmazdır. Söz konusu etkileşimler, ilaçların hücre içine alınımlarını sağlamak üzere bu tabakalar üzerinden ya da tabakalardaki porlardan pasif taşıma yoluyla meydana gelmektedir (Seydel ve diğ., 1991). Bu bağlamda, ilaçların taşınmasında ve aktivitelerini gerçekleştirmelerinde lipitlerle ne gibi etkileşime girdiklerinin araştırılması onların hem etkinliklerini hem de moleküler mekanizmalarını açıklamak adına önem taşımaktadır. İlaçların lipitler üzerinde yarattığı etkiyi anlamak açısından içeriği kontrol edilebilen model zarlarla çalışmak yaygın bir yaklaşımdır (Türker ve diğ., 2011; Şahin ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005; Toyran ve diğ., 2003; Severcan ve diğ., 1990). Bu çalışmada, uyanıklığı tetikleyici özelliği bilinen fakat bu konudaki moleküler etki mekanizması açıklanamamış ilaç ARM'nin, DPPC MLV'leri üzerindeki etkileri, FT-IR ve DSC yöntemleri kullanılarak araştırıldı. Bu sayede, ARM'nin biyolojik membran sistemlerinde yaygın olarak bulunan PC lipitleri ile ne tarz etkileşmelere girdiği ve zar sistemleri üzerinde yaratacağı olası etkiler ile ilgili bilgiler elde edinildi.

Model zar sistemlerinde FT-IR araştırmalarında incelenen lipitlerin C-H bandında meydana gelen değişimler, lipit düzen ve faz davranışı hakkında bilgiler vermektedir. (Türker ve diğ., 2011; Toyran ve Severcan 2003; Severcan 1997). CH_3 simetrik bandı, zar sisteminin derin kısımları, yani lipitlerin açil zincirlerinin en uç kısımları ile ilgilidir (Sahin ve diğ., 2013, Sahin ve diğ., 2007, Severcan ve diğ., 2000a). Elde edilen sonuçlara göre hem jel hem sıvı kristal fazlarda ARM'nin artan konsantrasyonlarıyla birlikte CH_3 simetrik bandının frekansındaki azalma ARM'nin

lipit zincirlerinin hidrofobik kısımlarına yerleştiğinin bir göstergesi olduğu söylenebilir (Sahin ve diğ., 2013; Sahin ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2000a).

CH_2 asimetrik bandının frekans değişimi ise, lipitlerin Tm davranışı ve yapısal düzenliliği hakkında bilgi verir (Severcan ve diğ., 2000a ; Mansch, 1984). Bu bandın frekans değerleri fosfolipitlerin açil zincirlerinin konformasyonel düzenine bağlı olarak değişir. Frekansta gözlemlenen yüksek değerlere doğru kayma, gauche konformasyonlarının sayısındaki artmayı yani düzensizliği, frekansta meydana gelen azalma ise gauche konformasyonları sayısındaki azalmayı ve trans konformasyonlarındaki artmayı yani düzeni göstermektedir (Ergün ve diğ., 2014; Turker ve diğ., 2011; Toyran ve Severcan., 2003; Severcan., 1997). CH_2 asimetrik bandının frekans analizinden elde edilen verilere göre, lipitlerin gözlemlenen sıvı kristal ve jel fazlarında, ARM'nin artan konsantrasyonlarıyla birlikte frekansın azalması, DPPC MLV sisteminde gauche konformasyonlarının sayısının azalmasına ve sistemin açil zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin artmasına neden olduğu söylenebilir (Yeagle, 2004).

C=O ve PO_2^- asimetrik gerilme bantlarının dalga sayılarındaki değişimler bu grupların etrafındaki hidrojen bağlanmaları hakkında bilgiler vermektedir (Türker ve diğ., 2011; Sahin ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005; Korkmaz ve Severcan, 2005; Kan Zhi ve diğ., 1996). C=O bandı zar sisteminin sulu kısma yakın lipitlerinin gliserol omurgasından kaynaklanmaktadır. Fosfolipitlerin kafa gruplarına yakın bölgedeki gliserol iskeleti için C=O gerilim bandındaki bulgular değerlendirilmektedir. C=O gerilim bandının frekansının düşmesi, yeni ve kuvvetli hidrojen bağlanmalarının gerçekleştiğine, frekansın artması bölgedeki hidrojen bağı ayrılmalarına işaret etmektedir (Türker ve diğ., 2011; Levin ve diğ., 1982; Frengeli ve Günthard, 1976). Şekil 3.3. de C=O gerilme bandında DPPC'nin % 1 ve % 5 ARM içeren konsantrasyonları frekanslarında azalmanın tespiti ile yeni kuvvetli hidrojen bağlanmalarının oluştuğu söylenebilir. Oluşan bu hidrojen bağları ARM ile DPPC'nin C=O grupları arasında ya da çevredeki su molekülleri ile C=O grupları arasında gerçekleşmiş olabilir (Turker ve Diğ., 2011). Diğer taraftan DPPC'nin % 10 ve % 20 ARM içeren konsantrasyonlarında C=O band frekansındaki artış hidrojen bağı ayrılmalarına işaret etmektedir. ARM'nin ortamda yüksek konsantrasyonda olması DPPC gliserol iskeletinde oluşan hidrojen bağlanmaları üzerinde farklı

