KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEONATAL DÖNEMDE UYGULANAN KAFEİNİN TONİK KLONİK NÖBET GEÇİREN WİSTAR SIÇANLARDA BİYOFİZİKSEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖKAY KANDİL

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEONATAL DÖNEMDE UYGULANAN KAFEİNİN TONİK KLONİK NÖBET GEÇİREN WİSTAR SIÇANLARDA BİYOFİZİKSEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖKAY KANDİL

Dr.Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA		
Danışman,	**Kocaeli Üniversitesi**	**.....**
Doç.Dr. Halim Aytekin ERGÜL		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniversitesi**	**.....**
Dr.Öğr. Üyesi İlknur DURSUN		
Jüri Üyesi,	**Altınbaş Üniversitesi**	**.....**

Tezin Savunulduğu Tarih: 28.12.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, neonatal dönemde kafein uygulanmış Wistar sıçanların erişkinlik döneminde kimyasal olarak indüklenen nöbetlerin ardından hipokampus dokusunda meydana gelen biyofiziksel değişikliklerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini, birikimini ve emeğini benden eksik etmeyen, hayatımın sonuna kadar şükranla anacağım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda kullandığım doku örneklerine ulaşmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Gül İLBAY hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarıma destek veren Sayın Dr. Ögr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK hocama ve öğrencisi Hümeyra HAKSOY'a şükranlarımı sunarım.

Bütün laboratuvar çalışmalarımda ve üniversite hayatımda sonsuz desteklerini hissettiğim arkadaşlarım Kübra DAĞCI, Didem ŞENTÜRK, Dilan YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında sabırla beni destekleyen, sevgilerini ve emeklerini benden esirgemeyen, maddi ve manevi olarak her durumda desteklerini hissettiğim sevgili annem Göknur KANDİL, sevgili babam Ercüment KANDİL ve canım ağabeyim Göker KANDİL'e teşekkür ederim.

Aralık-2020 Gökay KANDİL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iii
TABLOLAR DİZİNİ iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
GİRİŞ 1
1.GENEL BİLGİLER 3
1.1.Epilepsi 3
1.1.1.Jeneralize tonik-klonik nöbetler 4
1.1.2.Epilepsinin genel patofizyolojisi 5
1.2.Hayvan Modelleri 8
1.2.1.Pentylenetetrazol 9
1.3.Kafein 10
1.3.1.Kafein yapısı 10
1.3.2.Adenozin ve reseptörleri 10
1.3.3.Kafeinin moleküler etki mekanizması 11
1.3.4.Kafein metabolizması 12
1.3.5.Kafeinin etkileri 13
1.4.Hipokampus Yapısı ve Fonksiyonları 14
1.5.Kızılötesi Spektroskopisi 16
1.5.1.Zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi 17
2.MALZEME VE YÖNTEM 19
2.1.Hayvan Deneyleri 19
2.2.ATR-FTIR Spektroskopisi Deneyleri 19
2.3.Bradford Testi 20
2.3.TBARs Testi 20
2.5.Spektral analiz 21
2.5.1.İstatistiksel analiz 21
3.BULGULAR 23
3.1.ATR-FTIR Spektroskopisi Bulguları 23
3.2.1.TBARs testi 33
3.2.2.Bradford testi 34
4.TARTIŞMA 35
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER 50
KAYNAKLAR 51
EKLER 71
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 77
ÖZGEÇMİŞ 78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kafein molekülünün metabolitleri 12
Şekil 1.2. Hipokampus anatomisi 14
Şekil 1.3. Moleküler titreşim tipleri 17
Şekil 1.4. ATR-FTIR cihazı 17
Şekil 1.5. ATR-FTIR çalışma prensibi 18
Şekil 3.1. KAF+PTZ grubuna ait hipokampus 4000-900 cm^{-1} frekans aralığındaki ATR-FTIR spektrumu 23
Şekil 3.2. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait hipokampus 3050-900 cm^{-1} frekans aralığındaki ATR-FTIR spektrumları 25
Şekil 3.3. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait olefinik=CH bant alanı (A) ve olefinik lipit alan değerleri (B) 26
Şekil 3.4. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait CH_2 asimetrik (A) ve CH_2 simetrik(B) bant alan değerleri 27
Şekil 3.5. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait CH_2 asimetrik(A) ve CH_2 simetrik(B) bant genişliği değerleri 27
Şekil 3.6. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait CH_2 asimetrik (A) ve CH_2 simetrik (B) frekans değerleri 28
Şekil 3.7. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait C=O bant alanı(A) ve C=O/lipit alan (B) değerleri 28
Şekil 3.8. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait C=O frekans değerleri 29
Şekil 3.9. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait Amid I (A) ve Amid II (B) bant alan değerleri 29
Şekil 3.10. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait lipit/protein alan oran değerleri 30
Şekil 3.11. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait COO^- alan değerleri 30
Şekil 3.12. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait PO^-_2 Asimetrik(A) ve PO^-_2 Simetrik (B) bant alanı değerleri 31
Şekil 3.13. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait PO^-_2/lipit alan oran değerleri 31
Şekil 3.14. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait PO^-_2 Asimetrik(A) ve PO^-_2 Simetrik (B) frekans değerleri 32
Şekil 3.15. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait C+-N--C bant alan değerleri 32
Şekil 3.17. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait MDA konsantrasyon değerleri 34
Şekil 3.18. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait protein miktarları 34

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Kızılötesi spektral bölgeleri 16
Tablo 3.1. Hipokampus örneğine ait spektrumlardaki bantların tanımları. 24

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
kj	: Kilojoule

Kısaltmalar

AMPA	: α-amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-4-propiyonik asit
ATR-FTIR	: Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi
CA	: Cornu Ammonis
EEG	: Elektroensofalogram
GABA	: Gama Amino Butirik Asit
ILEA	: International League Against Epilepsy (Uluslararası Epilepsi Ligi)
IR	: Infrared (Kızılötesi)
İJE	: İdiopatik Jeneralize Epilepsi
JTKN	: Jeneralize Tonik-Klonik Nöbet
MDA	: Malondialdehit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mtDNA	: Mitokondriyal Deoksiribonükleik asit
NMDA	: *N*-metil-D-aspartat
PTZ	: Pentilentetrazol
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TBARs	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA	: Trikloroasetik Asit

NEONATAL DÖNEMDE UYGULANAN KAFEİNİN TONİK KLONİK NÖBET GEÇİREN WİSTAR SIÇANLARDA BİYOFİZİKSEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Kafein (1,3,7-trimetilksantin), çeşitli organlar ve sistemler üzerinde güçlü etkilere sahip psikoaktif bir moleküldür. Kafeinin merkezi sinir sistemini uyarıcı etkisi adenozinin antogonizması yoluyla gerçekleşir ve epileptik nöbetler üzerinde paradoksal etkileri vardır. Fakat bu etkilerin altında yatan mekanizmalar hala bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, konuya katkı sağlamak amacı ile epileptik nöbetler sonucu hipokampuste oluşan değişimler üzerine kafeinin tetikleyici ya da inhibe edici biyofiziksel etkileri incelendi. Bu amaç doğrultusunda, neonatal dönemde (P7-P11) kafein uygulanmış ve uygulanmamış erişkin dönemde ise jeneralize tonik klonik epileptik nöbet geçiren iki grup Wistar sıçanların hipokampus dokuları Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ile analiz edildi. Spektral analiz kapsamında olefinik, CH_2 asimetrik, CH_2 simetrik, C=O, COO^- simetrik, amid I, amid II, PO^-_2 asimetrik ve PO^-_2 simetrik gerilme bantlarının frekans ve alan parametreleri değerlendirildi. Ek olarak çalışmaya bazı biyokimyasal analizler de dahil edildi. Elde edilen bulgulara göre kafein grubunda lipit peroksidasyonunda artma ve protein miktarinda değişiklik, lipit içeriğinde ve membran akışkanlığında ise azalma tespit edildi. Ayrıca membran lipit düzeninde ve lipit paketlenmesinde farklılıklar gözlendi. Bunun yanı sıra, amid I bandının ayrıntılı analizi protein ikincil yapılarındaki değişiklikleri ortaya koydu. Tüm bu sonuçlar, neonatal dönemde uygulanan kafeinin hipokampus dokusunda oluşan epileptik nöbetlerin bazı biyofiziksel etkilerini arttırıcı rolü olabileceğini ortaya koydu.

Anahtar Kelimeler: ATR-FTIR, Epilepsi, Hipokampus, Kafein.

INVESTIGATION OF THE BIOPHYSICAL EFFECTS OF CAFFEINE APPLIED IN NEONATAL PERIOD ON TONIC CLONIC EXPERIENCED WISTAR RATS

ABSTRACT

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthin) is a psychoactive molecule with powerful effects on various organs and systems. The stimulating effect of caffeine on the central nervous system occurs through the antagonism of adenosine and has paradoxical effects on epileptic seizures. However, the mechanisms underlying these effects are still unknown. In the present study, the triggering or inhibitory biophysical effects of caffeine on the changes in the hippocampus as a result of epileptic seizures were examined in order to contribute to this subject. For this purpose, the hippocampus tissues of two groups of Wistar rats received caffeine and did not in neonatal period (P7-P11), both of which experienced generalized tonic-clonic epileptic seizure were analyzed by attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. . Within the scope of spectral analysis, frequency and area parameters of olefinic, CH_2 asymmetric, CH_2 symmetric, C = O, COO^- symmetric, amide I, amide II, PO^-_2 asymmetric and PO^-_2 symmetric stress bands were evaluated. Additionally, some biochemical analyzes were included. According to the findings, in the caffeine group, an increase in lipid peroxidation and protein content, and a decrease in lipid content and membrane fluidity were detected. Also, differences were observed in membrane lipid order and lipid packaging. In addition, detailed analysis of the amide I band revealed changes in protein secondary structures. All these results revealed that caffeine administered in the neonatal period may have a role in enhancing some of the biophysical effects of epileptic seizures occurring in the hippocampus tissue.

Keywords: ATR-FTIR, Epilepsy, Hippocampus, Caffeine.

GİRİŞ

Epilepsi, çeşitli semptomlarla sonuçlanan, tekrarlayan ve provoke edilmeyen nöbetlerle karakterize kronik bir nörolojik bozukluktur (Falco-Walter ve diğ., 2018; Penderis, 2014). Dünya çapında yaklaşık 70 milyon kişiyi etkileyen, karmaşık ve çok faktörlü mekanizmalarıyla ilgili sınırlı bilgi nedeniyle tam bir tedavisi olmadığı için Dünya Sağlık Örgütü tarafından en önemli küresel sağlık sorunlarından biri olarak tanımlanmaktadır (https://www.who.int/health-topics/epilepsy, 2020; Türker-Kaya ve İlbay,2020). Bu hastalıkla ilgili deneysel ve klinik çalışmalar çok yoğun bir şekilde uzun senelerdir devam etse de, epilepsinin tam teşhis ve tedavisi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Hipokampusun oldukça organize laminer yapısı, epileptogenez süreçleri ile ilişkili hücresel ve moleküler değişikliklerin net bir şekilde tanımlanmasına izin vermektedir. Beynin elektriksel uyarı üretmeye en yatkın bölgelerinden biri olması, epileptik nöbetlerin neden olduğu hasara karşı savunmasız yapısı nedeniyle yaygın görülen jeneralize tonik-klonik nöbet (JTKN) ile karakterize epilepsi tipleri ile ilişkilendirilmektedir (Walker, 2015; Kuruba ve diğ., 2009). Örneğin temporal lob epilepsisinde sıklıkla görülen doku hasarı olan hipokampal skleroz, hipokampuste anormal sinaptik bağlantıların oluşumuna ve hiper uyarılabilir devrelerin kurulmasına katkıda bulunabilir (Jarero-Basulto ve diğ., 2018).

Kafein (1,3,7-trimetilksantin), çeşitli organlar, sistemler ve davranışlar üzerinde güçlü etkilere sahip ve yaygın olarak kullanılan psikoaktif bir kimyasaldır (Willson, 2018). Kafeinin beyinde oluşturuğu etkiler, adenosin reseptörlerinde bir antagonist olarak hareket etme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Renda ve De Caterina, 2019; Fisone ve diğ., 2004). Kafeinin, MSS'i etkileyerek oluşturduğu bilişsel aktiviteyi uyarmak, uykuyu engellemek ve yorgunluk hissini azaltmak gibi özellikleri yaygın kullanımından sorumludur (Cortés ve diğ., 2016). Kafein aynı zamanda beyinde solunum merkezini adenozin antogonizması yoluyla uyarabilme özelliğinden dolayı yenidoğan tıbbında prematüre bebeklerde apne epizodlarının baskılanması için rutin olarak akut veya kronik olarak kullanılmaktadır (Atik ve diğ., 2016). Bununla birlikte,

olgunlaşmanın erken aşamalarında adenosin reseptörlerinin kafein ile blokajı, beyin gelişimini etkileyebilir ve beyin uyarılabilirliğini arttırarak beyni epileptik nöbetlere daha yatkın bir duruma getirdiğine dair çalışmalar mevcuttur. Literatürde yenidoğanlara uygulanan kafeinin epileptik nöbetlere etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, kafeinin uygulandığı doz, uygulanan yaş, uygulama yöntemlerindeki (akut ya da kronik) değişkenlik nedeniyle nöbet eşiği, nöbet duyarlılığı ve şiddeti gibi parametrelerde farklı etkilerin ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Esmaili ve Heydari, 2019; Yavuz ve diğ., 2019; van Koert ve diğ., 2018; Tchekalarova ve diğ., 2014; Montandon ve diğ., 2008) Fakat, söz konusu etkilerin altında yatan moleküler mekanizma bilinmemektedir.

Konuya katkı sağlamak amacıyla bu tez çalışması kapsamında neonatal dönemde kafein uygulanmış ve uygulanmamış ve erişkinlik dönemlerinde ise konvülsan bir ajan ile epileptik nöbet oluşturulmuş iki gruptan oluşan sıçanların hipokampus beyin bölgeleri ATR-FTIR spektroskopisiyle incelendi. Böylelikle neonatal dönemde verilen kafeinin ve erişkinlik döneminde geçirilen epileptik nöbetlerin hipokampus dokusu üzerine etkileri biyofiziksel açıdan değerlendirildi. ATR-FTIR analizlerinde lipit düzeni, lipit akışkanlığı, protein miktarı, proteinlerin yapısal değişimleri gibi parametreler araştırıldı. Ayrıca tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARs) ve Bradford biyokimyasal testleri de çalışmaya dahil edildi. Bradford testiyle protein miktarındaki, TBARs testinde ise lipit peroksidasyonu son ürünlerinden biri olan malondealdehit (MDA) miktarındaki değişimler incelendi.

1.GENEL BİLGİLER

1.1.Epilepsi

Epilepsi, spontan nöbetler oluşturmaya yönelik kalıcı bir yatkınlıkla karakterize nörobiyolojik, bilişsel ve psikososyal sonuçları olan bir hastalıktır (Thijs ve diğ., 2019). Bu hastalığın en önemli semptomu dışarıdan gözlenebilen ya da gözlenemeyen epileptik nöbetlerdir. Epileptik nöbet, nöronların aşırı, anormal deşarjı nedeniyle beyin fonksiyonunun geçici olarak bozulmasıdır (Penderis, 2014). İnsanların % 5'inden fazlası yaşamlarının bir noktasında nöbet geçirirler. Epileptik nöbetlerin en ayırt edici özelliği tekrarlayan, provoke edilmeden (iki veya daha fazla nöbet) gerçekleşmesidir (Miller ve Goodkin 2014). Epileptik nöbetler, MSS tümörleri, nörogelişimsel anormallikler, MSS travması, inflamasyon (semptomatik epilepsiler) gibi nedenlerle veya pre-sinaptik kompleksler (Toader ve diğ., 2013) ve potasyum kanalları (D'Adamo ve diğ., 2013) gibi anahtar proteinlerin yapısal ve fonksiyonel değişikliklerini tetikleyen genetik mutasyonlarla ilgilidir (Di Maio, 2014; Beck ve Elger, 2008). Adı geçen etmenlerin yanı sıra büyük bir epilepsi grubu, henüz bilinmeyen bir etiyolojiye (idiyopatik epilepsiler) sahip nöbet tipleri ile sınıflandırılır nöbet tipleri ile sınıflandırılır (Beck ve Elger, 2008).

Epileptogenez, önceden normal olan bir beyin ağının işlevsel olarak artmış nöbet duyarlılığına doğru değişime uğradığı ve böylece spontan ve tekrarlayan nöbetler üretme olasılığının arttığı süreçtir (Dudek ve Staley 2012; Goldstein ve Coulter 2013). Bu değişiklikler arasında nörodejenerasyon, nörojenez, glioz, aksonal hasar, dendritik plastisite, kan beyin bariyeri hasarı, enflamatuar hücrelerin beyin dokusuna katılımı, hücre dışı matrisin yeniden düzenlenmesi ve nöronal hücrelerin moleküler yapısının yeniden düzenlenmesi gibi unsurlar yer alır (Pitkänen ve Lukasiuk, 2011).

Epilepsi, nörolojik bozukluklar için küresel hastalık yüküne katkıda bulunan üçüncü en önemli faktördür (Devinsky ve diğ., 2018; Ngugi ve diğ., 2010). Her yaşta, özellikle çocukluk ve yaşlılıkta, tüm ırklarda ve sosyal sınıflarda görülebilir. Dünyada yaklaşık

70 milyon insanı (Lekoubou ve diğ., 2018) ve Avrupa'da 6 milyonu etkiler (Baulac ve diğ., 2015). Küresel olarak, her yıl yaklaşık 2,4 milyon kişiye epilepsi teşhisi konmaktadır (Jennum ve diğ., 2017). Aktif epilepsi prevalansı 1000'de 6,4'tür ve yaşam boyu yaygınlığı 1.000'de 7.6'dır. Yaygınlık yaşla birlikte artma eğilimindedir (Beghi ve Giussani, 2018). Yaşlılarda artan nöbet ve epilepsi insidansı, yaşa bağlı ve yaşlanmaya bağlı epileptojenik koşulların artışına bağlanabilir. Hem yaygınlık hem de görülme sıklığı, düşük ve orta gelirli ülkelerde yüksek gelirli ülkelere göre daha yüksektir (Zack ve Kobau, 2017). Bu bulgu kısmen, düşük ve orta gelirli ülkelerde epilepsiye neden olabilen trafik kazalarının, doğum yaralanmalarının ve nöro-enfeksiyöz bozuklukların (nörokistiserkoz gibi) yüksek sıklığından kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Devinsky ve diğ., 2018).

Epileptik nöbet ve epilepsi sınıflandırma sistemleri, 1970'lerden beri klinik uygulama ve araştırmada kullanılmaktadır. Yıllar içinde, en güncel olarak kullanılan 2017 Uluslararası Epilepsi ile Mücadele Ligi (ILAE) operasyonel epilepsi sınıflandırma sistemi, nöbetleri jeneralize başlangıçlı, fokal başlangıçlı ve bilinmeyen başlangıçlı olmak üzere üç kategoriye ayırmaktadır. Fokal başlangıçlı nöbetler, bir serebral yarım kürenin bir kısmı ile sınırlı nöronal ağlardan kaynaklanır. Jeneralize başlangıçlı nöbetler, iki taraflı dağılmış nöronal ağlarda başlar. Bir nöbet fokal olarak başlayıp daha sonra jeneralize duruma geçebilir. Nöbetler korteksten veya subkortikal yapılardan kaynaklanabilir. Jeneralize nöbetlerin ana alt tipleri absans, JTKN, miyoklonik ve atoniktir. Absans nöbetleri, bazen göz kırpma veya baş sallama ile sözlü uyaranlara tepkisizce bakmayı içerir. Miyoklonik nöbetler, herhangi bir belirgin bilinç bozukluğu ile ilişkili olmayan ani, kısa hareketlerden oluşur. Bu kısa istemsiz kas kasılmaları bir veya birkaç kası etkileyebilir; bu nedenle miyoklonik nöbetler jeneralize veya fokal duruma geçebilir. Atonik nöbetler, vücut tonunun kaybına sebep olur (Pack, 2019; Stafstrom ve Carmant, 2015; Yin ve diğ., 2013).

1.1.1.Jeneralize tonik-klonik nöbetler

İdiyopatik jeneralize epilepsi (IJE), belirli bir bölgeden kaynaklanan, hızla iki taraflı olarak dağılan ağlarla etkileşime giren ve yeni kavramsallaştırılan bir grup nöbet tipinin olduğu epilepsi grubudur (Berg ve Scheffer, 2011) ILAE Epileptik Nöbet Sınıflandırması ile tipik hale getirilen geleneksel epileptoloji, yalnızca birincil JTKN'i

IJE sendromunun bir bileşeni olarak sınıflandırmıştır (Gursahani ve Gupta, 2012). JTKN bilateral hemisferleri içeren jeneralize sivri dalga deşarjları (2.5-5 Hz) ile karakterizedir (Ji ve diğ., 2014). Başlangıç yaşı, geç çocukluktan erken yetişkinliğe kadar değişmektedir. Çoğu hastada nöbetler seyrektir ve genellikle uyku yoksunluğu veya aşırı alkol ile ilişkili olarak ortaya çıkar. (Guerrini ve diğ., 2019) JTKN için yeterli miyelinasyon gerekir. Bu nedenle yenidoğanlarda görülmez ve 2 yaşın altında nadirdir (Korff ve Nordli, 2005) Corpus callosum, nöbet aktivitesinin interhemisferik olarak yayılmasının ana yoludur, ancak diğer yollar bazal ganglionlar, talami ve beyin sapı da nöbetlerin retiküler oluşumunu içerebilir (Gursahani ve Gupta, 2012; Theodore ve diğ., 1994). JTNK belirtileri, fiili konvülsiyondan saatler ile günler önce ortaya çıkabilen belirsiz prodromal semptomlarla başlayan birkaç aşamaya ayrılabilir. Yaygın ön belirtiler arasında baş ağrısı, ruh hali değişikliği, anksiyete,uyuşukluk, iştah eksikliği, baş dönmesi yer alır. Tonik fazdan önce, birkaç saniye süren, iki taraflı kas kasılmaları olabilir. Tonik faz, gövdenin kısa fleksiyonu ile başlar, buna gözlerin yukarı doğru sapması, midriyazis ve göğüs kafesi kaslarının kasılması ile akciğerden boşalan hava nedeniyle karakteristik bir ses çıkarma eşlik eder. Klonik fazın başlamasıyla birlikte, kaslar kasılıp gevşer. Nöbet, son bir jeneralize tonik spazm ile sona erer. Tonik ve klonik aşamalarda bilinç kaybı ve otonomik değişiklikler meydana gelir (Foldvary-Schaefer ve Wyllie, 2007). Çoğu tonik-klonik nöbetin süresi 1 dakikadan azdır. Olası komplikasyonlar arasında oral ve kafa travması, vertebral vücut stres kırıkları, aspirasyon pnömonisi, pulmoner ödem ve ölüm bulunur (Shorvon ve diğ., 2018).

1.1.2.Epilepsinin genel patofizyolojisi

Nöbetlerin ve epilepsinin altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamasa da geleneksel olarak iyon kanalları veya sinaptik fonksiyon anormalliklerinin sebep olduğu düşünülmektedir. Bu hususlar, uyarılma/inhibisyon dengesizliği teorisine yol açmıştır. Bu sayede artan uyarılma, azalmış inhibisyon veya her ikisi de hiper uyarılabilir bir durumu ve nöbet oluşumunu dolayısıyla epileptogenez için artan bir eğilimi destekliyor olabilir (Shao ve diğ., 2019). Glutamat ve γ-aminobütirik asit (GABA), epilepsi ile ilgili olarak kapsamlı bir şekilde incelenen iki nörotransmiterdir. Hem glutamaterjik hem de GABAerjik sistem, epileptik olaylarda önemli roller oynar (Yin ve diğ., 2013). GABA, nöronları hiperpolarize

ederek inhibe edici presinaptik potansiyeller üreten ana inhibitör nörotransmiter olarak kabul edilir (Isokawa, 2016; Naylor, 2010). GABAerjik sistem, nöronal uyarımı dengelemede ve dolayısıyla epileptiform deşarjları baskılamada önemli bir role sahiptir (Morimoto ve diğ., 2004). Epilepsi patogenezinde rol oynayan iki tür GABA reseptörü vardır, bunlar $GABA_A$ ve $GABA_B$ reseptörleridir. $GABA_A$ reseptörleri (ligand-kapılı iyon kanalları), klorür akışını artırarak hızlı inhibe edici presinaptik potansiyellere aracılık ederken (Seo ve Leitch, 2015) $GABA_B$ reseptörleri (G-protein-bağlı reseptörler), potasyum iletkenliğini artırarak ve kalsiyum girişini azaltarak yavaş inhibe edici presinaptik potansiyellere aracılık eder (Dugladze ve diğ., 2013). GABAerjik inhibisyonun azalması veya kaybının, uyarıcı postsinaptik potansiyeller oluşturma ve patlama deşarjlarını senkronize etme olasılığını artırabileceği ve dolayısıyla epileptogenezi indükleyebileceği varsayılmaktadır (Khazipov, 2016; Aroniadou-anderjaska ve diğ., 2008). Önerilen GABAerjik mekanizmalar arasında GABA salınımının bozulması (Buzzi ve diğ., 2012) GABA reseptörlerinde değişiklikler (Galanopoulou, 2008; Treiman, 2001), GABA sentezinde bozulma (Dinkel ve diğ., 1998) ve nöronal kayıp (Knopp ve diğ., 2008) yer almaktadır. Normal gelişen beyinde bile uyarıcı sinaptik fonksiyon, inhibe edici sinaptik fonksiyondan önce gelişir ve gelişmiş uyarılma ve nöbet oluşumunu destekler. Ek olarak, yaşamın erken dönemlerinde nörotransmiter GABA, inhibisyondan ziyade uyarılmaya neden olur (Stafstrom ve Carmant, 2015).

Glutamat, nöronları depolarize ederek uyarıcı postsinaptik potansiyeller oluşturmaktan sorumlu olan beyindeki ana uyarıcı nörotransmitterdir (Barker-Haliski ve Steve White, 2015; Morimoto ve diğ., 2004) Genel olarak, glutamat reseptörleri, α-amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-4-propiyonik asit (AMPA), N-metil-D-aspartik asit (NMDA), kainat reseptörleri ve metabolik glutamat reseptörleri olarak sınıflandırılır (Traynelis ve diğ., 2010). Epilepsinin başlangıcı ve ilerlemesi sırasında dahil olan glutamaterjik moleküler mekanizmalar arasında glutamat reseptörlerinin yukarı regülasyonu (Seifert ve diğ., 2002; Aronica ve diğ., 2000), hücre dışı glutamat konsantrasyonunda artış (Yi ve Hazell, 2006; DeLorenzo ve diğ., 2005), glutamaterjik taşıyıcılarda anormallikler (Touret ve diğ., 2007; Yi ve Hazell, 2006) ve otoimmün mekanizma (Bien ve diğ., 2005) yer alır. Bu mekanizmalar, aşırı uyarılabilirlik ve epilepside önemli rol oynayan aşırı glutamaterjik aktiviteye katkıda bulunur (Yin ve

diğ., 2013). Elektroensefalogramda interiktal bir artış olarak kaydedilen ve "paroksismal depolarize kayma" olarak bilinen bu fenomen, hücre içi olarak nöronlardaki epileptik deşarjlarla ilişkilidir (Lüders ve diğ., 2019; Pippa ve diğ., 2017) Paroksismal depolarize kayma, ilk bileşenler olarak AMPA reseptörlerinin ve daha sonraki bileşenler olarak NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı olan patlama deşarj özelliği ile dev bir uyarıcı sinaptik potansiyele bağlı olarak depolarizasyonla ilişkilidir (Yin ve diğ., 2013).

Oksidatif stres, hücrelerde ve dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve birikimi ile biyolojik bir sistemin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir olaydır (Pizzino ve diğ., 2017). Deneysel çalışmalar, oksidatif stresin epilepsinin başlangıcına ve gelişimine katkıda bulunan bir faktör olduğu (Agustin ve diğ., 2020; Pearson-Smith ve Patel, 2017; Aguiar ve diğ., 2012) aynı zamanda epileptik nöbetlerin neden olduğu nöronların uzun süreli olarak uyarılmasının ROS konsantrasyonunda bir artışa yol açtığı ve bu durumunun beyin hasarına neden olduğunu göstermektedir (Roganovic ve diğ., 2019; Puttachary ve diğ., 2015; Méndez-Armenta ve diğ., 2014). Beyin, yüksek metabolik talepleri nedeniyle vücuttaki en aerobik olarak aktif organdır ve bu nedenle özellikle oksidatif strese duyarlıdır. Beyin ayrıca lipit peroksidasyonuna eğilimli çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir ve hidroksil radikal oluşumunu katalize edebilen yüksek demir konsantrasyonları içerir. Aynı zamanda beyindeki antioksidan savunma mekanizmaları özellikle zayıftır ve epileptik nöbetler sırasında meydana gelen ROS üretiminde anormal derecede artış, nörodejenerasyonun riskini de artırır (Agustin ve diğ., 2020; Geronzi ve diğ., 2018). Yüksek konsantrasyonlarda ROS, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerle kolayca reaksiyona girerek geri döndürülemez fonksiyonel değişiklikle neden olur (Pearson-Smith ve Patel, 2017; Lorigados ve diğ., 2016). Lipid peroksidasyonu olarak bilinen çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, serbest radikal aracılı bir yoldur ve hücre zarı fosfolipidlerinin geri döndürülemez nöronal hasarının bir indeksi olarak kullanılır ve olası bir epileptik aktivite mekanizması olarak önerilmektedir (Roganovic ve diğ., 2019; Pandey ve diğ., 2012). Proteinlerin ROS tarafından oksidasyonu, anahtar enzimlerin yapısında ve işlevinde değişikliğe neden olabilir (Agustin ve diğ., 2020). Proteinlerin okside olması, nörotransmiter reseptörleri ve iyon kanalları gibi zar proteinlerinin zarar görerek

nöronal hiper uyarılabilirliğe ve nöronal hücre ölümüne katkıda bulunabilmesine neden olabilir. Monosakkarit şekerlerin oksidasyonu, protein agregasyonuna katkıda bulunabilen oksaldehitlerin oluşumuyla sonuçlanır (Martinc ve diğ., 2012). Ayrıca epilepsili insanlarda ve çeşitli kemirgen epilepsi modellerinde glukoz metabolizması bozulmuştur (Akman ve diğ., 2015; Tenney ve diğ., 2014). Membran potansiyellerinin stabilizasyonu ve düzenlenmiş nöral sinyalizasyon yüksek miktarda enerji gerektirdiğinden, enerji eksikliğinin nöbet oluşumuna katkıda bulunması muhtemeldir (McDonald ve diğ., 2018). Serbest radikaller, nükleik asitlerin bozulmasını tetikleyebilir. DNA ipliklerini kırabilir veya doğrudan purin ve pirimidin bazlarını değiştirebilirler, bu da mutasyonlara yol açar (Martinc ve diğ., 2012). İnsan mitokondriyal DNA'sındaki (mtDNA) 8344 nükleotid çiftinin A'dan G'ye geçiş mutasyonu (A8344G mutasyonu) düzensiz kırmızı lifli miyoklonik epilepsi nedeni olarak tanımlanmıştır (Shoffner ve diğ., 1990). Nöbetler sırasında artan ROS miktarı, hücrede ROS üretiminin en büyük kaynağı olan mitokondriyi fonksiyon kaybına uğratır. Bu durum epilepside nöronal uyarılabilirliği ve sinaptik iletimi modüle eden ve nöronları ek strese karşı daha savunmasız hale getiren hücre içi Ca^{+2} homeostazını kademeli olarak bozan olası mekanizmalardan biri olarak görülmektedir (Khurana ve diğ., 2013; Chuang, 2010).

1.2.Hayvan Modelleri

Epileptik nöbetler, kimyasal, moleküler ve anatomik değişiklikleri indükleyebilen elektriksel ve davranışsal olayların bir kombinasyonudur (Kandratavicius ve diğ., 2014). Hayvanlarda doğal olarak meydana gelen ve deneysel olarak indüklenen nöbetler, epilepsinin altında yatan nörobiyolojik özellikleri araştırmak için kullanılmaktadır. Epilepsinin hayvan modelleri, beyinde nöbetlerin gelişme ve yayılma mekanizmalarını, nöronlarda veya nöronal dokudaki patolojik değişiklikleri, kendiliğinden tekrarlayan nöbetlerin gelişmesine neden olan ve epileptik nöbetleri bastırmak için farmakolojik müdahale olasılıklarını aydınlatmaya yardımcı olmaktadır (Schwabe ve Ebert, 2006). Hayvan modellerinde, nöbetlerin çoğu provoke edilir. Bunlar, konvülsan ilaçların verilmesi, elektriksel uyarı ve diğer travmatik durumlar gibi farklı yollarla ortaya çıkar. Modeller akut, yarı kronik ve kronik olabilir (Coppola ve Moshé, 2012). İnsan epilepsisinin özelliklerini taklit eden spontan nöbetleri olan kemirgenler, epilepsinin patojenetik mekanizmalarını ve potansiyel terapötik

hedeflerini incelemek için en yaygın olarak kullanılan canlılardır (Devinsky ve diğ., 2018).

1.2.1.Pentylenetetrazol

Pentylenetetrazol (PTZ) kimyasalı uygulanan hayvan modelleri epilepsi araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tek veya tekrarlanan PTZ enjeksiyonu, JTKN'e neden olur (Turker ve diğ., 2014a; Dastgheib ve Moezi, 2014). Ek olarak, bu kimyasal, tekrarlayan nöbetlerin uyarılma kolaylığı, insan epilepsisine benzer şekilde davranışsal ve EEG belirtileri göstermesi gibi olumlu özellikleri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır (Shimada ve Yamagata, 2018; Dheer ve diğ., 2017; Turker ve diğ., 2014a; Turker, ve diğ., 2014b). PTZ genellikle hayvanlara intraperitoneal (en yaygın olarak), subkutan, intravenöz ve intraserebral (daha az yaygın olarak) enjeksiyonlar şeklinde uygulanır (Türker-Kaya ve İlbay, 2020).

PTZ'nin doğrudan mekanizması ayrıntılı olarak bilinmemekle birlikte, literatüre göre GABAerjik sistemlerde, glutamerjik sistemlerde ve antioksidan savunma sistemlerinde değişikliklere neden olduğunu ortaya koymaktadır (Ergul Erkec, 2015; Patsoukis ve diğ., 2004). Yaygın olarak kabul edilen mekanizma, PTZ'nin aktivitesini $GABA_A$ reseptör kompleksinde pikrotoksin bağlanma bölgesine bağlanarak göstermesidir (Turker ve diğ., 2011; Hansen ve diğ., 2004). Ayrıca PTZ'nin hem tekli hem de tekrarlanan uygulamasından sonra benzodiazepin bağlanma kapasitesi azalır (Hansen ve diğ., 2004). PTZ, $GABA_A$ reseptörü klorür iyonofor kompleksinin seçici bir engelleyicisidir (Shin ve diğ., 2011) ilaveten PTZ'nin hücre içi Ca^{+2} ile ilişkili süreçlerdeki değişikliklere sebep olması, NA^{+} ve K^{+} kanallarının iyonik iletkenliğini değiştirerek nöronların depolarizasyonuna neden olmaktadır (Onozuka ve Watanabe, 1996). PTZ ayrıca beynin birçok bölümünde farklı glutamat reseptör alt ünitelerinin yoğunluk ve duyarlılığında bir değişikliğe ve hipokampal bölgede glutamat nörotransmiterinin yoğunluğunda bir artışa neden olur (Ergul Erkec, 2015). PTZ modelinde, nöbetlerin hemen ardından serbest radikal üretimi bildirilmiştir. (Waldbaum ve Patel, 2010; Rauca ve diğ., 1999). Tek bir konvülsif PTZ dozunun, tüm beyinde hidroksil radikalleri ve belirli beyin alanlarında serbest yağ asidi ve glutatyon peroksidaz aktivitesi gibi birçok parametrede önemli değişikliklere neden olur. Dahası, akut PTZ kaynaklı nöbetler, serebral kortekste nitrik oksit'in (NO) dramatik şekilde yükselmesini tetikler (Shin ve diğ., 2011; Bashkatova ve diğ., 2003)

1.3.Kafein

1.3.1.Kafein yapısı

Kafein (1,3,7-trimetilksantin), dünyada en çok tüketilen psikoaktif ilaçtır. Purin alkaloid ailesine aittir ve 60'tan fazla bitkinin çekirdeğinde, yaprağında ve meyvesinde değişen miktarlarda bulunur (Heckman ve diğ., 2010). $C_8H_{10}N_4O_2$ moleküler formülüne sahiptir (Zubair ve diğ., 1986). İki amin ve iki amid fonksiyonel grup içerir. Kafein molekülü ayrıca metil grupları (-CH3), karbonil grupları (-C = O), bir alken grubu (-C = C) ve ayrıca bir imin grubu (-C = N) içerir (Jeya Krishna Sri P ve S, 2018). Hidrofobik atomik gruplar barındırdığından dolayı kafein polar olmayan çözücüler içerisinde çözünebilir. Kafeinin hidrofobik özellikleri, kan-beyin bariyeri de dahil olmak üzere tüm biyolojik zarlardan geçmesine olanak sağlar (Atik ve diğ., 2016). Normal fizyolojik koşullar altında, kafeinin beyinde uyguladığı etkiler, adenosin reseptörlerinde bir antagonist olarak hareket etme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Renda ve De Caterina, 2019; Fisone ve diğ., 2004).

1.3.2.Adenozin ve reseptörleri

Adenozin molekülü ($C_{10}H_{13}N_5O_4$), riboza bağlanmış bir adenin molekülünü içeren ve hemen hemen tüm hücrelerden salınan bir nükleozittir (Kazemzadeh-Narbat ve diğ., 2015; Gessi ve diğ., 2011). Adenozin, RNA'nın temel yapı taşı görevi görür, aynı zamanda ATP'nin bir bileşenidir ve dört hücre dışı reseptöre bağlanarak çok sayıda patofizyolojik mekanizmayı düzenler (Rouquette ve diğ., 2019). Adenosin, beyin aktivitesinin koordinasyonunda yer alan ana moleküldür (Sebastião ve Ribeiro, 2009). G-protein-bağlı reseptör aracılığıyla hareket ederek, sinaptik plastisiteden bilişe, uykuya, motor aktiviteye, nöroinflamasyona ve hücre ölümüne kadar çeşitli normal ve anormal beyin fonksiyonlarının homeostazına ve nöromodülatör kontrolüne kritik bir şekilde katkıda bulunur (Chen ve diğ., 2014).