etkilere sebep olduğu söylenebilir (Yeagle, 2004). ARM'nin C=O grupları üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi ilacın konsantrasyona bağlı olarak lipit paketlenmesini değiştirdiği anlamına gelebilir (Türker ve diğ., 2011).

Lipitlerde baş grubunun en karakteristik titreşim bantları fosfattan (PO_2^-) kaynaklanmaktadır. Bu bantlar lipitlerin kafa gruplarının hidrasyon durumu ile kuvvetli bir ilişki içindedir. Söz konusu bantların dalga sayıları değerlerindeki değişimler, fosfat grupları ile suyun veya biyolojik makro moleküllerin hidrojen atomları arasındaki hidrojen bağlanmalarının varlığını belirlemesini sağlamaktadır (Ergün ve diğ., 2014; Türker ve diğ., 2011; Toyran ve Severcan, 2003; Kan-Zhi ve diğ., 1996; Kazal ve Mantsch, 1984). Şekil 3.4.'de görüldüğü üzere, DPPC ve değişen ARM konsantrasyonları için elde edilen FT-IR spektrumlarında, ARM'nin konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, PO_2^- asimetrik gerilme bandının frekansının azalması, lipitlerin kafa gruplarında meydana gelen hidrojen bağlanmalarına işaret eder.

Lipitlerin kafa grupları ve sulu kısma yakın gliserol iskeletleri hakkında bilgi edindiğimiz C=O bandından, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4.), ARM'nin konsantrasyon artışı ile söz konusu bandın frekans değişimleri arasında lineer bir ilişki olmadığı görüldü. Bu farklı bulgu lipitlerin suyu seven kısımlarının (kafa grupları ve gliserol iskeleti) ortamda bulunan sudan etkilenerek, döngüsel bir şekilde ARM-lipit veya su-lipit bağlanmalarının bir göstergesi olduğu söylenebilir. Lipitlerin sulu kısımlara yakın bölgeleri ile etkileşmek üzere ARM ve su molekülleri arasında bir rekabetin oluştuğu söylenebilir. Bu tarzda bir etkileşim DPPC MLV'lerin etrafında ARM'nin bir kalkan gibi kalmasına ve hücre zarı için koruyucu bir etki yaratmasına neden olabilir. Van Vilieta ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bu yorumu destekler niteliktedir. Parkinson tetikleyici ajan olarak bilinen 1-metil-4-fenil-1,2,3,6,tetrahidropridin ile hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarında, Modafinilin (% 50 R-Modafinil+%50 S-Modafinil), kullanıldığı nöronlar üzerinde koruyucu (nöroprotektif) bir etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Van Vilietta ve diğ.,). Yine benzer şekilde, literatürde belirtildiği üzere ARM susuzluk ve ishale neden olmaktadır (URL-1). Bu etki ARM'nin zar lipitleri üzerinde yukarıda belirtildiği gibi su ile rekabetinden kaynaklandığı, özellikle belli

konsantrasyonların üzerinde suyu ortamdan uzaklaştırarak görülen etkilere neden olduğu söylenebilir.