Adenosin reseptörleri, neredeyse insan vücudunun tüm doku ve organlarında yaygın olarak dağılmış bulunan, A1, A2A, A2B ve A3 reseptörleri olarak adlandırılan dört üyeden oluşan bir G-protein bağlı reseptör ailesidir. Al ve A3 reseptörleri Gi / Go proteinine bağlanır ve adenilsiklaz aktivitesini inhibe eder. A2a ve A2b reseptörleri Gs proteinine bağlanarak enzim aktivitesini arttırır(dos Santos-Rodrigues ve diğ., 2015; Kazemzadeh-Narbat ve diğ., 2015) MSS'de, A1 reseptörleri korteks, hipokampus ve

serebellumda geniş bir şekilde dağılmıştır, A2A reseptörleri esas olarak striatum, nükleus akkümbens, kaudat putamen ve bazal ganglionlarda, A2B ve A3 reseptörleri düşük ekspresyon seviyelerinde bulunur (Ballesteros-Yáñez ve diğ., 2018).

1.3.3.Kafeinin moleküler etki mekanizması

Kafein bilinen hücresel etkilerini adenozin reseptör antagonizması, fosfodiesteraz inhibisyonu ve hücre içi kalsiyumun mobilizasyonu aracılığıyla gösterir.

Adenozin Antogonizması

Kafeinin, biyolojik etkilerinin büyük kısmı adenozin reseptör antagonizması yoluyla gerçekleşir (Willson, 2018; Cortés ve diğ., 2016; Ribeiro ve Sebastio, 2010). Kafein, farklı adenosin reseptörleri için farklı afinitelere sahiptir. Bunun sonucunda, ekspresyon düzeyine ve adenosin reseptörlerinin tipine bağlı olarak dokular üzerinde farklı etkiler üretir (Esmaili ve Heydari, 2019). Kafeinin adenosin A2A reseptörüne yüksek afinitesine rağmen, kafeinin en belirgin akut etkileri adenosin A1 reseptör antagonizmine atfedilir (Da Silva, 2011). Kafeinin, adenozinin inhibitör etkilerini reseptörleri aracılığıyla bloke etmesiyle dolaylı olarak norepinefrin, dopamin, asetilkolin, serotonin, glutamat, GABA ve belki de nöropeptitlerin salınımını modüle eder (Daly ve Shi, 1999).

Fosfodiesteraz İnhibisyonu

Kafein gibi ksantinler, yüksek mikromolar ile milimolar aralığında düşük afinite ile hücre içi siklik nükleotid fosfodiesteraz izozimlerinin rekabetçi inhibitörleri olarak hareket eder (Cortés ve diğ., 2016). Kafein, iskelet kası ve yağ dokularında fosfodiesteraz enzimlerini inhibe ederek hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) konsantrasyonlarını arttırır. Bu eylemler, serbest yağ asitleri ve gliserol salınımı ile hormona duyarlı lipazların aktivasyonu yoluyla lipolizi destekler (Cappelletti ve diğ., 2014). Artan cAMP ayrıca kandaki katekolaminlerde bir artışa neden olabilir (Castro ve diğ., 2005). Bununla birlikte, kafein, fosfodiesteraz enzimlerinin oldukça zayıf bir inhibitörüdür ve davranışsal etkilerin meydana geldiği in vivo konsantrasyonlar, anlamlı fosfodiesteraz inhibisyonu ile ilişkili olamayacak kadar düşüktür. Bu nedenle, fosfodiesteraz inhibisyonunun, muhtemelen çok yüksek, oldukça toksik ve potansiyel

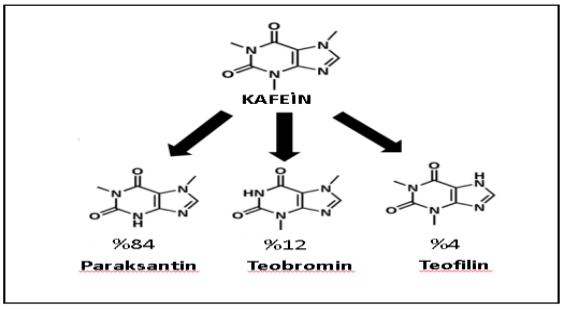
olarak öldürücü dozların alındığı durumlar dışında, kafein mekanizmalarında herhangi bir rol oynaması olası değildir (Willson, 2018; Cappelletti ve diğ., 2014).

Hücre İçi Kalsiyumun Mobilizasyonu

Kafein, endoplazmik ve sarkoplazmik retikulumda bulunan ryanodine duyarlı kalsiyum kanallarını aktive ederek hücre içi kalsiyum salınımına yol açar (Cortés ve diğ., 2016; Tavares ve Sakata, 2012). Kanalları aktive etmek için gerekli olan mimolar konsantrasyonlarda kafein ayrıca inozitol trifosfat'a duyarlı kanalların inhibisyonu gibi kalsiyum homeostazı üzerinde başka etkileri de tetikler. Kafein, ryanodine duyarlı kalsiyum kanalları için en güçlü ve seçici ksantinlerden biridir. (Tavares ve Sakata, 2012).

1.3.4.Kafein metabolizması

Kafein, oral alımdan sonraki 45 dakika içinde mide ve ince bağırsak tarafından tamamen emilir (Barcelos ve diğ., 2020). Kafein karaciğerde sitokrom P450 oksidaz enzim sistemi, özellikle de CYP1A2 enzimi tarafından üç ana metabolit halinde metabolize edilir: paraksantin (% 84), teobromin (% 12) ve teofilin (% 4) (Cortés ve diğ., 2016). Kafeinin yarılanma süresi, yaş, karaciğer fonksiyonu, hamilelik, bazı eşzamanlı ilaçlar ve kafein metabolizması için gerekli karaciğer enzimlerinin seviyesi gibi faktörlere bağlı olarak bireyler arasında büyük ölçüde değişir. Sağlıklı yetişkinlerde, kafeinin yarılanma ömrü yaklaşık 3-4 saattir. Hamile kadınlarda yarı ömür kabaca 9-11 saattir (Knutti ve diğ., 1982). Bebeklerde ve küçük çocuklarda yetişkinlerden daha uzun olabilir (Nieber, 2017).Hamilelik sırasında anne tarafından tüketilen kafein, kan-beyin bariyeri ve plasentadan geçiş dahil olmak üzere tüm sıvılara ve dokulara serbestçe geçebilme özelliğinden dolayı fetüsün gelişimini doğrudan etkileme potansiyeline sahiptir (Atik ve diğ., 2016).



Şekil 1.1. Kafein molekülünün metabolitleri

Paraksantin, teobromin ve teofilin biyolojik aktiviteye sahiptir. Teofilin, kafeinden daha güçlü memeli adenozin reseptörleri inhibitörüdür (Da Silva, 2011). Paraksantin, adenosin reseptörlerini bloke etme yeteneği düşünüldüğünde kafein ile aynı potansiyele sahiptir (Fredholm ve diğ., 1999) Teobromin küçük biyolojik etkileresahiptir, ancak alkolik karaciğer hastalığı üzerinde terapötik etkiye sahip bir sitokin inhibitörü olan pentoksifilinin bir öncüsüdür (Whitfield ve diğ., 2008). Kafein ve metabolitleri tüketiminden 3-6 saat sonra böbrekler tarafından atılır (Renda ve De Caterina, 2019).

1.3.5.Kafeinin etkileri

Kafein, çeşitli organlar, sistemler ve davranışlar üzerinde güçlü etkilere sahip ve yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır (Willson, 2018). Kafeinin yaygın kullanımı büyük ölçüde psikostimülan özelliğinden kaynaklıdır. Bu özelliği MSS'de adenosin 1 ve 2a reseptörlerinde antagonistik etkilerinden ve bunun sonucunda genellikle insanlar tarafından tüketilen dozlarda uyanıklığı teşvik etme becerisinde yatmaktadır (Lazarus ve diğ., 2017). Aynı zamanda moleküler ve hücresel seviyelerde kafein, uyku yoksunluğunun hafıza üzerindeki zararlı etkilerinden sorumlu olan birçok mekanizmayı hafifletebilir (Onaolapo ve Onaolapo, 2020). Kafein düşük konsantrasyonlarda lokomotor aktiviteyi uyarırken yüksek dozlarda anksiyeteye neden olabilir (Cappelletti ve diğ., 2014).

Kafeinin epileptik nöbetler üzerindeki etkisi karmaşıktır. Kafeinin uygulandığı doz, uygulanan yaş, uygulama yöntemlerindeki (akut ya da kronik) değişkenlik nöbet eşiği, nöbet duyarlılığı ve şiddeti gibi parametrelerde farklı etkiler yaratır. Örneğin 150 mg/kg ve üzerindeki dozlarda kafein uygulanmasının hayvan modellerinde epileptik nöbetlere neden olduğu bildirilmiştir (van Koert ve diğ., 2018). Neonatal sıçanların hipokampusünde kısa anoksik ataklarla birlikte uygulandığında düşük dozda kafeinin nöbet ürettiğini bildirilirken (Dzhala ve diğ., 1999), genç hayvanlarda uzun süreli, düşük dozda (10-20 mg/ kg) kafein maruziyetinin nöbet duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir (Guillet ve Dunham, 1995). Akut kafein tüketimi, hayvan modellerinde nöbet eşiğini düşürür ve nöbetlerin neden olduğu beyin hasarını kötüleştirir. Tersine, kronik kafein, nöbetlere yatkınlığı azaltır ve status epileptikustan sonra beyin hasarını sınırlar (Nehlig, 2016). Aynı zamanda kafeinin, bazı antiepileptik ilaçların

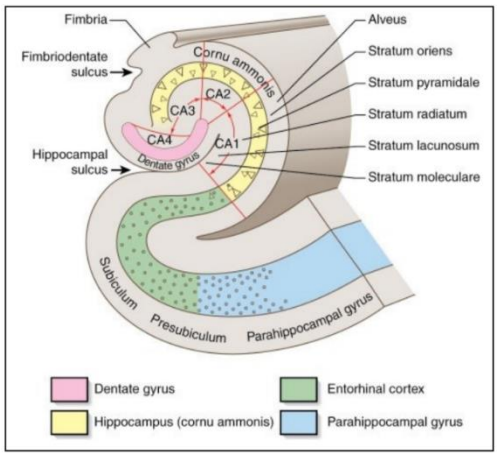
(karbamazepin, topiramat, valproat) etkisini azalttığı da bilinmektedir (Chrościńska-Krawczyk ve diğ., 2011).

Kafein, prematüre bebeklerde prematüre apnesini (AOP) tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Atik ve diğ., 2017; Abdel-Hady, 2015). Kafein, beyindeki medüller solunum merkezinin uyarılması, solunum merkezinin karbondioksite duyarlılığının arttırılması ve diyafragmatik kasılmanın uyarılması dahil olmak üzere üç ana mekanizma ile AOP'yi önler (Kraaijenga ve diğ., 2015; Abdel-Hady, 2015).

Kafeinin ayrıca, tübüler adenozin A1 reseptörleri üzerine etki ederek metabolik hızı arttırdığı, katekolaminlerin aktivitesini arttırdığı, kas yorgunluğunu azalttığı ve diürezi kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Lodha ve diğ., 2020; Bauer ve diğ., 2001).

1.4.Hipokampus Yapısı ve Fonksiyonları

Lateral ventrikülün tabanına doğru uzanan, yaklaşık 8 cm uzunluğunda hilal şeklinde bir yapı olan hipokampus, filogenetik olarak bilinen en eski beyin bölgelerindendir (Giap ve diğ., 2000). Hipokampus, dentat girus, subikulum ve entorhinal korteks ile ile birlikte hipokampal formasyonu oluşturur (Spencer ve Bland, 2019). Dentat girus ve hipokampus, hipokampal sulkusla ayrılır ve birbirlerine doğru kıvrılırlar. Sulkusun alt kısmında da subikulum bulunur. Hipokampusün cornu ammonis (CA) alanları piramidal hücrelerden oluşur ve genellikle dört bölgeye (CA1-CA4) bölünür. CA1 bölgesi subiculuma yakınken,CA4 bölgesi dentat girusa yakındır (Anand ve Dhikav, 2012). Dentat girus morfolojik olarak CA alanlarından farklıdır ve yoğun şekilde paketlenmiş granül hücreler içerir (Jonas ve Lisman, 2014).



Şekil 1.2. Hipokampus anatomisi

Hipokampus, davranışsal, duygusal ve hafıza süreçlerinde hayati rol oynayan limbik sistemin önemli bir parçasıdır (Sendrowski ve Sobaniec, 2013). Yeni somut ve soyut olgusal bilgilerin öğrenilmesinde, olayların ve yerlerin ayrıntılı olarak hatırlanmasına ve tanınmasına izin verecek şekilde çevresel uyaranlar arasında hızlı ve uzun süreli ilişkiler kurma becerisinde önemli bir rol oynar oynar (Spencer ve Bland, 2019). Özellikle entorhinal korteks nesnelerin görsel olarak tanınmasında önemli bir bölgedir (Anand ve Dhikav, 2012). Ayrıca hipokampus, esnek ve hedefe yönelik davranışta hayati bir rol oynar. Esnek biliş ve sosyal davranışla ilişkili belleğin oluşturulması ve yeniden yapılandırılması için sağlam bir hipokampal aktivite gereklidir. Birçok çalışma, hipokampuste herhangi bir hasarın bilginin esnek kullanımını bozabileceğini ve kişinin uyumsuz davranışlar üretebileceğini ortaya koymuştur (Rubin ve diğ., 2014; Wible, 2013).

MSS'de yeni nöronların oluşumu, nöroanatomik araştırmalardaki en önemli bulgulardan biri olarak kabul edilmiştir (Baptista ve Andrade, 2018). Normal koşullar altında, yetişkin kemirgenlerde ventriküllerin subventriküler bölgesi ve hipokampusun dentat girusu olmak üzere iki bölgede yüksek düzeyde nörojenez meydana gelir. Bu iki bölgeden, hipokampusun dentat girusu, insanlar da dahil olmak üzere tüm memeli türlerinde bazal koşullar altında nörojenez yapabilen tek bölgedir. Bu bölgenin yerleşik nöral kök hücreleri, patolojik ve farmakolojik uyaranlara yanıt olarak işlevsel yeni nöronlar ve glia hücreleri üretebilirken, hem ağ plastisitesini hem de doku homeostazını korur (Peng ve Bonaguidi, 2018; Anand ve Dhikav, 2012).

Hipokampusun oldukça organize laminer yapısı, epileptogenez süreçleri ile ilişkili hücresel değişikliklerin açık bir şekilde tanımlanmasına izin vermiştir. Beynin elektriksel uyarı üretmeye en yatkın bölgelerinden biri olması, nöbetlerin neden olduğu hasara karşı savunmasız yapısı nedeniyle yaygın görülen sekonder JTKN ile karakterize temporal lob epilepsisiyle ilişkişkilendirilmiştir (Walker, 2015; Kuruba ve diğ., 2009). Temporal lob epilepsisi yetişkin başlangıçlı epilepsilerin yaklaşık % 40'ını temsil eder. Hipokampal skleroz, temporal lob epilepsisinde en sık görülen doku hasarı türüdür (Chang ve Lowenstein., 2003). Hipokampal skleroz, özellikle hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerinde piramidal nöronların seçici kaybı, internöron ağlarının patolojik proliferasyonu ve şiddetli glia reaksiyonu ile karakterizedir. Bu değişiklikler, uzun süreli ve karmaşık epileptogenez sırasında meydana gelir (Sendrowski ve

Sobaniec, 2013). Ayrıca epileptik nöbetlerin hipokampusta ürettiği nöronal kaybın, dentat gyrus'un granüler hücrelerinde yoğun aksonal filizlenmeyi tetiklediği ve anormal sinaptik bağlantıların sayısını artırdığı bilinmektedir. Nöbetler, hipokampal avize hücrelerinde (GABAerjik internöronlar) belirgin bir azalmayla birlikte, aşırı glutamat salınımını uyaran, epileptik aktiviteyi ve eksitotoksik nöronal hasarı teşvik eden hiper uyarılabilir devrelerin kurulmasına katkıda bulunur (Jarero-Basulto ve diğ., 2018).

1.5.Kızılötesi Spektroskopisi

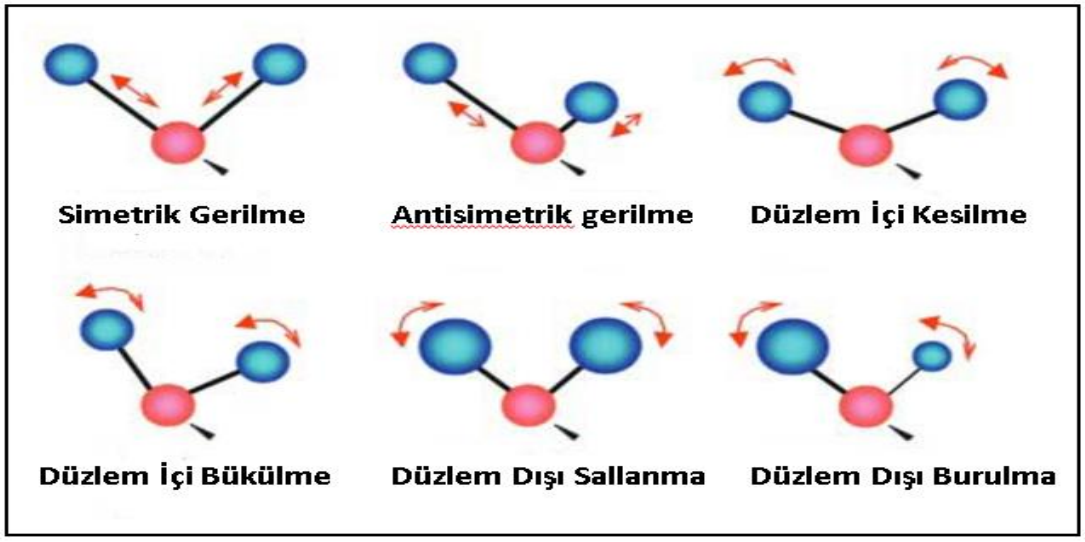
Kızılötesi spektroskopisi, bir moleküldeki işlevsel bir grubun / grupların, titreşim hareketini uyarmak (değiştirmek) için kızılötesi (IR) aralığındaki radyasyonun soğrulduğu absorpsiyon spektroskopisine dayanmaktadır (Kafle, 2020). "Kızılötesi" terimi, 0.78 ve 1000 μm arasındaki elektromanyetik spektrum aralığını kapsar. Elektromanyetik radyasyonunun IR bölgesi, yakın-IR, orta-IR ve uzak-IR olarak adlandırılan üç alt kısma bölünmüştür (Kafle, 2020; Shaw ve Mantsch, 2006).

Tablo 1.1. Kızılötesi spektral bölgeleri

Bölge	Dalga Sayısı Aralığı (cm^{-1})
Uzak-IR	400-4
Orta-IR	4000-400
Yakın-IR	14000-4000

Belirli bir sıcaklıkta, bir molekül (veya bir moleküle bağlı fonksiyonel gruplar) doğal frekansı ile titreşir. Ancak, o molekülün doğal titreşim frekansı ile eşleşen frekanstaki kızılötesi radyasyona maruz kaldığında, molekülde meydana gelen titreşim ve dönme tiplerinde değişikliğe neden olur. Bir fotonun emilmesinden sonra, molekül daha büyük bir genlikte (ancak aynı frekansta) titreşmeye başlar ve böylece molekül enerji kazanır. Başka bir deyişle, bir IR fotonu bir molekül tarafından absorbe edildiğinde, enerjiyi fotondan moleküler titreşime aktarır (çevirir), bu da moleküldeki titreşim modlarından birini uyarmaya neden olabilir ve dipol momentinde değişiklik getirebilir (Kafle, 2020). Bağ titreşimleri, asimetrik ve simetrik germe titreşimlerinden ve ayrıca düzlem içi ve düzlem dışı bükülme modlarından oluşan birkaç genel tipte olabilir;

tümü temel titreşimler olarak adlandırılır. (Thompson, 2018). Sonuç olarak, biyolojik örneklerin kızılötesi spektrumları yalnızca titreşim spektrumlarıdır (Naumann, 2006).



Şekil 1.3. Moleküler titreşim tipleri

1.5.1.Zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi

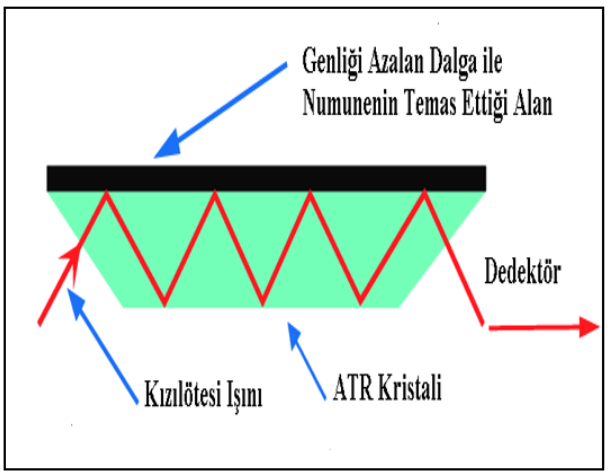
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, numuneyi bozmadan doku bileşenlerine ait (lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi) fonksiyonel gruplarda çok küçük değişikliklerin bile tespit edilmesinde yüksek hassasiyete sahip, tahribatsız, güvenilir, hızlı ve basit bir analitik tekniktir (Alugoju ve diğ., 2019; Elibol-Can ve diğ., 2011; Movasaghi ve diğ., 2008).



Şekil 1.4. ATR-FTIR cihazı

Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi, klasik FT-IR tekniğinin sahip olduğu tüm özellikleri barındırmasının

yanında spektral ölçümlerden önce çok az veya hiç numune hazırlığı gerektirmemesi sebebiyle yaygın olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir (Götz ve diğ., 2020; Ferreira ve diğ., 2020; Kazarian ve Chan, 2013). ATR-FTIR'da, çinko selenid (ZnSe) ve germanyum gibi yüksek kırılma indislerine sahip suda çözünmeyen kristal bulunur. Bu teknikte numuneler ATR kristalleri üzerine yerleştirilerek doğrudan incelenebilir ve sonuçlar numune kalınlığından etkilenmez (Byrne ve diğ., 2020).



Şekil 1.5. ATR-FTIR çalışma prensibi

ATR-FTIR spektroskopisi, Şekil 1.5 'de gösterildiği gibi, toplam iç yansıma (TIR) fenomenini kullanır: Bir IR ışını, ATR elemanı ile numune arasındaki kritik açıya karşılık gelen belirli bir açıyla ATR elemanına girer. Işın TIR'a maruz kalacak ve kristal içinde birkaç kez yansıtılacaktır. Bu iç yansıma, ATR öğesinin ötesine uzanan, genliği azalan bir dalga yaratır. Bir numune ATR elemanıyla yakın temas halindeyse, genliği azalan dalga, numunenin absorbansına benzer frekanslarda enerji kaybeder. Ortaya çıkan ışın, numunenin absorpsiyon spektrumunu oluşturmak için kullanılır (Minnes ve diğ., 2017; Glassford ve diğ., 2013).

2.MALZEME VE YÖNTEM

2.1.Hayvan Deneyleri

Hayvan Deneyleri, Kocaeli Üniversitesi DETAB biriminde, Hayvanların Etik Uygulamaları Avrupa Konsey yönetmeliğine (86/609/EEC) ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesinin (KOÜ HAYDEK 1/6-2018) (Ek-E) ve tüm yazarlarının onayına uygun şekilde gerçekleştirildi. Çalışmada sıçanların gebelik dönemi gözlemlendi. Doğumdan sonra erkek yavrular kafein uygulanmayacak (n=7) (PTZ) ve kafein uygulanacak (n=7) (KAF+PTZ) şeklinde 2 grup oluşturuldu. KAF grubu sıçanlarına doğumdan sonra 7. ve 11. günler arasında 5 gün boyunca 20 mg/kg kafein subkütanöz olarak enjekte edildi. Kafein uygulaması yapılmayan (PTZ) gruptaki yavrulara ise 7. ve 11. günler arasında 5 gün boyunca ‰ 9'luk salin çözeltisi enjekte edildi. Her enjeksiyon sonrası yavrular anne yanına bırakıldı. 21. günde yavrular anne yanından alınarak kafeslere konuldu. Sıçanlar 7 aylık yetişkin hale geldiklerinde ise her iki gruptaki sıçanların hepsine tek doz 80 mg/kg PTZ uygulandı. Sıçanların JTKN geçirdikleri davranışsal olarak kayıt altına alındı. PTZ uygulamasının hemen ardından sıçanlar dekapite edildi ve beyinleri çıkartıldı. Beyin dokusundan hipokampus bölümleri ayrıldı, spektroskopik ve biyokimyasal incelemeler yapılana kadar -80^{0}C derin dondurucuda tutuldu.

2.2.ATR-FTIR Spektroskopisi Deneyleri

ATR-FTIR spektroskopi incelemeleri için hipokampus örnekleri "Freeze Dryer" (dondurarak kurutucu) da 24 saat boyunca tutularak sudan arındırıldı. Kurutulan hipokampus dokuları havanda ezilerek toz haline getirildi. Numunelerin FT-IR analizi sırasında, ATR yüzeyi su-etanol-su dizisi kullanılarak temizlendi ve ardından kurutuldu. Kurutulan hipokampus doğrudan spektrometrenin ATR ünitesinin elmas/çinko-selenid kristali üzerine yerleştirildi. ATR-FTIR spektrometresinde spektrumlar 4000-400 cm^{-1} frekans aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte kaydedildi. Her numune aynı koşullar altında iki kopya halinde tarandı ve ortalamaları alındı. Spektrumlar Perkin Elmer Spectrum One programı ile analiz edildi.

2.3.Bradford Testi

Hipokampus homojenatlarındaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak Coomassie Brillant Blue G-250 kullanıldı. Öncelikle standart eğri oluşturuldu. Bu işlem için 1 ml'sinde 1 mg protein içeren sığır albumin çözeltisinden ependorflara 0, 25, 125, 250 ve 500 µl eklendi. Saf su ile bütün ependorfların hacmi 500 µl olacak şekilde tamamlandı ve her bir ependorfa 500 µl Coomassie Brillant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vortekste karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 1 ml'lik küvetlerde standart serum albümin içerisindeki tampon ve Coomassie Brillant Blue G-250 içeren köre karşı absorbans değerleri okundu. Elde edilen değerlerin karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik oluşturuldu. Hipokampus dokularındaki protein miktar tayinleri için ise her dokudan 2 mg tartıldı. Üzerine 500 µl fosfat buffer eklendi ve homojenize edildi. Homojenize örneklerin her birinden 5 er µl alınarak ependorflara eklendi. Üzerine seyreltmek amacı ile homojenizasyonda kullanılmış olan fosfat tampon çözeltisinden 25 µl eklendi ve son olarak 1.5 ml Coomassie Brillant Blue G-250 boyası ilave edildi. Karışım vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırılıp 10 dk inkübe edildi ve 595 nm'de UV-vis spektrometresinde absorbans değerleri saptandı. Bu işlem her örnek için 3 kez tekrarlandı ve aritmetik ortalamaları alındı. Oluşturulmuş olan standart eğri grafiğine (EK- C) göre hipokampus dokularındaki protein miktarları tayin edildi.

2.3.TBARs Testi

Test için ilk olarak renk reaktifi hazırlandı. 530 mg Tiyobarbitürik Asit (TBA) tartıldı. 20 ml TBA asetik asit üzerine 160 ml distile su eklendi. 20 ml TBA sodyum hidroksit üzerine 160 ml distile su eklendi. Son olarak TBA asetik asit ve TBA sodyum hidroksit ile hazırlanan kimyasallar 150 ml'lik beher içerisinde 530 mg'lık TBA'ya eklenerek TBA çözünene kadar karıştırıldı ve renk reaktifi hazırlandı. Daha sonra her bir hipokampus örneginden ependorflara 25 mg tartıldı. Üzerine 250 µl fosfat buffer eklendi ve homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenize edilmiş örneklerden 100 µl alınarak etiketlenmiş cam tüplere aktarıldı. Cam tüplerdeki örnekler üzerine 1.5 ml renk reaktifi eklendi ve 10 saniye kadar vorteks ile karıştırıldı. Bu işlem sonrası cam tüpler 30 dakika (cam tüp içerisindeki örneklerin rengi pembeye dönene kadar) su dolu bir beher içerisine konularak kaynatıldı. Kaynama işleminin ardından cam tüpler 10 dk buzda bekletilerek reaksiyon durduruldu. Tüplerdeki aynı etiketler ile örnekler

tekrar ependorflara alınarak 15 dakika boyunca rpm ×1600'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi biten örneklerin süpernatantları 1 ml olacak şekilde küvetlere alınıp UV spketrometresinde 530 nmde absorbans değerleri kaydedildi. Elde edilen değerler 1.5 ml renk reaktifine göre hazırlanmış olan standart eğri grafiğinde değerlendirildi. (EK-D)

2.5.Spektral analiz

ATR-FTIR Spektral analizi için Perkin Elmer Spektrum One programı kullanıldı. Analiz kapsamında bant alanları, bant frekansları ve bant genişliği değerleri ölçüldü. Frekans değerleri piklerin yüksekliğinin %70'i alınarak hesaplanırken, bant genişliği pik yüksekliğinin %70'inden elde edilen değerin cm birimini cm^{-1}'e çevrilerek elde edildi. Bant alanı için ise 4000 cm^{-1}, 1900 cm-^{1} ve 900 cm^{-1} bölgelerine uygulanan baseline işleminin ardından, alanı hesaplanacak olan pikin başlangıç ve bitiş noktaları kaydedildi. Ardından pikin alanı hesaplandı. Ayrıca deney koşullarında meydana gelebilecek, numune kalınlığındaki herhangi bir varyasyon olasılığını en aza indirmek amacı ile bantların frekans ve alan değerlerinin yanında bazı spesifik bantların alan oranları hesaplandı. Lipit/protein oranı, CH_2 asimetrik (2924 cm^{-1}) ve simetrik gerilme (2851 cm^{-1}) bantları altındaki alanın toplamının, amid I (1645 cm^{-1}) ve amid II (1547 cm^{-1}) bantları altındaki alanın toplamına oranlanması ile elde edildi. Olefinik = CH/lipit ve C=O/lipit, oranları olefinik = CH (3012 cm^{-1}) ve C=O gerilme (1739 cm^{-1}) bantlarının alanlarının toplam doymuş lipite (CH_2 asimetrik ve simetrik gerilme bantları altındaki alanın toplamı) bölünmesiyle hesaplandı.

Protein ikincil yapı değerlendirmesi Amid I bandı kullanılarak gerçekleştirildi. Amid I bandının altındaki protein ikincil yapılarına atfedilen bantların ayrıntılı analizi için ilk olarak 1700-1600 cm^{-1} frekans aralığında spektrumların ikincil türevleri alındı. İkincil türevlerde absorpsiyon maksimumları minimum olarak göründüğünden, ikinci türev spektrumlarında karşılaştırmalar için minimum pozisyonlar kullanıldı (Turker-Kaya ve diğ., 2020; Özek ve diğ., 2009).

2.5.1.İstatistiksel analiz

ATR-FT-IR spektroskopisinden ve biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçların numerik dataları IBM SPSS Statistics 22 istatistik programı kullanılarak istatistiksel olarak degerlendirildi. Numerik değerler ortalama ± standart sapma şeklinde

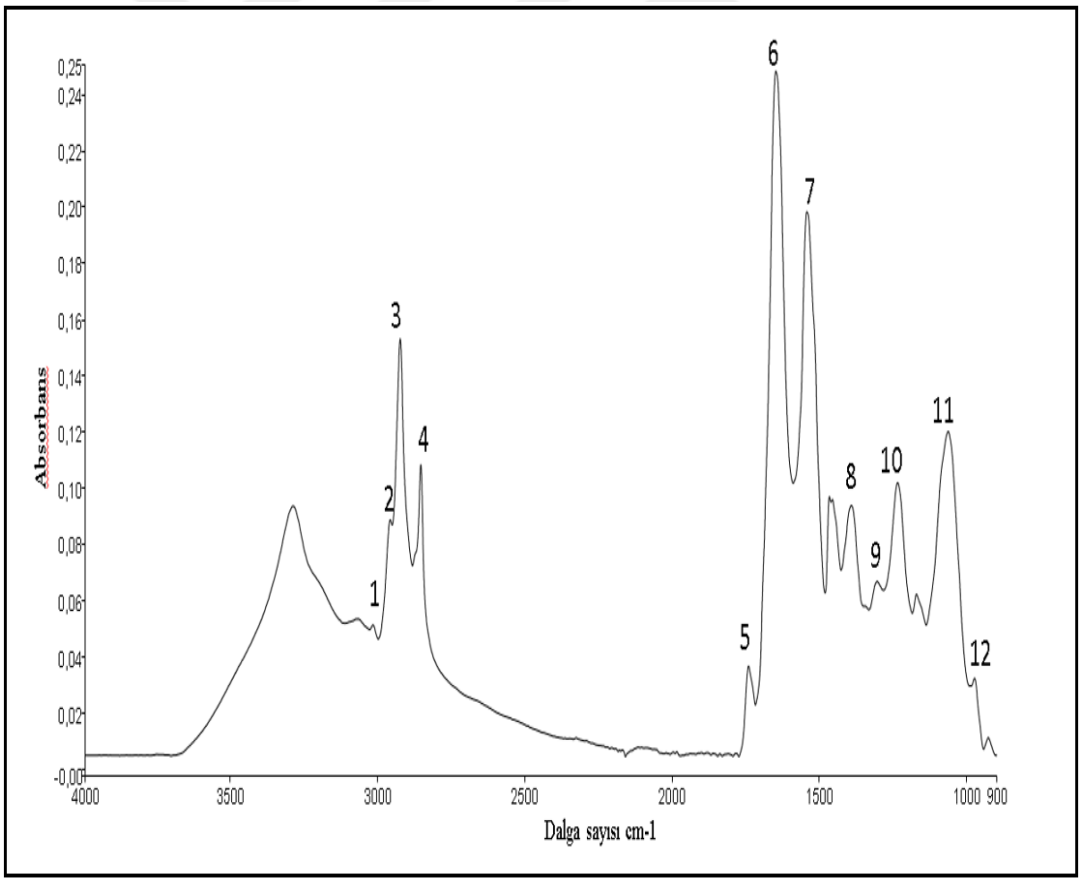
tablolarda verildi. PTZ ve KAF+PTZ sıçan grupları arasındaki değişimler ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığını hesaplanmak için One-Way Anova testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık *p<0,05 ve **p<0,001 şeklinde belirtildi.

3.BULGULAR

3.1.ATR-FTIR Spektroskopisi Bulguları

Tez çalışması kapsamında, neonatal dönemde uygulanan kafeinin erişkin dönemde PTZ ile oluşturulmuş epileptik nöbetlere etkilerini göstermek amacıyla PTZ ve KAF+PTZ grubu biyofiziksel parametreler üzerinden karşılaştırıldı. Ayrıca çalışmaya ATR-FTIR Bradford ve TBARs testleri dahil edildi.

Şekil 3.1 KAF+PTZ grubuna ait bir hipokampus örneğinin ATR-FTIR spektrumu gösterilmektedir. Şekil üzerinde numaralandırılmış spektral bantlar literatüre dayalı olarak Tablo 3.1' de tanımlandı.

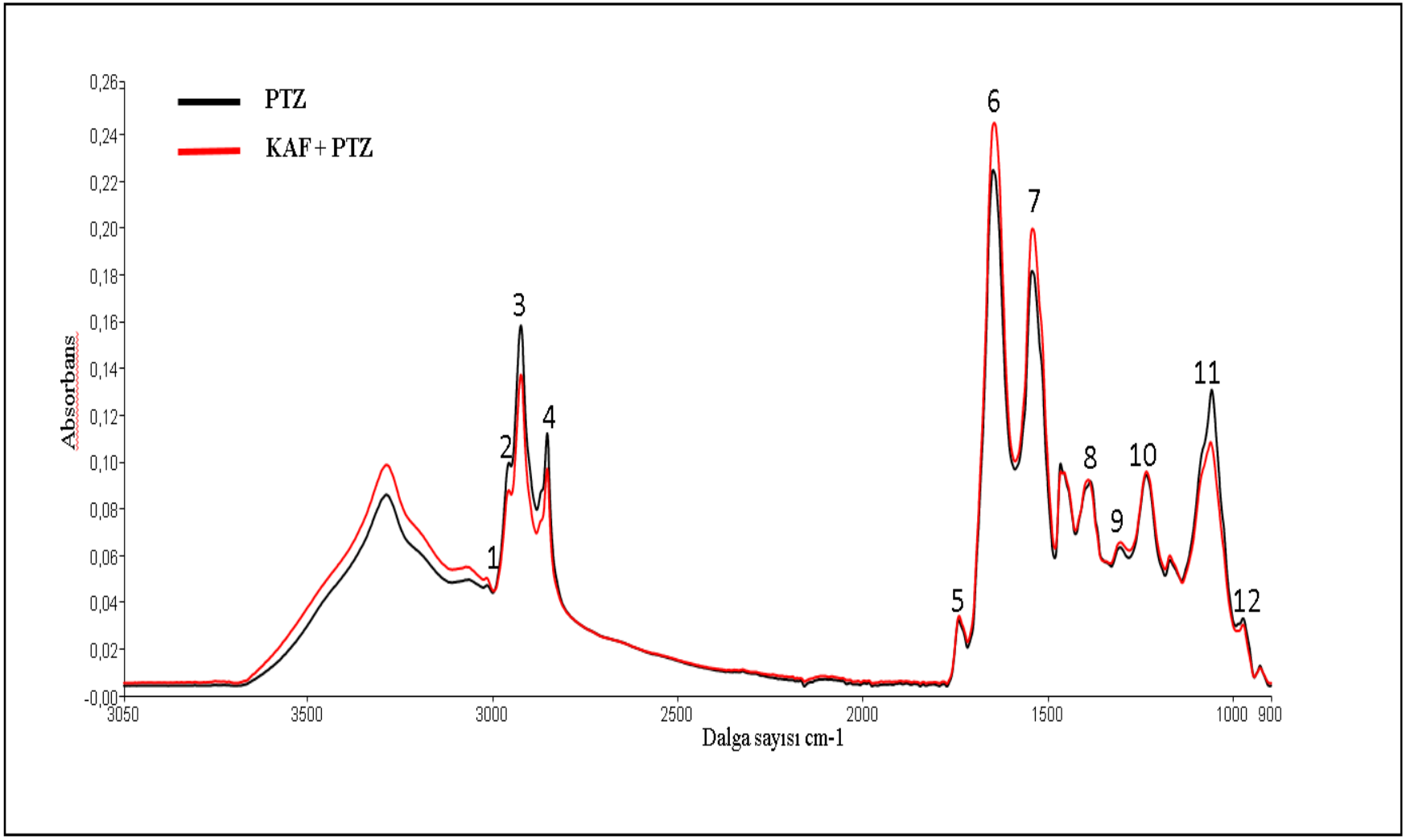


Şekil 3.1. KAF+PTZ grubuna ait hipokampus 4000-900 cm^{-1} frekans aralığındaki ATR-FTIR spektrumu

Tablo 3.1. Hipokampus örneğine ait spektrumlardaki bantların tanımları.