DSC verilerine dayanarak (Şekil 3.5.) saf DPPC'de 35 ^{o}C'de ön geçiş ve 40 ^{o}C'de T_m tespit edildi. Elde edilen bu sıcaklıklar literatürdeki DPPC ön geçiş ve T_m değerleri ile uyuşmaktadır (Turker ve diğ., 2011). Sonuçlar FT-IR çalışmamızda incelediğimiz CH_2 asimetrik bandının frekans analizinden elde edildiği gibi birbirleri ile uyum içerisindedir (Umemura ve diğ., 1980; Cameron ve Charlette, 1981; Casal ve Mantsch ,1984). Artan ARM konsantrasyonuna bağlı olarak, DPPC MLV'lerinin Tm değerlerinin daha düşük sıcaklıklara kademeli olarak gerilemesi gözlenirken ön geçiş faz değişim eğrisi DSC ısı akış grafiğinde tespit edilemedi (Şekil 3.5). Lipitlerdeki ön faz geçişinin bir diğer adı da ripple fazıdır. ARM etkisi ile ön faz geçiş eğrisinin görülmemesi ön geçiş fazının perturbasyonu anlamına gelmektedir. Bu durumun ısı kapasitesine yansımaması ön faz geçiş eğrisindeki aşırı genişlemeye neden olduğu şeklinde yorum yapılabilir. Bu açıklamaya ek olarak, lipitlerin ön geçişleri zar sistemi yüzeyindeki periyodik dalgalanmalarla bağlantılıdır. Bu dalgalanma DPPC lipitlerinin baş gruplarının oluşturduğu periyodik hareketlerden kaynaklıdır. Ortamda lipitlerin baş kısımları ile etkileşecek bir kimyasal olduğunda DSC termogramlarında ön faz geçiş eğrisi görülmeyebilir. Başka bir deyişle, ARM etkisi ile ön geçişin kaybolması onun DPPC veziküllerinin yüzeyindeki herhangi bir etkileşimden kaynaklanmaktadır. ARM'nin lipit veziküllerinin yüzeyine toplandığı anlamına gelebilir (Liu ve diğ., 1999; Moore ve diğ., 1995; Goldstain 1984). Bu durum FT-IR çalışmalrından elde edilen C=O ve PO^{-}_2 frekans analizlerinden elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir. Benzer bir durum bazı anestetikler ve epileptik ajanlar için de rapor edilmiştir (Türker ve diğ., 2011; Baber ve diğ., 1995) DSC verilerine göre, ARM, DPPC MLV'lerinin Tm'sini daha düşük sıcaklıklara çekmiştir. Özellikle bu değişiklik ARM'nin %10 ve %20'lik konsantrasyonlarında dramatik olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca ARM'nin artan konsantrasyonuyla birlikte faz geçiş eğrisini genişletme davranışı ARM'nin DPPC MLV'lerinin entalpi değerlerini azaltmasıyla da korele bir şekildedir. Standart olarak lipitlerin ana faz davranışlarını kontrol eden moleküler etkileşimler, lipit-lipit temasları ve yabancı bir molekülün etkileşmesi ile belirgindir. Bu nedenle, Tm'deki herhangi bir değişiklik yabancı molekülün lipitlere bağlanması olarak yorumlanmaktadır (Ergün ve diğ.,

2014; Türker ve diğ., 2011). Çalışmamızda elde ettiğimiz ARM varlığı ile Tm eğrisindeki genişleme, faz geçişini yapan lipit moleküllerinin sayısının azaldığını göstermekle birlikte kooperativite değerinin azalmasıdır (Tablo 3.1). Dolayısıyla faz geçişine daha az lipit katılmasına yol açtığı söylenebilir(Ceckler ve Cunningham, 1997; Goldstain, 1984). Bu sonuca eşlik eden Tm ve entalpi değerlerinin düşük değerlere kayması da DPPC'nin normal Tm fazının ARM ile bozulduğunu göstermektedir. Bu, lipit çift tabakasının dış hidrofobik kooperatif bölgesindeki yani açil zincirlerinin C1-C8 atomlarının bölgesindeki ARM'nin lokasyonu söz konusu olabilir. ARM'nin bu bölgedeki lokalizasyonu, açil zincirler arasındaki van der Waals etkileşimlerini bozarak iki katmanlı paketlemenin kaybolmasına neden olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, T_m'deki azalma polar baş grubu ve gliserol iskeleti ile ARM'nin etkileşmesi ve su ile rekabetinden kaynaklı olarak bu gruplar arasında standart etkileşimlerin bozulması ile iki katmandaki bitişik lipid moleküllerinin etkileşim kuvvetini azalttığı anlamına gelebilir (Kazancı ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005; Liu ve diğ., 1999; Moore ve diğ., 1995; Sevcercan ve diğ., 1990).

Zar yapısında bilateral düzen içerisinde lipitler ve zar proteinleri karşılıklı olarak birbirlerinin konformasyonlarını etkilemektedirler. Bu sebeple integral proteinler lipitlerin kuyruk yani hidrofobik kısımlarında meydana gelen değişikliklerden etkilenirken, periferal proteinler ise lipitlerin kafa gruplarında meydana gelen değişikliklerden etkilenir (Bogs., 1987; Brasseur ve diğ.,1997; Turker ve diğ., 2014). Söz konusu etkileşimlerin model ve gerçek sistemlerde aynı şekilde cereyan etmektedir (Yeagle., 1978; Sanderman., 1978; Razin ve diğ., 1982). ARM'nin gerçek sistemlerde meydana getirebileceği değişikliklere yorum getirmek gerekirse, onun DPPC MLV'lerinin hidrofibik kısmında meydana getirdiği değişiklikler, bu lipitlerin etrafında bulunan integral proteinleri etkileyecek, bu proteinlerin yapısında değişiklik meydana getirebilecektir. Bu değişiklik söz konusu proteinin, sinyal ileten bir protein olması durumunda, sinyal iletimini üzerinde pozitif ya da negatif bir etki oluşabileceği söylenebilir. Literatürde bulunan bir çok çalışmada ARM'nin etkisini hücre bağlantı noktalarında elektriksel bağlantıyı arttırması üzerinde durulmuş olması söz konusu yorumu destekler niteliktedir (Beck ve diğ., 2008; Murillo Rodrigez ve diğ., 2007; Urbano ve diğ., 2007; De Saint Hilaire ve diğ., 2001). Bunun yanı sıra lipitlerin sulu kısımlarında ARM-lipit etkileşiminden kaynaklı

değişikler, ARM'nin lipitlerin sulu kısımları ile girdiği etkileşim buradaki periferal proteinlerin yapısında değişikliklere sebep olabilir. Örneğin, tam olarak aksiyon mekanizması açıklanamasa da Dopamin geri alım inhibitörü olarak tanımlanan ARM'nin, hücre bağlantı noktalarında, lipitlerle girdiği etkileşim sonucu dolaylı olarak periferal proteinlerde meydana getirdiği yapısal değişiklik sonucu çalışmasını engellediği ve dopamin geri alımını durdurduğu söylenebilir.

ARM'nin proteinlere bağlanarak aksiyon gösteren ilaçların tersine vücuda çok iyi bir şekilde dağıldığı ve dokularda yüksek afinite göstermediği rapor edilmiştir (Darwish ve diğ., 2009; URL-1). Literatürde ARM'nin çeşitli hastalıklar üzerinde yapılmış olan birçok çalışma ve sonuçların ARM'nin birçok hastalık tedavisinde etkin olması onun mekanizmasını direkt olarak proteinler üzerinden gerçekleştirmektense, lipitlerle girdiği etkileşim sonucu birçok mekanizma ile aksiyonunu gerçekleştirdiği yorumunu getirmek mantıksız değildir.

Lipofilik özelliğe sahip olan ilaçlar beyin-kan bariyerinden hızlı ve etkili olarak taşınıp, merkezi bir periferik etkili profile sahip olurlar (Stahl 2008). ARM'nin lipitlerle etkileşmesi ona, metamfetaminlerde olduğu gibi kanda hızlı bir taşınma ve etki kazandırdığı söylenebilir. ARM'nin lipitlerde hem kafa grubuyla ve hem de kuyruk kısımları ile etkileşime girmesi yani lipofilik olması, kan hücrelerinden, lipit tabakalarından ve zardan kolayca geçmesine neden olacaktır (Seydel ve diğ., 1994). ARM'nin hücrede farklı bölümlere çok etkin bir şekilde yerleşmesi, aksiyon mekanizmasını gerçekleştirmesi açısından büyük önem taşımaktadır. ARM'nin DPPC ile güçlü etkileşmesi, onun gerçek zar sistemlerinde uzun süre kalmasına dolayısıyla zarı bir reserv gibi kullanmasına yol açabilir. ARM'nin uzun salınım etkisine sahip olması (URL-1) onun bu özelliğinden kaynaklanıyor olabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

ARM'nin lipitler üzerinde çalışma mekanizmasının anlaşılması hastalığın tedavisinde ve uygun ilaç dozunu belirlemede çok önemlidir. Bu amaçlar ARM ile moleküler seviyede yapılmış az çalışma vardır. Çalışmamızda ARM'nin DPPC ile etkileşimi FT-IR ve DSC teknikleri kullanılarak ilk defa araştırıldı. Literatürde benzer bir çalışma bulunmamaktadır. ARM'nin DPPC üzerinde, lipit faz geçiş eğrisi, faz geçiş entalpisi, zar lipit düzeni (lipit açil zincir esnekliği), lipit kafa grubu ve sulu kısma yakın gliserol iskeletinde hidrojen bağlanmasının şiddeti üzerinde ne gibi değişiklikler meydana getirdiği tespit edildi.

DPPC MLV'lerin FT-IR spektrumlarında %0, %1, %5, %10 ve %20 mol ARM konsantrasyonları için dört farklı absorbsiyon bandı analiz edildi. Bu bantlardan ikisi, lipitlerin konformasyonel değişimlerine çok duyarlı güçlü bantları olan CH_2 asimetrik ve CH_3 simetrik bantlarıdır. İncelenen diğer absorbsiyon bantları, gliserol iskeletindeki ester grubu titreşimlerini yansıtan simetrik C=O ile baş grubu temsil eden bölgedeki PO_2^- asimetrik bantlarıdır.

Çalışmamızda, ARM'nin DPPC'de, açil zincir bağları ve gliserol iskeletinde değişen konsantrasyona göre hidrojen bağlanmaları olduğu tespit edildi. ARM molekülleri DPPC MLV'lerdeki lipitlerle etkileşime girmiş, kendisine lipit tabakalarının içerisinde boşluklar oluşturarak yer edinmiştir.