BANT NO	**Frekans (cm^{-1})**	**SPEKTRAL BANTLARIN TANIMI**
1	**3012**	Olefinik = CH gerilme: doymamış lipitler
2	**2956**	CH_3 asimetrik gerilme: lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
3	**2925**	CH_2 asimetrik gerilme: lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
4	**2852**	CH_2 simetrik gerilme: lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
5	**1740**	Doymuş ester C = O gerilmesi: fosfolipitler, kolesterol esterleri, trigliseritler
6	**1645**	Amid I (protein C=O gerilme): proteinler
7	**1547**	Amid II (C=N ve N-H gerilme): proteinler
8	**1400**	COO^- simetrik gerilme: Yağ asitleri, amino asitler
9	**1306**	Amid III: proteinler
10	**1236**	PO^-_2 asimetrik gerilme: fosfolipitler ve nükleik asitler
11	**1080**	PO^-_2 simetrik gerilme: fosfolipitler ve nükleik asitler
12	**970**	C-N^+-C gerilmesi: nükleik asitler, RNA'nın riboz-fosfat ana zincir titreşimleri

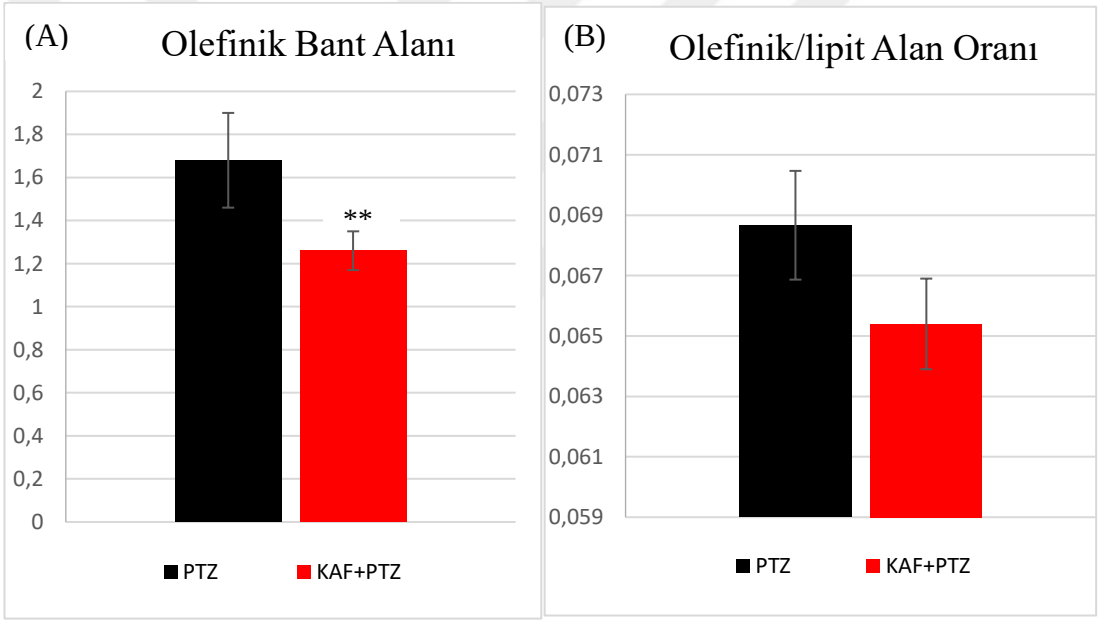
Şekil 3.2'de 3050-900 cm^{-1} bölgesinde 7'şer örnekten oluşan KAF+PTZ ve PTZ gruplarının ATR-FTIR spektrumları karşılaştırıldı. 3050-900 cm^{-1} bölgesinin 3050-2800 cm^{-1} bölümü lipitlerin karakteristik C-H gerilme titreşimlerini içerirken (Palaniappan ve Pramod 2011), parmak izi bölgesi olarak adlandırılan 1800-900 cm^{-1} bölümü sisteme özgü fonksiyonel grupların titreşimlerinden kaynaklanır (Türker-Kaya ve Huck, 2017).



Şekil 3.2. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait hipokampus 3050-900 cm^{-1} frekans aralığındaki ATR-FTIR spektrumları

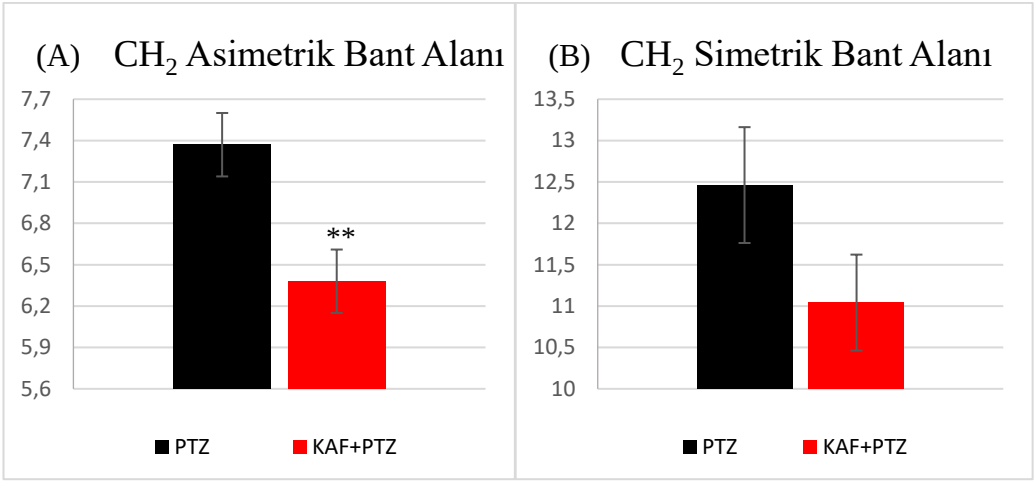
Şekil 3.2'de görülen (3012 cm^{-1}) 1 numaralı bant olefinik bandıdır. HC = CH gruplarının C-H gerilme modundan kaynaklanır ve lipit açil zincirlerindeki doymamışlığın bir ölçütü olarak kullanılabilir (Turker-Kaya ve diğ., 2016; Sivakumar ve diğ., 2014; Severcan ve diğ., 2010).

Bu bandın bant alan değerleri Şekil 3.3 (A)' da, olefinik/lipit alan oran değerleri ise Şekil 3.3 (B)'de verildi. Şekil 3.3 (A) ve Şekil 3.3 (B)' de görüldüğü üzere PTZ grubu KAF+PTZ grubu ile karşılaştırıldığında olefinik bant alanında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p<0,001$**) gözlemlendi. Yine benzer şekilde KAF+PTZ grubunun olefinik/lipit oranında azalma saptandı (Şekil 3.3 (B)). Ancak bu azalma istatiksel olarak anlamlı değildi.



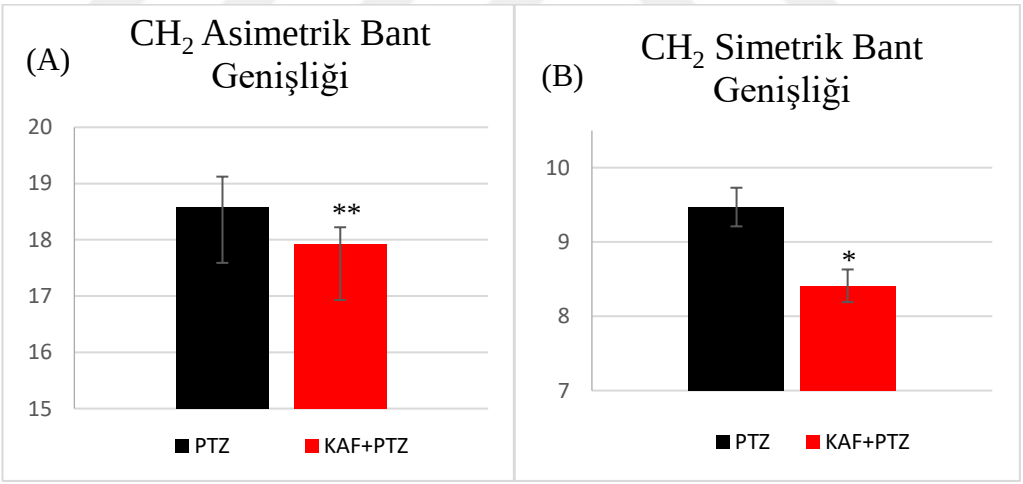
Şekil 3.3. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait olefinik=CH bant alanı (A) ve olefinik lipit alan değerleri (B)

Şekil 3.2'de 3 numara ve 4 numara ile gösterilen sırasıyla CH_2 asimetrik ve CH_2 simetrik bantları lipit açil zincirlerindeki C-H gruplarının asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanır (Matouke, 2019; Mäntele ve diğ., 2015; Sivakumar ve diğ., 2012). Şekil 3.4'de bu bantların alan değerleri gösterilmektedir. Şekilden görüldüğü üzere KAF+PTZ grubunun CH_2 asimetrik ($p<0,001$**) ve CH_2 simetrik bant alanında düşük değerlere kayma tespit edildi. Bu değişim CH_2 simetrik bandı için istatiksel olarak anlamlı değildi.



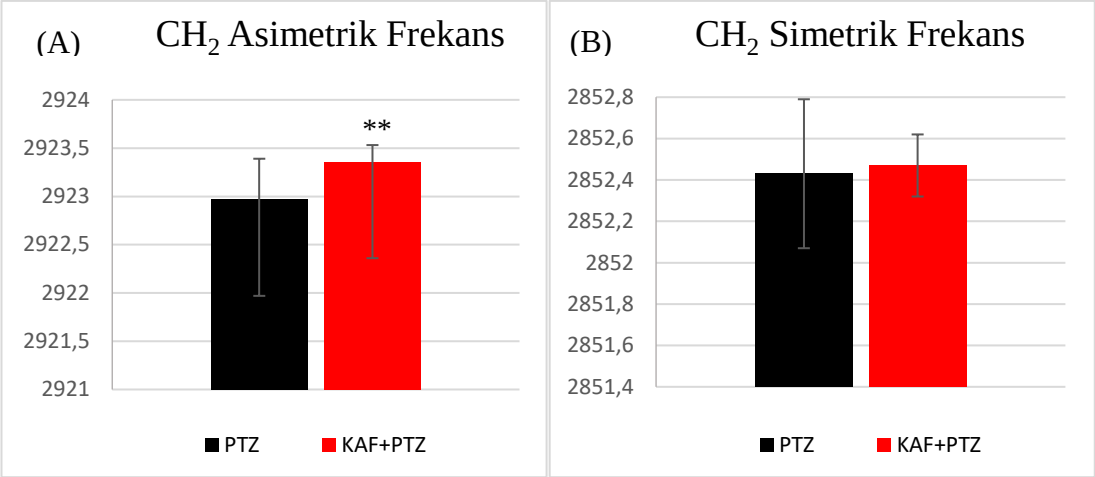
Şekil 3.4. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait CH_2 asimetrik (A) ve CH_2 simetrik (B) bant alan değerleri

KAF+PTZ grubu ile PTZ grubunun CH_2 asimetrik ve simetrik bant genişliği değerleri Şekil 3.5. de gösterildi. PTZ grubu ile karşılaştırıldığında KAF+PTZ grubunun CH_2 simetrik ($p<0,05$*) ve asimetrik ($p<0,001$**) bant genişliği değerlerinde azalma tespit edildi.



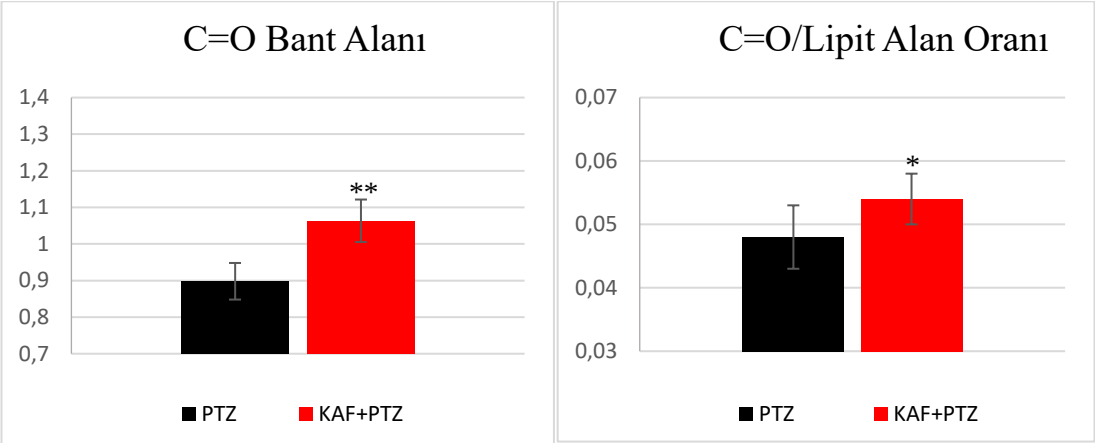
Şekil 3.5. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait CH_2 asimetrik(A) ve CH_2 simetrik (B) bant genişliği değerleri

Şekil 3.6 (A)'da ve (B) de görüldüğü üzere KAF + PTZ grubu ile PTZ grubunun CH_2 simetrik ve asimetrik bant frekans değerleri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda KAF+PTZ grubunun CH_2 asimetrik ve simetrik frekans değerlerinde yüksek değerlere kaymalar gözlemlendi. Ancak CH_2 asimetrik bandında yüksek değerlere kaymalar anlamlı ($p<0,001$*) iken CH_2 simetrik bandında istatiksel olarak anlamlı değildi.



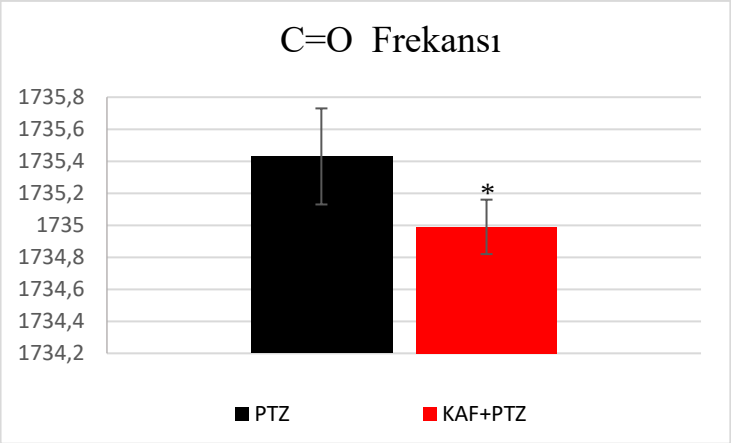
Şekil 3.6. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait CH_2 asimetrik (A) ve CH_2 simetrik (B) frekans değerleri

Lipit ester karbonillerin C = O gerilme titreşimine karşılık gelen 1740 cm^{-1} bandı Şekil 3.2'de 5 numara ile gösterildi (Palaniappan ve Pramod 2011; Wrobel ve diğ., 2011; Gasper ve diğ., 2009). Şekil 3.7 (A)'da görüldüğü üzere C=O bant alanı PTZ ve KAF+PTZ grupları karşılaştırıldığında KAF+PTZ grubunda artma ($p<0,05$*) saptandı. Şekil 3.7 (B)'de gösterildiği üzere PTZ ile KAF +PTZ gruplarının C=O/lipit oranları karşılaştırıldı. KAF+PTZ grubunun C=O/lipit oranı PTZ grubuna göre daha yüksek değerlere ($p<0,05$*) kayma gözlemlendi.



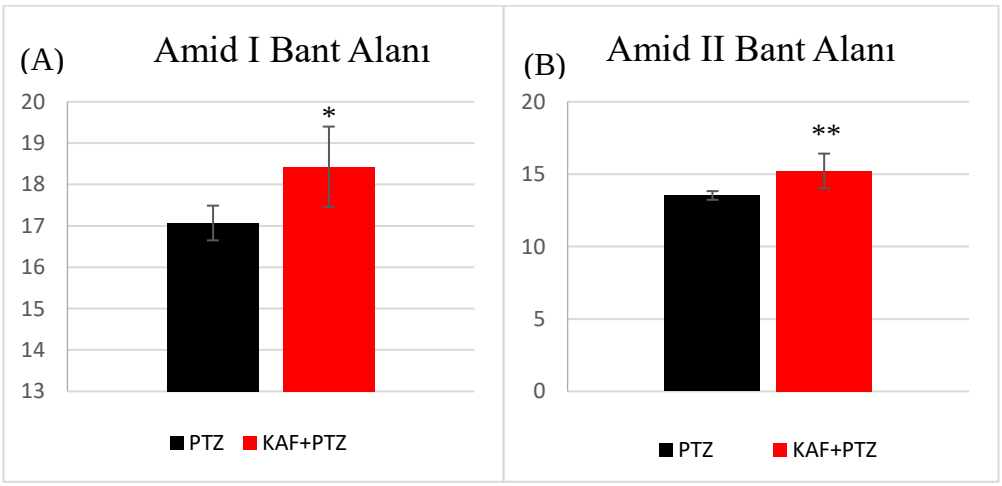
Şekil 3.7. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait C=O bant alanı(A) ve C=O/lipit alan (B) değerleri

KAF+PTZ grubu ile PTZ grubunun C=O bant frekans değerleri Şekil 3.8'de gösterildi. Şekilden görüldüğü üzere KAF+PTZ grubunun C=O bant frekans değerlerinde düşük değerlere kaymalar ($p<0,05$*) saptandı.



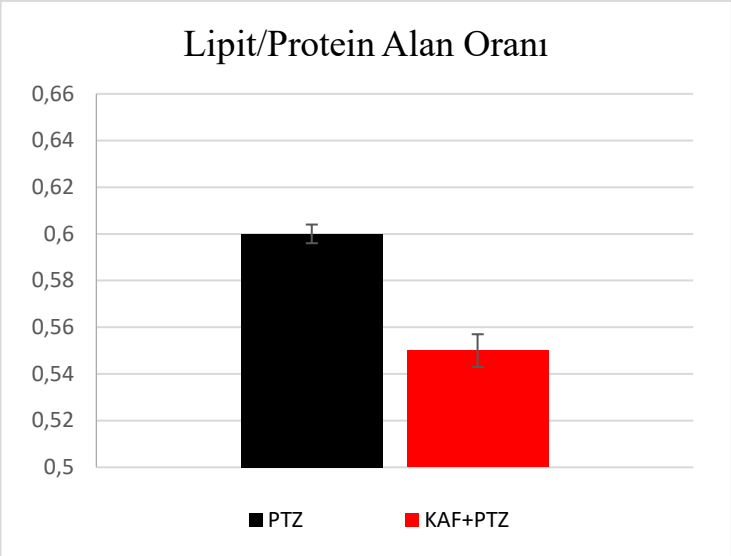
Şekil 3.8. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait C=O frekans değerleri

1645 cm^{-1} ve 1547 cm^{-1}'de bulunan bantlar, sırasıyla proteinlerin amid I ve amid II titreşimlerine karşılık gelir. Şekil 3.2'de amid I 6 numarayla, amid II 7 numarayla gösterildi. Amid I ve amid II bantları proteinlerin peptit omurgasından kaynaklanır; amid I çoğunlukla peptit omurgasının C=O bağından, amid II aynı bağın N – H bükülme ve C – N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Bedolla ve diğ., 2018; Wu ve diğ., 2015; Gianoncelli ve diğ., 2015). PTZ ve KAF+PTZ gruplarının amid I ve II bant alanları şekil 3.9 (A) ve Şekil 3.9 (B)' de gösterilmektedir. KAF+PTZ grubunda amid I ve amid II bandında artış ($p<0,001$**) tespit edildi.