ARM'nin çıkış noktası uyanıklığı tetikleyici etkisiyle, uyku bozukluklarını tedavi etmek olsa da, günümüzde hiperaktivite, dikkat eksikliği, (Lindsay ve diğ., 2006), obezite (Madras ve diğ., 2006; Mignot ve Diğ., 1994), yorgunluk kaynaklı konsantrasyon bozukluğu (Pigeau ve diğ., 1995) gibi bir çok farklı hastalığın tedavisinde kullanılır olmuştur. hafıza (Beracochea ve diğ., 2003), öğrenme (Beracochea ve diğ., 2008), şizofreni (Wittkampf ve diğ., 2012), epilepsi (Özsoy ve diğ., 2014) üzerinde gözlemlenen olumlu etkisi, henüz aksiyon mekanizması tam olarak açıklanamayan bu ilacın araştırılmasını daha da cazip hale getirmektedir.

Hücre zarı, organizma açısından iyon iletkenliği sinyal iletkenliği, hücre dışı yapıların bağlanma yüzeyi olması açısından hayati bir önem taşımaktadır (Budin ve Devaraj, 2011). ARM'nin yukarıda sıralanan beyin üzerinde gözlemlenen olumlu etkileri, onun beyin hücre zarı üzerinde lipitler ile kuvvetli etkileşmesi ve mekanizmasını gerçekleştirmesinde söz konusu etkileşimin önemli bir yere sahip olduğu söylenebilir.

İlerleyen çalışmalarda, beyinde elektriksel iletilerde rol alan sifingolipitler ile hücre zarı içerisinde bulunan iyon kanalları ve hücre sinyal mekanizmasında rol oynayan proteinlerin ARM etkileşimi araştırılıp, karşılaştırmalı değerlendirmeler yapmak ilacın mekanizmasını aydınlatmak açısından doğru bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

Akerstedt T., Shift work and disturbed sleep/wakefulness., *Occup Med (Lond)*, 2003, **53**(2), 89-94.

Bavle A., Phatak A., Armodafinil induced mania in schizophrenia., *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, DOI:0004867413513344 .

Baber J., Ellena J. F., Cafiso D. S., Distribution of general-anesthetıcs in phospholipid-bilayers determined using H-2 NMR and H-1-H-1 *Noe spectroscopy, Biochemistry*, 1995, **34**(19), 6533-6539.

Beck P., Odle A., Wallace-Huitt T., Skinner RD, Garcia-Rill E., Modafinil increases arousal determined by P13 potential amplitude: an effect blocked by gap junction agonists., *Sleep*, 2008, **31**(12), 1647–54.

Beracochea D., Cagnard B., Celerier A., Merrer J., Peres M., Pierard C., Firstevidence of a delay-dependent working memory e enhancing effect of modafinilin mice. *Neuroreport*, 2001, **12**(2), 375-378.

Beracochea D., Liscia P., Tronche C., Chauveau F., Jouanin J. C., Pierard, C., Stress modulation of the memory retrograde-enhancing effects of the awakening drug modafinil in mice, *Psychopharmacology*, 2008, **196**(1), 1-13.

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

Bilge D., Sahin I., Kazanci N., Severcan F., Interactions of tamoxifen with distearoyl phosphatidylcholine multilamellar vesicles: FTIR and DSC studies. Spectrochimica Acta Part A: *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **130**, 250-256.

Boggs J. M., Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1987, **906**(3), 353-404.

Brasseur G., Pillot T., Lins L., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability, *Trends Biochem. Sci*. 1997, **22**(5), 167-171.

Budin I., Devaraj N. K., Membrane assembly driven by a biomimetic coupling reaction, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **134**(2), 751-75.

Cameron D. G., Charette G. M., Automation of Fourier Transform Infrared Studies of Temperature-Induced Phenomena, *Applied Spectroscopy*, 1981, **35**(2), 224-225.

Casal H. L., and Mantsch, H. H., Polymorphic Phase Behaviour of Phospholipid Membranes Studied by Infrared Spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta.* 1984, **779**(4), 381-401.

Chapman D., Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1975, **8**(2), 185-235.

Cornil C. A., Balthazart J., Motte P., Massotte L., Seutin V., Dopamine activates noradrenergic receptors in the preoptic area, *J Neurosci*. 2002, **22**(21), 9320–9330.

Darwish M, Kirby M, Hellriegel ET, Yang R, Robertson P., Pharmacokinetic profile of armodafinil in healthy subjects: pooled analysis of data from three randomized studies, *Clin Drug Invest*, 2009, **29**(2), 87–100.

Darwish M., Kirby M., Andrea D. M., Yang R., Hellriegel E. T., Robertson J.. P., Pharmacokinetics of armodafinil and modafinil after single and multiple doses in patients with excessive sleepiness associated with treated obstructive sleep apnea: A randomized, open-label, crossover study, *Clinical therapeutics*, 2010, **32**(12), 2074-2087.

De Saint Hilaire Z, Orosco M, Rouch C, Blanc G, Nicolaidis S., Variations in extracellular monoamines in the prefrontal cortex and medial hypothalamus after modafinil administration: a microdialysis study in rats. *Neuroreport*. 2001, **12**(16), 3533–7.

Didato G., Nobili L., Treatment of narcolepsy, *Expert Rev Neurother*, 2009, **9,** 897-10.

Drake C. L., Roehrs T., Richardson G., Walsh J. K., Roth T., Shift work sleep disorder: prevalence and consequences beyond that of symptomatic day workers, *Sleep*, 2004, **27**(8), 1453-1462.

Engber T. M., Koury, E. J., Dennis, S. A., Miller, M. S., Contreras, P. C., Bhat, R. V., Differential patterns of regional c-Fos induction in the rat brain by amphetamine and the novel wakefulness-promoting agent modafinil, *Neuroscience letters*, 1998, **241**(2), 95-98.

Ergun, S., Demir, P., Uzbay, T., Severcan, F., Agomelatine strongly interacts with zwitterionic DPPC and charged DPPG membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014, **1838**(11), 2798-2806.

Ferraro L., Fuxe K., Tanganelli S., Tomasini M.C., Rambert F.A., Antonelli T., Differential enhancement of dialysate serotonin levels in distinct brain regions of the rat by modafinil: possible relevance for wakefulness and depression, *J Neurosci Res.* 2002, **68**(1), 107–12.

Fiocchi E. M., Lin Y. G., Aimone L., Gruner J. A., Flood D. G., Armodafinil promotes wakefulness and activates Fos in rat brain, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2009, **92**5(3), 49-557.

Frengeli U. P., Günthard H. H., Hydration sites of egg phosphatidylcholine determined by means of modulated excitation infrared spectroscopy, *Biochim Biophys Acta*, 1976, **450**(1), 101-106.

Gallopin T., Luppi P. H., Rambert F. A., Frydman A., Fort P., Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the ventrolateral preoptic nucleus: an in vitro pharmacologic study, *Sleep*, 2004, **27**(1), 19–25.

Goldstain D. B., The effects of drugs on membrane fluidity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 1984, **24**(1), 43-64.

Harsh J. R., Hayduk R., Rosenberg R., Wesnes K. A., Walsh J. K., Arora S., Roth, T., The efficacy and safety of armodafinil as treatment for adults with excessive sleepiness associated with narcolepsy, *Current medical research and opinion*, 2006, **22**(4), 761-774.

Hirshkowitz M., Black J.E., Wesnes K., Niebler G., Arora S., Roth T., Adjunct armodafinil improves wakefulness and memory in obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome, *Respiratory Medicine*, 2007, **101**(3), 616-627

Jankovic J., Treatment of hyperkinetic movement disorders, *The Lancet Neurology*, 2009, **8**(9), 844-856.

Kanbayashi T., Honda K., Kodama T., Mignot E., Nishino S., Implication of dopaminergic mechanisms in the wake-promoting effects of amphetamine: a study of D- and L-derivatives in canine narcolepsy, *Neuroscience*, 2000, **99**(4), 651-659.

Lasch J., Weissig V., Brandl M., *Preparation of liposomes*, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, 2003.

Levin I.W., Mushayakarara E., Bittman R., Vibrational ssignment of the sn-1 and sn-2 chain carbonyl stretching modes of membrane phopholipids, *J. Raman Spear*., 1982, **13**(3), 231-234.

Lin J. S., Hou Y., Jouvet M., Potential brain neuronal targets for amphetamine-, methylphenidate-, and modafinil-induced wakefulness, evidenced by c-fos immunocytochemistry in the cat, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, **93**(24), 14128-14133.

Loland C. J., Mereu M., Okunola O. M., Cao J., Prisinzano T. E., Mazier S., Newman A. H., R-modafinil (armodafinil): a unique dopamine uptake inhibitor and potential medication for psychostimulant abuse, *Biological psychiatry*, 2012, **72**(5), 405-413.

Lower E. E., Malhotra A., Surdulescu V., Baughman R. P., Armodafinil for sarcoidosis-associated fatigue: a double-blind, placebo-controlled, crossover trial, *Journal of pain and symptom management*, 2013, **45**(2), 159-169.

Madras B. K., Xie Z., Lin Z., Panas H., Lynch L., Johnson R., Modafinil occupies dopamine and norepinephrine transporters in vivo and modulates the transporters and trace amine activity in vitro, *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, **319**(2), 561–569.