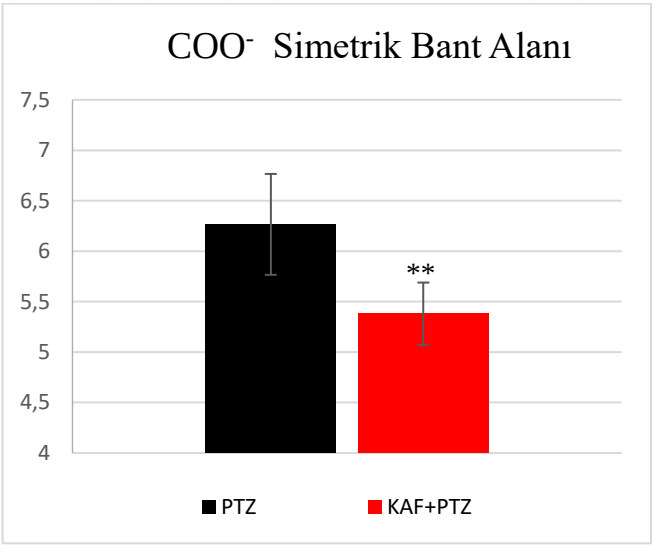
Şekil 3.9. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait Amid I (A) ve Amid II (B) bant alanı değerleri

Şekil 3.10'da gösterilen grupların lipit/protein alan oranlarına göre; KAF+PTZ grubunun lipit/protein oranı PTZ grubuna göre artma istatiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 3.10. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait lipit/protein alan oran değerleri

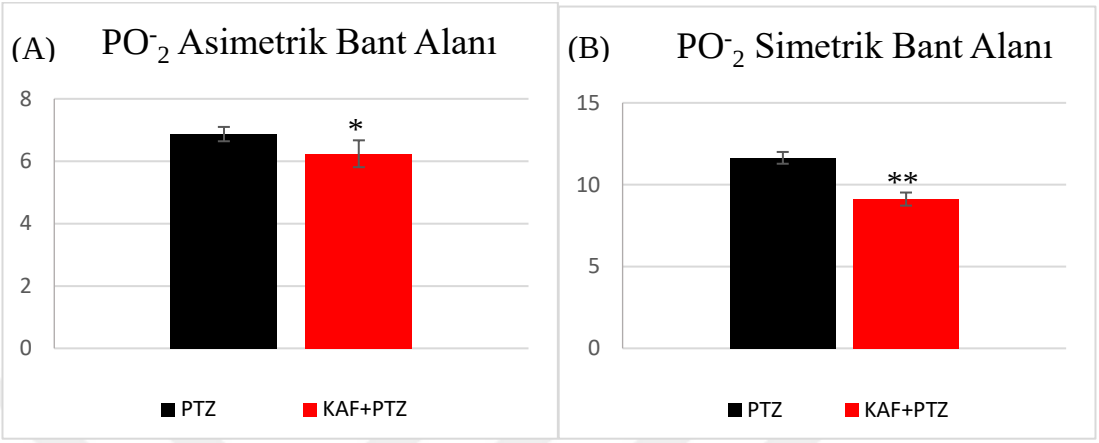
Şekil 3.2.'de 8 numara ile gösterilen bant COO^- bandıdır. Yağ asitlerinin COO^- simetrik gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır (Jaskova ve diğ., 2014;Cakmak ve diğ., 2005). Şekil 3.11'de görüldüğü üzere KAF+PTZ grubunun bant alanı PTZ grubunun bant alanına göre azalma ($p<0,001$**) bulundu.



Şekil 3.11. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait COO^- simetrik bant alan değerleri

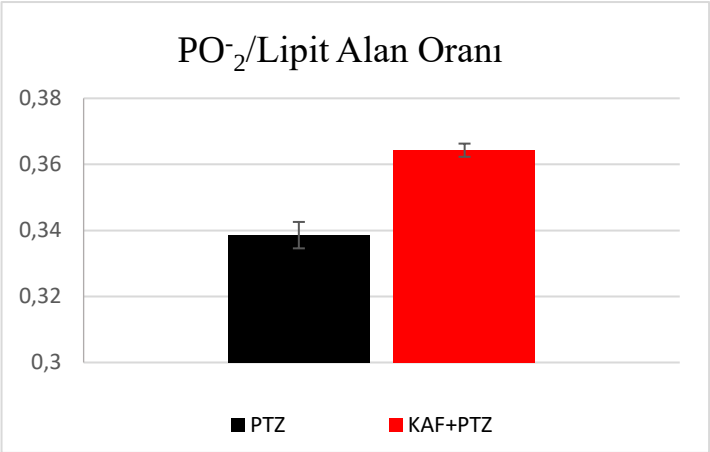
Şekil 3.2'de 10 numarayla gösterilen 1236 cm^{-1}' de bulunan PO^-_2 asimetrik ve 1080 cm^{-1}' de bulunan ve 11 numarayla gösterilen PO^-_2 simetrik bantları, fosfolipitlerin ve nükleik asitlerin fosfodiester gruplarından kaynaklanır (Shivanor ve David., 2015; Walsh ve diğ., 2008). Şekil 3.12 (A) ve Şekil 3.12 (B) de görüldüğü üzere PTZ ve

KAF + PTZ gruplarının PO^{-}_{2} simetrik ve PO^{-}_{2} asimetrik ($p<0,05$*) bant alan değerleri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda KAF+PTZ grubunda ($p<0,001$) azalma saptandı.



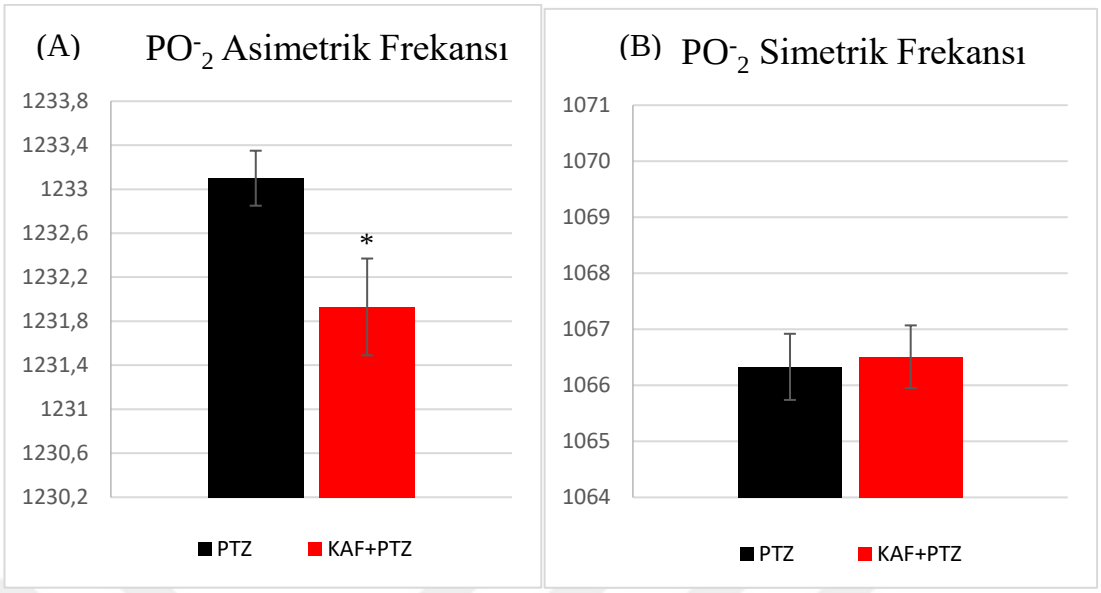
Şekil 3.12. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait PO^{-}_{2} Asimetrik(A) ve PO^{-}_{2} Simetrik (B) bant alanı değerleri

PTZ ve KAF+PTZ gruplarının PO^{-}_{2}/lipit alan oranları Şekil 3.13'de gösterildi. KAF+PTZ grubunun PO^{-}_{2}/lipit oranında artış saptandı ancak bu artış istatiksel olarak anlamlı değildi.



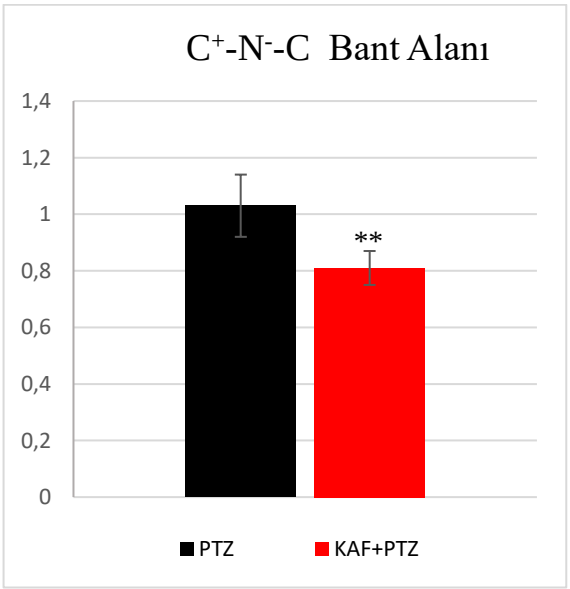
Şekil 3.13. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait PO^{-}_{2}/lipit alan oran değerleri

Şekil 3.14'de grupların PO^{-}_{2} asimetrik ve PO^{-}_{2} simetrik bant frekans değerleri gösterilmektedir. KAF + PTZ grubunda PO^{-}_{2} asimetrik bant frekans değerinde yüksek ($p<0,001$**) değerlere kaymalar görülürken PO^{-}_{2} simetrik frekans değerinde düşük ($p<0,05$*) değerlere kaymalar gözlemlendi.



Şekil 3.14. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait PO^{-}_{2} Asimetrik(A) ve PO^{-}_{2} Simetrik (B) frekans değerleri

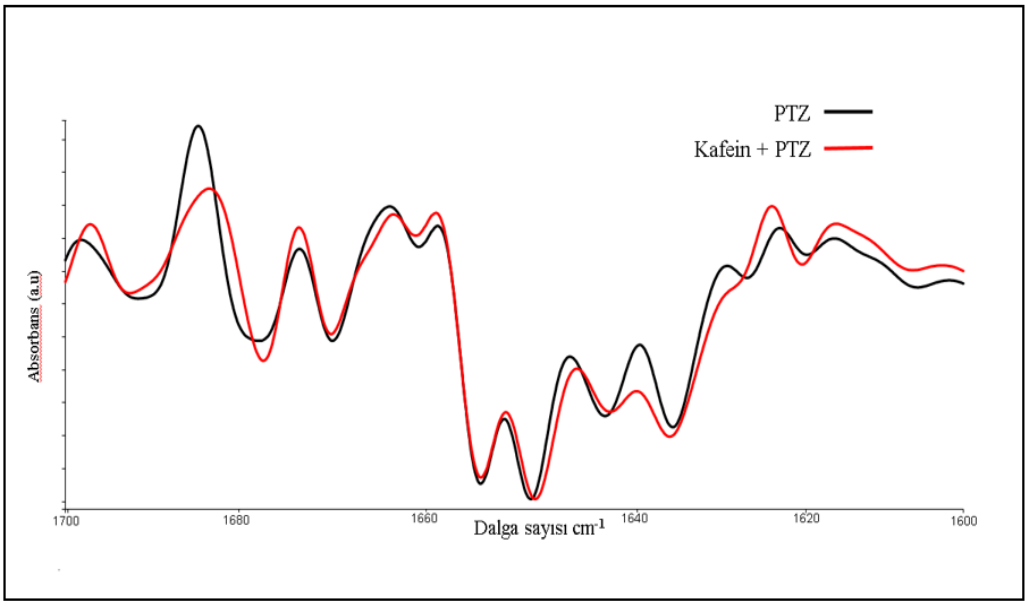
970 cm^{-1}' de bulunan ve Şekil 3.2 de 12 numarayla gösterilen C^{+}-N^{-}-C bandı fosforile proteinlerin ve hücresel nükleik asitlerin fosfat monoester gruplarından kaynaklanmaktadır (Staniszewska ve diğ., 2014; Movasaghi ve diğ., 2008). Şekil 3.15 de görüldüğü üzere PTZ grubu ile KAF+PTZ grubunun C^{+}-N^{-}-C bant alanları karşılaştırıldı. KAF+ PTZ grubunun bant alanında PTZ grubuna göre azalma ($p<0,001$**) tespit edildi.



Şekil 3.15. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait C+-N--C bant alan değerleri

3.1.1.Protein ikincil yapı değerlendirmesi

Amid I bandının tepe maksimumu (1700-1600 cm^{-1}), proteinlerde bulunan çeşitli ikincil yapı tiplerinden dolayı farklı frekanslarda meydana gelir (López ve diğ., 2001). Bu nedenle, PTZ ve KAF+PTZ grupları için absorbans spektrumlarının ikinci türevi alınarak amid I bandının analizinde bazı pikler tespit edildi (Şekil 3.16). Bu bandın karakteristik bileşenlerinin yoğunluklarındaki değişiklikler Ek-B'de verilmiştir. 1682 cm^{-1}' deki bant beta dönüş, 1652 cm^{-1}'deki alfa heliks, 1643 cm^{-1}'deki düzensiz rasgele katlanmalar, ve 1633 cm^{-1}'deki bant beta plakalı yapılarına karşılık gelir (Turker-Kaya ve diğ., 2020). Şekilden görüldügü üzere PTZ ve KAF+PTZ grubu arasında protein ikincil yapılarında bir değişim söz konusudur fakat bu değişiklik anlamlı değildir.



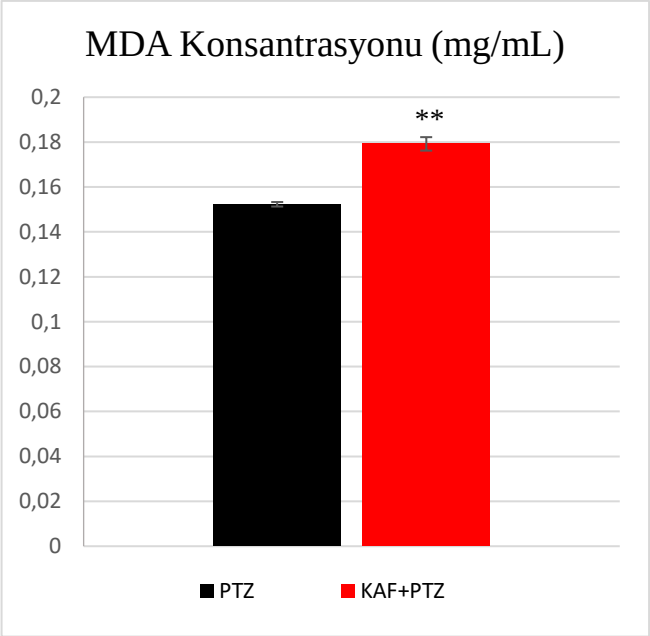
Şekil 3.16. 1700-1600 cm-1'de PTZ ve KAF+PTZ grupları için amid I bandının ikinci türev spektrumları

3.2.Biyokimyasal Testler

FT-IR çalışmasına ek olarak incelenen örneklerde lipit peroksidasyonu belirlenmesi için TBARs, protein miktar tayini için Bradford testleri uygulandı.

3.2.1.TBARs testi

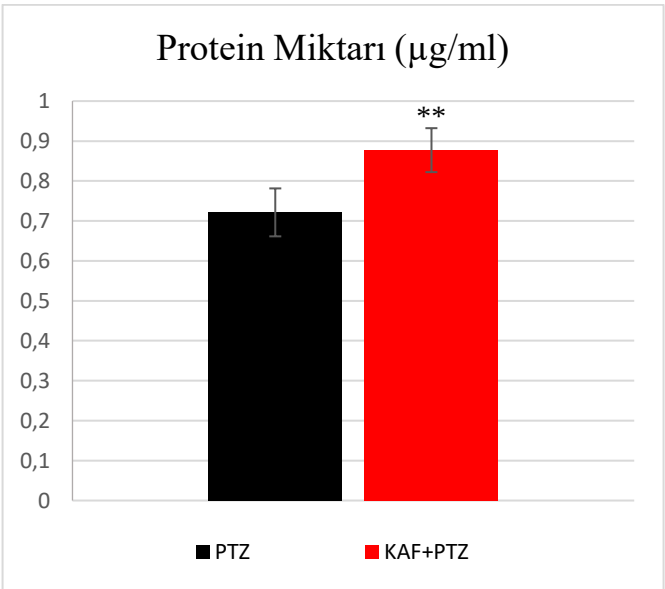
Şekil 3.17'de görüldüğü üzere KAF+PTZ grubu ile PTZ grubunun MDA seviyesi karşılaştırıldı. KAF+PTZ grubunun MDA seviyesi PTZ grubuna göre yüksek ($p<0,001$) değerde görüldü.



Şekil 3.16. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait MDA konsantrasyon değerleri

3.2.2.Bradford testi

KAF+PTZ grubu ile PTZ grubunun protein miktarları karşılaştırıldı ve Şekil 3.18'de gösterildi. Bu karşılaştırma sonucunda KAF+PTZ grubunun protein miktarının PTZ grubuna göre arttığı saptandı.



Şekil 3.17. PTZ ve KAF+PTZ gruplarına ait protein miktarları

4.TARTIŞMA

Adenosin nöromodülasyonu beyin uyarılabilirliğinin düzenlenmesi ile yakından ilişkili olduğundan, yeni doğanlarda kafein tedavisine bağlı olarak adenosin antogonizması epileptik nöbetleri tetikleyen ya da engelleyen geçici veya kalıcı fizyolojik değişikliklere neden olabilir (Esmaili ve Heydari, 2019; Endesfelder ve diğ., 2019; Souza ve diğ., 2013; Tchekalarova ve diğ., 2014). Bu değişimler, kafein tedavisinde uygulanan doz, uygulandığı yaş, prokonvülsan ve uygulama yöntemi (akut ya da kronik) ile ilgili olması sebebiyle literatürdeki çalışmaların sonuçlarında farklılıkları da beraberinde getirmektedir. Örneğin, Tchekalarova ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları bir çalışmada P7–P11'da (doğum sonrası 7. ve 11.gün) kafein (10 ve/veya 20 mg/kg) uygulamasını takiben 60.günde art arda iki doz PTZ (20+20 mg/kg) ile tetiklenen nöbetlerde daha düşük kafein dozunun minimal klonik nöbetleri şiddetlendirdiği görüldü (Tchekalarova ve diğ., 2013). Başka bir çalışmada ise P2-P6'da sıçanlara kafein (15-20 mg/kg) uygulanmasının ardından PTZ, bisukulin, pikrotoksin, striknin, kainik asit ile epileptik nöbetler indüklendi. Kafeinin, PTZ, pikrotoksin ve kainik asitin, indüklediği nöbetlerin eşiğini arttırdığı görülürken striknin ve bisukulinin epileptik nöbetlerde eşiği değiştirmediği rapor edildi (Guillet ve Dunham, 1995). Sıçanlarda P7-P11'de uygulanan kafein sonrası 12. ve 25. günlerde aminofilin ve pikrotoksin ile nöbet indüklenen bir çalışmada ise 25 günlük sıçanların 12 günlük sıçanlara göre konvülsanlardan daha az etkilendiği tespit edildi (Tchekalarova ve diğ., 2007). Literatürde birçok çalışma akut kafein maruziyetinin nöbet duyarlılığını arttırdığını göstermektedir (Germé ve diğ., 2015; Tchekalarova ve diğ., 2013; Łuszczki ve diğ., 2006; Cutrufo ve diğ., 1992). Sonuç olarak her ne kadar kafeinin epileptik nöbetler üzerindeki farklı etkileri rapor edilmiş olsa da epileptik nöbetleri etkileyen moleküler mekanizmanın altında yatan sebepler açık değildir. Daha önce yapılan çalışmalarda PTZ ile indüklenen epileptik nöbetlerin değişik dokulardaki biyofiziksel parametrelerde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir (Türker-Kaya ve Ilbay, 2020; Yıldırım, 2019; Türker ve diğ., 2014a; Türker ve diğ., 2014b;). Konuya katkı sağlamak amacıyla bu tez çalışması kapsamında P7-P11'de sıçanlara uygulanan kafeinin yetişkinlik döneminde 80 mg/kg PTZ tetiklemesi ile oluşan nöbetlerin hipokampus bölgesindeki biyofiziksel etkileri ATR-FTIR spektroskopisiyle incelendi. Ayrıca TBARs ve Bradford biyokimyasal testleri de çalışmaya dahil edildi. Çalışmamız, literatürde neonatal dönemde uygulanan kafeinin yetişkinlikte epileptik

nöbetler üzerinde neden olduğu etkileri inceleyen diğer çalışmalardan biyofiziksel parametreleri araştırması sebebiyle farklılık arz etmektedir. Sonuçlarımıza göre incelenen parametrelerde neonatal dönemde uygulanan kafeinin, nöbet geçiren wistar sıçanların hipokampusunde anlamlı değişikliklere sebep olduğu görüldü.

Neonatal sıçanlarda doğum sonrası P7-P11.günlerde merkezi sinir sisteminin gelişim seviyesi, premature insan bebeklerinde 36-40.haftalara karşılık gelmektedir (Kumar ve Lipshultz, 2019; Semple ve diğ., 2013). Kafein doğum sonrası 7-11. günlerde kronik şekilde uygulandığında prematüre insan bebeklerine uygulanımı taklit edilmiş olur. Bu dönemde beyin büyümesinde, gliojenezde, aksonal ve dentritik bağlantıların sayısında artış görülür (Semple ve diğ., 2013; Bockhorst ve diğ., 2008). Ayrıca kafeinin antagonizm gösterdiği adenozin reseptörleri de yine aynı dönemlerde zirve sayısına ulaşır (Kumar ve Lipshultz, 2019). Bu nedenle bu dönem kafeinin uzun vadeli etkilerini görmek için kritiktir.

Çalışmada kullanılan ATR-FTIR spektroskopisi, biyomoleküllerin bileşimini, yapısını ve işlevini araştırmak, herhangi bir patolojik durumun neden olduğu biyofiziksel parametrelerdeki değişiklikleri saptamak için kullanılan bir tekniktir (Alugoju ve diğ., 2019; Liyanage ve diğ., 2018; Kucuk Baloglu ve diğ., 2017). Bu tekniğin, epilepsi ve epilepsi durumlarında uygulanan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Kumar ve arkadaşları (2010), FT-IR tekniğini ile epilepsi hastalarının IgG örneklerinde patolojik değişiklikleri rapor etmişlerdir (Kumar ve diğ., 2010). Türker ve arkadaşları PTZ kaynaklı ve odyojenik olarak duyarlı epileptik nöbetlerin tüm sıçan beynindeki (2014a) ve beyin doku membranlarındaki (2014b) etkilerini FT-IR spektroskopisi ile araştırmıştır Ayrıca, Chwiej ve arkadaşları (2015), SR-FTIR tekniğini kullanarak ketojenik bir diyetten sonra nöbet geçirmiş sıçanlarda hipokampal formasyonda değişiklikler olduğunu rapor etti (Chwiej ve diğ., 2015).

Beyin, yağ dokusundan sonra vücuttaki en yüksek lipit içeriğine sahip organdır (Kao ve diğ., 2020; Bhatt ve diğ., 2020; Singh ve diğ., 2019). Beyinde bulunan lipitler sfingolipidler, gliserofosfolipidler ve kolesteroldur (Hussain ve diğ., 2019; Adibhatla ve Hatcher, 2007). Bu bileşenlerin nispi oranları hücre tipine ve membran tipine bağlı olarak farklılıklar gösterir (Müller ve diğ., 2015; Gallala ve diğ., 2011; Van Meer ve diğ., 2008). Sinir sisteminin fonksiyonel aktivitelerinin geliştirilmesinden ve

sürdürülmesinden sorumlu tüm hayati olaylar, nöronal hücrelerin bu benzersiz lipit içeriğine bağlıdır (Hussain ve diğ., 2019). Bir başka deyişle, bir nöronun elektriksel uyarılar üretmesi ve reseptör-membran etkileşimlerini sürdürmesi için membran yapısının çok önemli olduğu göz önüne alındığında; membran yağ asitlerinin fiziksel özelliklerinin aracılık ettiği membran yapısındaki herhangi bir değişiklik, lipidlerin polar kafa grupları ve membran bileşenlerinin içeriği, membran kalınlığını, lipid paketlenmesini değiştirir. Bu durum, lipit düzenini ve akışkanlığı etkiler (Mantegazza ve diğ., 2010). Söz konusu durum göz önünde bulundurulduğunda epilepsi gibi MSS hastalıklarında meydana geldiği görülen bozulmuş lipit metabolizması ile bağlantılıdır (Hussain ve diğ., 2019; Schmitt ve diğ., 2014). Beyin dokusu lipit profilinin değişimine katkıda bulunan en büyük etkenlerden biri de oksidatif stresdir (Almeida ve diğ., 2012; Al-Rawi, 2011; Gordon ve diğ., 2008). Oksidatif stres, antioksidanların etkisiyle önlenemeyen aşırı reaktif oksijenli türlerin üretimi olarak ve aynı zamanda hücre redoks dengesinin bozulması olarak tanımlanır (Elmasry ve diğ., 2015; Pisoschi ve Pop, 2015). Serbest radikaller, membran lipidlerinin peroksidasyonu, proteinlerin inaktivasyonu, polisakkaritlerin depolimerizasyonu ve nükleik asitlerin hasarı yoluyla etkilerini gösterir (Zhong ve diğ., 2019; Gaschler ve Stockwell, 2017; Guo ve diğ., 2017; Mseddi ve diğ., 2015). Lipid peroksidasyonu genel olarak, karbon-karbon çift bağ içeren lipitlere, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerine saldırdığı bir süreç olarak tanımlanabilir (Ayala ve diğ., 2014). Beyin dokusu, yüksek oksidatif metabolik aktivite oranı, yüksek oranda doymamış yağ asitleri, metaller (örneğin demir) ve düşük koruyucu antioksidan enzimler nedeniyle serbest radikallere karşı oldukça savunmasızdır (Cakmak ve diğ., 2012). Membran lipidlerinin peroksidasyonunun, lipid çift tabakalarının fiziksel özelliklerini önemli ölçüde değiştirdiği bilinmektedir (Gaschler ve Stockwell, 2017; Su ve diğ., 2019). Oksidatif stres ve mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu epilepsi nöbetleri ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmektedir (Kovac ve diğ., 2017; Pearson-Smith ve Patel, 2017). Genel olarak anormal nöronal uyarılabilirlik ile karakterize olan epilepside tipik olarak inhibe edici GABA ve uyarıcı glutamat nörotransmisyon arasındaki dengede glutamat lehine bir kayma görülür (Barker-Haliski ve Steve White, 2015; German Sierra-Paredes ve German Sierra-Marcuno, 2008). Dolayısıyla ROS, GABA ve glutamat dengesini bozan epilepsi için hem bir sebep ve hem de sonuç olabilir (Maati, 2009; Patel, 2004). ROS üretimi, glutamin sentazın doğrudan inaktivasyonu yoluyla nöbet

aktivitesini tetikleyebilir ve böylece bir uyarıcı nörotransmiter olan glutamik asidin anormal birikmesine neden olur (Kutluhan ve diğ., 2009). Hayvanlarda oksijenle indüklenen konvülsiyonların başlangıcı, ROS tarafından enzim glutamat dekarboksilazın inhibisyonu nedeniyle nörotransmiter GABA'nın serebral içeriğindeki azalma ile ilişkilidir (Patel, 2004). Bu nedenle, epileptik nöbetlerin indüksiyonundan ROS'un sorumlu olabileceği görülmektedir. Bu sebeple çalışmamızda neonatalde uygulanan kafeinin, yetişkinlik döneminde PTZ uygulanan dokularda gerçekleşen lipit peroksidasyonuna etkisini tespit etmek önem arz etmektedir. FT-IR spektroskopisi oksidasyon sırasında değişen belirli absorpsiyon bantlarını izleme kabiliyetine sahip, basit ve hızlı bir yöntemdir (Rohman ve Che Man, 2013; Severcan ve diğ., 2005). Olefinik = CH bandının absorpsiyonu / alanı, doymamış lipidlerin yapısında çift bağların nispi miktarının bir indeksi olarak kullanılabilir (Türker ve diğ., 2014a; Cakmak ve diğ., 2012; Toyran ve diğ., 2006). Lipid peroksidasyonu birincil olarak çoklu doymamış açil zincirlerinin çift bağ bölgelerinde meydana gelir ve olefinik bağların kaybıyla sonuçlanır (Moore ve diğ., 1995; Sills ve diğ., 1994). Biz sonuçlarımızda, KAF+PTZ grubunun olefinik bant alanında azalma tespit ettik. Ancak bu çalışmada kullanılan ATR-FTIR spektroskopisi yöntemi, söz konusu azalmanın lipit peroksidasyonunda mı yoksa doymamış lipitlerin sentezindeki azalmadan mı kaynaklandığını ayırt edebilecek kabiliyette değildir (Türker ve diğ., 2014b). Bu sebeple ATR-FTIR sonuçlarına ek olarak TBARs biyokimyasal testi de uygulandı. TBARs testi, uzun yıllardır yaygın olarak kullanılan ve numunede bulunan belirli birincil ve ikincil lipid peroksidasyon ürünlerinin ayrışması yoluyla oluşan son ürünlerden biri olan malondialdehid (MDA) miktarını ölçen biyokimyasal bir testtir (Janero, 1990). TBARs testinin sonuçlarından da (Şekil 3.17) görüldüğü üzere KAF+PTZ grubundaki MDA artışı literatürde yapılmış çalışmalardan (Bagheri ve diğ., 2019; Abdel-Salam ve diğ., 2018) da bilindiği üzere PTZ'nin lipit peroksidasyonunu tetikleyici etkisini kafein uygulamasının, daha da arttırdığını kanıtlar niteliktedir. Bu sonuçla paralel olarak, Onwuka ve Erhabor (2012) kafeinin sıçanların karaciğer ve böbreklerinde ortalama MDA konsantrasyonlarını arttırdığı yani lipit peroksidasyonunu tetikleyici etki gösterdiğini ortaya koydular (Onwuka ve Erhabor., 2012). Öte yandan literatürde birçok çalışma kafeininin oksidatif stresse karşı bir antioksidan olarak görev aldığını rapor etmektedir (Li ve diğ., 2018; Ullah ve diğ., 2015; Leite ve diğ., 2011; Inkielewicz-Stepniak ve Cnowski, 2010; Lv ve diğ., 2010).

Örneğin yenidoğan sıçanlarda hiperoksiye dayalı bir bronkopulmoner displazi modelinde kafeinin pulmoner dokudaki oksidatif stres yanıtı üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlayan bir çalışmada ise kafeinin ROS ortamdan uzaklaştıran güçlü bir antioksidan olarak görev aldığı tespit edildi (Endesfelder ve diğ., 2019). Dolayısıyla kafeinin daha önce de belirtildiği üzere çeşitli etmenlere (doz, uygulandığı yaş, prokonvülsan ve uygulama yöntemi) bağlı olarak değişkenlik gösterebilen etkileri lipit peroksidasyonu durumunda da görüldü. Kafeinin, çalışmamızdaki PTZ'nin lipit peroksidasyonuna neden olan etkisini arttırıcı rolü hipokampusün diğer beyin bölgelerine göre önemli bir biyokimyasal antioksidan olan E vitaminince düşük endojen seviyeleri nedeniyle oksidatif strese özellikle duyarlı olmasından kaynaklı olabilir (Santos ve diğ., 2009). Ayrıca kafein beyin gelişiminin başladığı neonatal dönemde uygulandığında GABA'nın hipokampus devrelerine taşınımı gecikir ve bu durumda yetişkinlik döneminde hipokampus nöronlarında GABA içeriğinde bir eksilmeye sebep olabilir (Souza ve diğ., 2013). Bu durum bir GABA ile zıt aktivasyon gösterdiği bilinen PTZ'nin yetişkinlik dönemde uygulandığında nöbetler üzerindeki etkisini daha fazla arttırabilir. İlave olarak, kafeinin NO üretimini modüle edebileceğine dair açık kanıtlar vardır (Kayir ve Uzbay, 2004; López-Muñoz ve diğ., 1996). Örneğin, A1Rs aktivasyonunun sonucu olarak NO üretimi azalırken, A2AR'ların aktivasyonu NO jenerasyonunun yükselmesine yol açar (Esmaili ve Heydari, 2019; Bruce ve diğ., 2002) Dokularda NO artışı, mitokondriyal oksidatif metabolizma ve ATP sentezi için hız belirleyici olduğuna inanılan ve memeli hücreleri ve dokuları tarafından solunan moleküler O_2'nin % 90'ından fazlasını işleyen sitokrom c oksidaz'a bağlanmasına ve her zaman enzim aktivitesini inhibe olmasına neden olur. Bu durum mitokondride oksidatif fosforilasyon akışının bozulması ile sonuçlanır (Srinivasan ve Avadhani, 2012). Epileptik aktivite sırasında artan enerji kullanımı ile birlikte oksitatif fosforilasyonun inhibisyonu, hücrenin enerji seviyesini koruma yeteneğini kesintiye uğratır ve mitokondriyal hasara neden olur (Waldbaum ve Patel, 2010). Lipit yapısında meydana gelen lipit peroksidasyonundan kaynaklı değişiklikler, lipit membranların yapısı ve dinamikleri üzerinde, su geçirgenliğinin artması, çift katman kalınlığının azalması veya lipit membran düzeninde ve akışkanlığında değişiklikler gibi önemli etkilere sebep olabilir (Van Der Paal ve diğ., 2016; Jurkiewicz ve diğ., 2012) ve membran lipitleri ve proteinler arasındaki ikili ilişkiden dolayı, lipitlerin fiziksel özellikleri, membrana bağlı enzimler, iyon kanalları, aşırı,

anormal ve senkronize sinir hücresi aktivitesinde yer alan reseptörler gibi çeşitli tipte membran proteinlerinin aktivitesini etkileyebilir (Avanzini ve Franceschetti, 2003; Kinnunen, 2000). Bu nedenle, bu etkiler, bir nöbet bölümü için önemli olduğu gibi aynı zamanda hücresel ve hücre altı yapılarda istikrarsızlığı da temsil eder (Türker ve diğ., 2014b; Acharya ve Katyare, 2006; Patel, 2004). Bahsedilen konuyla ilgili olarak neonatal dönemde uygulanan kafeinin membran yapısında sebep olduğu değişiklikleri daha ayrıntılı analiz etmek için proteinlerden ve lipitlerinin farklı bölgelerinden kaynaklı olan, CH_2 asimetrik, CH_2 simetrik, C=O, COO^- simetrik, amid I, amid II, PO^-_2 asimetrik ve PO^-_2 simetrik gerilme bantları da incelendi.

Membranın düzgün işleyişinin büyük ölçüde yapısıyla ilintili olduğu bildirilmiştir (Cooper GM, 2000). Membran yapısına tamamen yağ asitlerinin fiziksel özellikleri, lipid membran proteinlerinin polar baş grupları, ayrıca lipid düzeni, lipid akışkanlığı ve membran bileşenlerinin içeriği aracılık eder. Beyin dokusu fonksiyonları düşünüldüğünde, epileptik durumların oluşumunun anlaşılmasında beyin dokusularında nöbetle uyarılan değişikliklerin tespit edilmesi önemlidir (Türker ve diğ., 2014a). Elde edilen verilere göre CH_2 asimetrik ve CH_2 simetrik bant alan değerlerinin PTZ grubuna kıyasla KAF+PTZ grubunda daha düşük değerlere kayması doymuş lipitlerin miktarında bir azalmaya işarettir (Kepenek ve diğ., 2019; Simsek Ozek ve diğ., 2010). Lipit içeriğindeki azalma, hipokampus dokusunda lipolizde bir artışa bağlı olabilir (Simsek Ozek ve diğ., 2010). Literatürde kafeinin lipolitik aktiviteyi arttırıcı etki gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Acheson ve diğ., 2004). Bunun yanında doymuş lipid miktarındaki azalmaya, lipid biyosentezindeki azalma veya lipid peroksidasyonu yoluyla degradasyon da neden olabilir (Kepenek ve diğ., 2019; Simsek Ozek ve diğ., 2014). Normal koşullarda serbest radikallerin doymamış lipitlere saldırmasından sonra doymuş lipit konsantrasyonunda bir artış beklenir ancak verilerimiz doymuş yağların konsantrasyonundaki azalma daha kısa zincirli yağ asitlerinin varlığını göstermektedir (Türker-Kaya ve diğ., 2018). Bu durum lipit peroksidasyonu esnasında ROS'un aşırı artan yıkıcı etkisi nedeni ile gerçekleşebilir. Ayrıca çalışma kapsamında sistemin doymamışlık seviyesini ölçmek için olefinik = CH/lipid oranı hesaplandı. PTZ uygulanan gruba kıyasla KAF+PTZ uygulanan grupta olefinik =CH/lipid oranında azalma görüldü ancak bu azalma

anlamlı değildi. Bu durumun sebebi doymamış lipitlerin miktarındaki azalmayla beraber doymuş lipitlerde de bir azalma gözlenmesinden kaynaklı olabilir.