Michael J. T., International classification of sleep disroders: diagnostic and coding manual. 3rd ed. *American Academy of Sleep Medicine*, New York, United States, 687-701, 2005.

Mignot E., Nishino S., Guilleminault C., Dement W. C., Modafinil binds to the dopamine uptake carrier site with low affinity, *Sleep* 1994, **17**(5), 436–437.

Murillo-Rodríguez E., Haro R., Palomero-Rivero M., Millán-Aldaco D., Drucker-Colín R., Modafinil enhances extracellular levels of dopamine in the nucleus acumbens and increases wakefulness in rats, *Behav Brain Res*, 2007, **176**(2), 353–357.

Newman A.H., Katz J. L., Atypical dopamine uptake inhibitors that provide clues about cocaine's mechanism at the dopamine transporter, *Top Med* Chem, 2009, **4**, 95–129.

Niemegeers P., Maudens K. E., Morrens M., Patteet L., Joos L., Neels H., Sabbe B. G., Pharmacokinetic evaluation of armodafinil for the treatment of bipolar depression, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2012, **8**(9), 1189-1197.

Nieves, A. V., Lang, A. E., Treatment of excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease with modafinil, *Clinical neuropharmacology*, 2002, **25**(2), 111-114.

Ohayon M. M., Lemoine P., Arnaud-Briant V., Dreyfus M., Prevalence and consequences of sleep disorders in a shift worker population, *J Psychosom Res* 2002, **53**(1), 577-583.

Ozsoy, S., Aydin, D., Ekici, F., Effects of modafinil on pentylenetetrazol-induced convulsive epilepsy, *Bratislavske lekarske listy*, 2015, **116**(3), 162-166

Pigeau R., Naitoh P., Buguet A., McCann C., Baranski J.,Taylor M., Modafinil, d-amphetamine and placebo during 64 hours of sustained mental work, Effects on mood, fatigue, cognitive performance and body temperature, *J Sleep Res*, 1995, **4**(4), 212–228.

Razin S., Rottem S., *Current topics in Membranes and Transport*, 17th ed., Academic Press, New York, 1982.

Sahin I., Bilge D., Kazanci N., & Severcan, F., Concentration-dependent effect of melatonin on DSPC membrane, *Journal of Molecular Structure*, 2013, **1052**, 183-188.

Sahin I., Severcan F., Kazancı N., Melatonin induces opposite effects on order and dynamics of anionic DPPG model membranes, *Journal of Molecular Structure*, 2007, **834**, 195-201.

Schwartz T. L., Siddiqui U. A., Raza S., Morell M., Armodafinil for fibromyalgia fatigue, *Annals of Pharmacotherapy*, 2010, **44**(7-8), 1347-1348.

Simon P., Hemet C., Ramassamy C., Costentin J., Non-amphetaminic mechanism of stimulant locomotor effect of modafinil in mice, *Eur Neuropsychopharmacol*, 1995, **5**(4), 509–514.

Scammell T. E., Estabrooke I. V., McCarthy M. T., Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness, *J Neurosci*, 2000, **20**(22), 8620–8628.

Schultz C. P., Liu K. Z., Johnston J. B., Mantsch H. H., Study of chronic lymphocytic leukemia cells by FT-IR spectroscopy and cluster analysis, *Leukemia research*, 1996, **20**(8), 649-655.

Severcan, F**.,** Sahin, I., Kazancı, N., Melatonin strongly interacts with zwitterionic modelmembranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1668**(2), 215-222.

Severcan F., Vitamin E decreases the order of the phospholipid model membranes in the gel phase: An FTIR study, *Bioscience Reports*, 1997, **17**(2), 231-235.

Severcan F., Durmus H. O., Eker F., Akinoglu B. G., Haris P. I., Vitamin D2 modulates melittin–membrane interactions, *Talanta*, 2000a, **53**(1), 205-211.

Severcan F., Kazanci N., Zorlu, F., Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations, *Bioscience Reports*, 2000b, **20**(3), 177-184.

Seydel J. K., Coats E. A., Cordes H. P., Wiese M., Drug membrane interaction and the importance for drug transport, distribution, accumulation, efficacy and resistance, *Archiv der Pharmazie*, 1994, **327**(10), 601-610.

Seydel J. K., Wiese, M., Cordes, H. P., Chi, H. L., Schaper, K. J., Coats, E. A., Kutscher, B., E. Emig in QSAR: Rational Approaches to the Design of Bioactive Compounds, *Elsevier Science Publishers, BV, Amsterdam*, 367-376, 1991.

Scammell T. E., Estabrooke I. V., McCarthy M. T., Chemelli R. M., Yanagisawa M., Miller M. S., Saper C. B., Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness, *J Neurosci*, 2000, **20**(22), 8620–8628.

Schwartz J. R., Modafinil: new indications for wake promotion. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2005, **6**(1), 115-129.

Skoog D. A., and Donald M. West. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Saunders College, Philadelphia, 2007.

Stahl S. M., *Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications.* 3rd ed.: Cambridge University Press, New York, 2008.

Szoka Jr., F., Papahadjopoulos D., Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1980, **9**(1), 467-508.

Tanda G., Newman A. H., Katz J. L., Discovery of drugs to treat cocaine dependence: Behavioral and neurochemical effects of atypical dopamine transport inhibitors, *Adv Pharmacol*, 2009, **57**, 253–289.

Tanford C., *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2nd ed. J. Wiley, New York , 1980.

Turker Kaya S., Huck, C. W., Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, *Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis Molecules*, 2017, **22**(1), 168-178.

Turker S., Ilbay G., Severcan M., Severcan F., Investigation of compositional, structural and dynamical changes of penthylenetetrazol-induced seizures on rat brain by FT-IR spectroscopy, *Anal. Chem*, 2014, **86**(3), 1395-1403.

Turker S., Wassall S., Stillwell W., Severcan F., Convulsant agent pentylenetetrazol does not alter the structural and dynamical properties of dipalmitoylphosphatidylcholine model membranes, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2011, **54**(2), 379-386.

Toyran N., Severcan F., Competitive effect of Vitamin D_2 and Ca^{2+} on phospholipid model membranes: an FTIR study, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2003, **123**(2), 165-176.

Toyran N., Severcan F., Interaction between vitamin D2 and magnesium in liposomes: Differential scanning calorimetry and FTIR spectroscopy studies, *Journal of Molecular Structure*, 2007, **839**(1), 19-27.

Toyran N., Zorlu F., Dönmez G., Öğe K., Severcan F., Chronic hypoperfusion alters the content and structure of proteins and lipids of rat brain homogenates: a Fourier transform infrared spectroscopy study, *European Biophysics Journal*, 2004, **33**(6), 549-554.

Urbano F., J, Leznik E., Llinas R. R., Modafinil enhances thalamocortical activity by increasing neuronal electrotonic coupling, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(30), 12554–12559.

URL-1: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/, Ziyaret Tarihi. 20 Kasım 2015.

URL2-11.06.14 http://www.facm.ucl.ac.be/drug_membranes.htm/, Ziyaret Tarihi. 20 Kasım 2015.

Umemura J., Cameron D. G., Mantsch H. H., Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine, *Biochim Biophys Acta*, 1980, **602(1)**, 32-44.

Vetrivelan R., Saper C. B., Fuller P. M., Armodafinil-induced wakefulness in animals with ventrolateral preoptic lesions, *Nature and science of sleep*, 2014, ***6***, 57-63.

Yeagle P. L., *The Structure of Biological Membranes*, 2nd ed. focuses on lipids. CRC Press, New York, 2004.

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

Qu W. M., Huang Z. L., Xu X. H., Matsumoto N., Urade Y., Dopaminergic D1 and D2 receptors are essential for the arousal effect of modafinil, *J Neurosci*, 2008, **28**(34), 8462-8469.

Wechsatol W., Lorente S., Bejan A., Tree-shaped insulated design for uniform distribution of hot water over an area, *Int. J. Heat Mass Transfer*, 2001, **44**(16), 3111-3123.

Willie J. T., Renthal W., Chemelli R. M., Miller M. S., Scammell T. E., Yanagisawa M., Modafinil more effectively induces wakefulness in orexin-null mice than in wild-type littermates, *Neuroscience*, 2005, **130**(4), 983–995.

Wisor JP, Nishino S., Sora I et al., Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness, *J Neurosci*, 2001, **21**(5), 1787-1794.

Wittkampf L. C., Arends J, Timmerman L, Lancel M. A., Review of modafinil and armodafinil as add-on therapy in antipsychotic-treated patients with schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol* 2012, **2**(3), 115-125.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Kırkoçoğlu H, Türker S., Armodafinil'in Fosfatidilkolin Lipitleri ile Doza Bağlı Etkileşmesi", *14. Ulusal Spektroskopi Kongresi,* Elazığ, Türkiye, 29-31 Mayıs 2015.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kocaeli'de doğdu. İlköğrenimini Trabzon, orta öğrenimini İstanbul, lise öğrenimini Kocaeli'de tamamladı. 2005 yılında girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji (İngilizce) bölümünden 2010 yılında mezun oldu. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimi için kabul edildi. 2017 yılında öğrenim gördüğü Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'ndan mezun oldu. 2015 yılından bu yana özel bir şirkette Kalite ve İş Süreçleri Uzmanı olarak çalışmaktadır.