Frekanslar ve bant genişlikleri gibi spektral parametreler, membran lipid moleküllerinin yapısal ve dinamik özelliklerine duyarlıdır (Türker ve diğ., 2011; Akkas ve diğ., 2007). CH_2 gerilme titreşimlerinin frekanslarındaki değişimler, açil zinciri esnekliğindeki değişikliklerin (lipitlerin düzen / bozukluk durumu) saptanması için belirteç olarak kullanılabilir (Türker ve diğ., 2014a; Simsek Ozek ve diğ., 2010). CH_2 asimetrik ve CH_2 simetrik gerilme bant frekansında yüksek değerlere kayma, sistemdeki gauche konformerlerin sayısının arttığının belirtisidir (Sariisik ve diğ., 2019). Bu bantların frekansı ne kadar yüksekse, acil zinciri esnekliği de o kadar yüksektir, bu nedenle sistemdeki lipid düzensizlik durumu da artar (Kardas ve diğ., 2014). Sonuçlarımıza göre PTZ grubuna kıyasla KAF + PTZ grubunun CH_2 simetrik ve CH_2 asimetrik bant frekans değerlerinin arttığı saptandı. Genel olarak, tüm lipidler için açil zincirlerinin düzen parametresi, lipit peroksidasyonundaki artışla beraber azalır (Wong-Ekkabut ve diğ., 2007). Hem hücre hem de mitokondrial membranların lipit açil zincirleri arasında çapraz bağlanmaya yol açan lipid peroksidasyonu dahil olmak üzere aşırı katabolik aktiviteler, düzende gözlenen azalmaya katkıda bulunabilir (Kneipp ve diğ., 2000). Membranda değişmiş protein bileşiminin, lipid-protein etkileşimleri yoluyla membran düzenini değiştirebileceği düşünülebilir. Membran protein bileşimindeki değişiklikler ve/veya nispi protein miktarındaki bir artış, membran düzen durumunun azalmasına yol açabilir. Membran fosfolipidlerinin fiziksel durumundaki farklılıklar, membran proteinlerinin hidrofobik ve hidrofilik kalıntıları ile etkileşimlerini daha da etkileyebilir (Türker ve diğ., 2014a). Bu durum, hücre membranındaki proteinlerin işlevini bozabilir (Türker-Kaya ve diğ., 2018).

Membranlar, yüzeyde her yöne hareket edebilen molekülleri içeren dinamik akışkan yapılardır (Miana-Mena ve diğ., 2011). Membran akışkanlığı/dinamiği, hücresel membranları karakterize eden başlıca biyofiziksel özelliklerden biridir (Noutsi ve diğ., 2016). CH_2 simetrik ($2852 cm^{-1}$) ve CH_2 asimetrik ($2925\ cm^{-1}$) gerilme bantların bant genişlik değerleri sistemin akışkanlığı hakkında bilgi verir (Sevinc ve diğ., 2015; Türker ve diğ., 2014a;b). Verilerimize göre PTZ grubu ile bant genişlik değerleri karşılaştırıldığında KAF+PTZ grubunda azalma lipit akışkanlığının azaldığını gösterir (Alugoju ve diğ., 2019; Simsek Ozek ve diğ., 2014). Daha önce yapılan birçok

çalışmada PTZ ile indüklenen nöbetlerin etkisiyle biyolojik membranlarda lipit akışkanlığını azaldığı gösterildi (Türker ve diğ., 2014a;b). Bu literatür bilgisine göre, neonatal dönemde uygulanan kafeinin PTZ kaynaklı epileptik nöbetlerin lipit akışkanlığını azaltıcı etkisini daha fazla arttırdığı yorumu yapılabilir. Literatürde kafeinin biyolojik membranların dinamik yapısına etkilerini incelemek adına yapılmış çok az çalışma vardır. Örneğin Khontker ve arkadaşları (2017) kafeinin, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolinden yapılmış doymamış lipid membranlarla etkileşimini incelediği çalışmada, kafeinin membran akışkanlığında azalmaya sebep olduğunu bildirmiştir (Khondker ve diğ., 2017). Lipit akışkanlığının azalmasının olası sebeplerinden biri lipit peroksidasyonudur (Wong-Ekkabut ve diğ., 2007). Membranlarda lipid peroksidasyonunun bir sonucu olarak azalmış membran akışkanlığı ortaya çıkabilir ve bu çalışmalar, lipid peroksidasyonunun, zararlı yan ürünlerin etkileri yoluyla membran akışkanlığı kaybına katkıda bulunabilir (Aleskndrany ve Sahin, 2020; Wong-Ekkabut ve diğ., 2007; Chen ve Yu, 1994). Doymamış lipidlerdeki çift bağlar, molekülleri daha da ayırmaya zorlayan ve daha fazla harekete izin veren kıvrımların oluşumuna neden olur. Ancak, bu lipidlerin içeriğindeki azalmalarda hareket özgürlüğünün kaybına neden olmuş olabilir (Türker ve diğ., 2014a). Oksidatif degradasyon ve lipidlerin kırılması, membran geçirgenliğinde ve akışkanlığında değişikliklere yol açarak hücre bütünlüğünü bozabilir ve hücre ölümünü tetikleyebilir (Endesfelder ve diğ., 2019). Membran akışkanlığındaki değişiklikler, hayatta kalma, farklılaşma ve hücre ölüm yollarının aktivitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarının homeostazı için kritik öneme sahiptir (García ve diğ., 2014). Azalan membran akışkanlığı, membrana bağlı enzimlerin, iyon kanallarının ve reseptörlerin aktivite değişikliklerine veya inhibisyonuna yol açar (Ray ve diğ., 1994). Ca^{2+} -ATPase, çeşitli hücre tiplerinde normal hücre içi kalsiyum seviyelerinin korunmasından sorumlu ana aktif kalsiyum taşıma proteinidir. Azalan membran akışkanlığı, kalsiyum metabolizmasındaki anormalliklerle ilişkilendirilmiştir (Lehotsky ve diğ., 1999). Azalmış membran akışkanlığı ile azalmış Ca^{2} -ATPaz aktivitesi arasında bir korelasyon görülebilir. Azalmış Ca^{2} -ATPaz aktivitesi, nörodejeneratif hastalıkların etiyopatogenezinde kesin bir olay olarak bildirilen hücre içi kalsiyum seviyelerinde yükselmeye neden olabilir (Kamboj ve diğ., 2009). Epileptik nöbetlerde hücre içi Ca^{+2}aşırı artışı önemli bir role sahiptir (Naziroğlu, 2015). Fizyolojik koşullar altında, hem kalsiyum iyonları hem de reaktif

oksijen türleri, mitokondriyal yolaklarda sinyal molekülleri olarak hareket eder. Ancak aşırı kalsiyum yüklenmesi mitokondriyal disfonksiyona, oksidatif strese ve hücre hasarına neden olur (Steinlein, 2014). Bu pato-mekanizma, epileptik nöbetlerin oluşumu için özellikle önemli görünmektedir (DeLorenzo ve diğ., 2005). Membran akışkanlığındaki farklılık, kan beyin bariyeri (KBB)'de glikoz taşıcıyıcı enzimlerin disfonksiyonuna neden olabilir. Sonuç olarak, beyin kan akışı metabolik talebi karşılayamaz, bu nedenle beyinde enerji iletim bozuklukları gerçekleşir. KBB'de beyin enerji düzeyi ve fonksiyonları ile ilgili patolojilerin, epileptik nöbetleri ve yapısal hasarı uyardığı öne sürülmüştür (Türker ve diğ., 2014b). Özetle, membran akışkanlığındaki küçük değişiklikler bile anormal hücresel fonksiyona neden olabilir ve patolojik süreçleri indükleyebilir (García ve diğ., 2014).

Beyin, tüm vücudun kolesterolünün yaklaşık % 25'ini içerir ve kolesterol bakımından zengin bir organ olarak kabul edilir (Jin ve diğ., 2019; Zhang ve Liu, 2015). Kolesterol, memeli hücre membranının en önemli bileşeni ve temel işlevsel birimidir (Hussain ve diğ., 2019). Beyindeki kolesterol esas olarak nöronal, miyelin ve glial hücrelerin membranlarında bulunur (Demir ve diğ., 2015). Kolesterol, biyolojik dokularda membranın hem akışkanlığını hem de geçirgenliğini düzenler (Schmitt ve diğ., 2015). 1750 cm^{-1} de bulunan C=O modu, trigliseridler, kolesterol esterler ve fosfolipidlerden kaynaklanmaktadır. (Liyanage ve diğ., 2018; Türker ve diğ., 2014b). Beyin hemen hemen hiç trigliserid içermediğinden ve çalışmamız kapsamında incelenen biyolojik doku bir beyin bölgesi olduğu için C=O bandına katkıları değerlendirilmemiştir. Normal nöronal fonksiyon ve morfoloji için yeterli kolesterol mevcudiyeti gereklidir, nöronal hücrelerin fonksiyonu sadece kolesterol eksikliği nedeniyle değil, aynı zamanda fazla kolesterol nedeniyle de bozulmaktadır (Deng ve diğ., 2005; Pooler ve diğ., 2006; Ko ve diğ., 2005). İnsanlarda ve kemirgenlerde kolesterol, doğumdan sonraki ilk birkaç hafta boyunca MSS'de aktif olarak sentezlenir ve bu neonatal aşamada, sentezindeki herhangi bir bozukluk, nörodejeneratif bozuklukların gelişmesine yol açabilir (Hussain ve diğ., 2019). Gebelik ve emzirme döneminde sıçanların düşük dozlarda kafeine maruz kalmasının, beyin bölgelerinde kolesterol içeriği ve doymuş yağ asitlerinde cinsiyete özgü farklı değişiklikleri tetikleyebilir (Tchekalarova ve diğ., 2014). KAF+PTZ grubunda C=O bant alan değerlerinin artması lipit peroksidasyonu kaynaklı olabilir. Lipid peroksidasyonunun beyin

membranında kolesterol birikimine neden olduğu ve MDA gibi lipid peroksidasyon son ürünlerinin varlığının, C=O modunun artan bir bant alanına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Türker-kaya ve diğ., 2018; Demir ve diğ., 2015). Çalışmamızda C=O gerilme / toplam lipid bant alanı oranından elde edilen KAF+PTZ grubunda kolesterol ester seviyesinde gözlemlenen artış, lipit içeriğindeki azalmayla beraber kolesterol miktarının arttığını kanıtlar niteliktedir. Daha önce yapılan birçok çalışmada kolesterol miktarında artışın membranda akışkanlığı azalmayla sonuçlandığı bildirilmiştir (Fernández-Pérez ve diğ., 2018). Bu literatür bilgisine göre C=O bant alanındaki artış, daha önce de belirtilen lipit akışkanlığındaki azalmayla uyumludur.

1406 cm^{-1}'deki absorpsiyon bandı, beyin dokularındaki yağ asitlerinin COO^{-} simetrik gerilmesine atanmaktadır (Türker-kaya ve diğ., 2018; Sivakumar ve diğ., 2014; Sivakumar ve diğ., 2012). KAF+PTZ grubunda COO^{-} simetrik bandındaki azalma, CH_2 simetrik ve asimetrik bant alanlarından elde edinilen doymuş yağ asitlerindeki azalma bilgisi ve olefinik bandının alanındaki azalmayla görülen doymamış yağ asitlerinin konsantrasyonlarındaki azalmayı destekler niteliktedir.

Lipidler, proteinlerinin işlevini ve yüzeyi ile etkileşime giren çok sayıda proteini doğrudan etkiler ve modüle eder (Lee, 2003). Böylece lipitler, tüm membran proteinlerinin katlanmasını ve organizasyonunu yönetir (Muller ve diğ., 2019). Bu nedenle, epileptik nöbetlerden kaynaklanan proteinlerdeki yapısal değişiklikler lipit organizasyonunu ve muhtemelen membran dinamiklerini değiştirerek etkiler (Türker ve diğ., 2014a). FT-IR spektroskopisi, proteinlerin, peptitlerin ve protein-membran etkileşimlerinin yapısal karakterizasyonu için ana tekniklerinden biri haline gelmiştir. Yöntem, atomik çözünürlüklü moleküler yapıyı kesin olarak sağlama kapasitesine sahip olmasa da, proteinlerde fonksiyonel geçişler veya moleküller arası etkileşimlerde meydana gelen konformasyonel değişikliklere son derece duyarlıdır (Tatulian, 2019). ATR-FTIR spektroskopisinden elde ettiğimiz sonuçlarda, KAF+PTZ grubunda Amid I ve Amid II bant alanlarındaki artış hipokampus dokusunda protein sentezinin artmasına (Elibol-Can ve diğ., 2011) ya da proteinlerde konformasyonel değişiklikler olmasına bağlanabilir (Türker ve diğ., 2014b; Cakmak ve diğ., 2006). Amid I ve Amid II bantlarındaki bu değişikliği biyokimyasal olarak da desteklemek amacı ile çalışmamıza dahil ettiğimiz Bradford testinden elde edilen veriler de ATR-FTİR sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Proteinlerdeki konformasyonel değişiklikler

literatürde lipit peroksidasyonu ile bağdaştırılmaktadır (Ghosh ve Shcherbik, 2020; Porter ve Mehl, 2018). Dokularda gerçekleşen oksidatif stressle beraber biriken serbest radikallerin doymuş ve doymamış lipitlere saldırmasının yanında protein içeriğini bozma konusunda da oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Tramutola ve diğ., 2017). Özellikle KAF+PTZ grubunun olefinik bandındaki azalma ve TBARs testinden de elde ettiğimiz sonuçlarda lipit peroksidasyonunun varlığı, KAF+PTZ grubunun Amid I ve amid II deki alan artışının lipit peroksidasyonundan kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Amid I bandı için proteinlerin oksidasyonu, bazı amino asit kalıntılarında ek karbonillerin üretilmesine neden olur ve bu karbonillerin bazıları, aminlere bitişik olarak bulunur (Stadtman, 1990) bu da amid I için absorpsiyonu artıracaktır (Palaniappan ve Pramod, 2011). Serbest radikal etkisine maruz kalan proteinler, değiştirilmiş birincil, ikincil ve üçüncül yapı sergileyebilir, ayrıca kendiliğinden parçalanmaya uğrayabilir ve artan proteoliz duyarlılığı gösterebilir (Türker ve diğ., 2014b; Elibol-Can ve diğ., 2011). Bu nedenle proteinlerin yüksek nöronal aktivite sırasında spontan parçalanmaya girebileceği bildirilmiştir (Waldbaum ve Patel, 2010). Proteinlerdeki konformasyonel değişikler için başka bir açıklama yüksek derecede hücre içi asidoz olabilir. Literatüre göre, yüksek nöronal aktivite, nöronların düşük hücre içi pH'ına yol açan laktat birikimini uyarır. pH'ın düşürülmesi protein yapısında bazı değişikliklere neden olabilir (Siesjö, 1988). Ayrıca, epileptik nöbetler sırasında görüldüğü gibi Ca^{+2} ve K^{+} akımlarındaki değişikliklerden kaynaklanan değişmiş redoks potansiyeli, proteinlerin yapısını değiştirebilir (Siesjö, 1988). Ek olarak, head shok proteinlerinin epilepsi sürecine katılımı daha önce bildirilmiştir (Hu ve diğ., 2019). Bu proteinlerin bozulması yanlış katlanmadan sorumlu olabilir. Örneğin, bu ailenin önemli bir üyesi olan Hsp60, mitokondriyal proteinlerin yanlış katlanmasını içerir. Hsp60'ın işlev bozukluğunun epileptik hipokampusta artmış yanlış katlanmış proteinler ortaya çıkardığı gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2008) Protein ikincil yapısındaki konformal değişiklikler nedeniyle, membrandaki iyon kanalları açık kalabilir ve bu da nöral transdüksiyonu yavaşlatır. Tüm bu değişiklikler esas olarak ROS'un neden olduğu nöral dokudaki oksidatif hasara bağlıdır (Shivanoor ve David, 2016). Yapılan son tıbbi araştırmalarda, normal doku ile karşılaştırıldığında hastalıklı dokunun, protein ikincil yapısında bir değişiklik olduğu gösterilmiştir (Szczerbowska-Boruchowska ve diğ., 2007). Protein yapısındaki değişiklikleri daha iyi tahmin etmek için amid I modu, daha önceki çalışmalarda

yapıldığı gibi daha ayrıntılı analiz edildi (Turker-Kaya ve diğ., 2020; Turker ve diğ., 2014a). Bu amaç ile yapmış olduğumuz ikincil yapı değerlendirmesinde kafein uygulamasının proteinlerin yapılarında değişikliğe neden olduğu fakat bu değişikliğin anlamlı bir değişim olmadığını tespit ettik. Bu sonuç çalışma kapsamında gerçekleştirdiğimiz kafein uygulama dozu ve zamanından kaynaklı olabilir.

Protein ve lipidlerin membranlardaki oranları, membran yapısını ve dinamiklerini etkileyen önemli bir faktördür (Simsek Ozek ve diğ., 2014; Szalontai ve diğ., 2000). Lipit-protein oranındaki ve doymuş-doymamış lipid oranındaki değişikliklerin, membran kalınlığını ve eğriliğini değiştirdiği ve dolayısıyla membran düzenini, akışkanlığını ve iyon kanalı kinetiğini etkilediği gösterilmiştir (Awayda ve diğ., 2004) ATR-FTIR'dan elde edilen verilere göre lipit/protein oranındaki azalma, protein içeriğine kıyasla lipit içeriğinde daha belirgin bir düşüş olduğunu göstermektedir. Ancak lipit – protein oranı sonucu istatiksel olarak anlamlı değildi.

Biyolojik membranlar, genellikle hidrofilik bir fosfat kafasına ve iki yağ asidi zincirinden oluşan hidrofobik bir kuyruğa sahip amfifilik fosfolipitlerden oluşur (Watanabe ve diğ., 2019; Divecha ve Irvine, 1995). Membran proteinleri, fosfolipidlerle, transmembran segmentlerini çevreleyen dairesel bir katman yoluyla veya özgül lipid-protein etkileşimleriyle interaksiyona girer (Muller ve diğ., 2019; Corradi ve diğ., 2018; Haviv ve diğ., 2013). Membran fosfolipidlerinin fiziksel durumundaki varyasyonlar, membran proteinlerinin hidrofobik ve hidrofilik kalıntıları ile etkileşimlerini etkileyebilir (Türker ve diğ., 2014b). Membran bileşenleri arasındaki bu iki taraflı ilişki nedeniyle, lipid molekülleri ve proteinlerin fiziksel özellikleri karşılıklı olarak konformasyonlarını ve dolayısıyla hem model hem de biyolojik membran sistemlerinde gösterildiği gibi aktivitelerini etkileyebilir (Simons ve Sampio., 2011). Değişmiş lipid bileşimi gösteren fosfolipidlerin içeriğindeki düşüş, lipidlerin organizasyonunu ve paketlenmesini etkilemektedir (Marsh 1990; Akkas ve diğerleri 2007; Türker ve diğerleri 2014b). Membran lipidlerinin ara yüz ve baş grubu bölgeleri hakkında bilgi ve dolayısıyla lipidlerin polar kısımlarının hidrasyon durumu, sırasıyla C=O gerilme ve PO^{-}_{2} antisimetrik gerilme bantlarındaki frekans kaymalarından elde edilebilir (Demir ve diğ., 2015; Türker ve diğ., 2011; Akkas ve diğ., 2007). Bu bantların frekans değerindeki kaymalar lipit paketlenmesi hakkında bilgi verir ve bantların frekaslarındaki düşük değerlere kayma ya mevcut hidrojen

bağının güçlendirilmesine ya da çevreleyen su molekülleri ile yeni hidrojen bağının oluşmasına karşılık gelir (Demir ve diğ., 2015; Akkas ve diğ., 2007). Hidrojen bağı, su molekülleri ile fosfolipitlerin hem karbonil hem de fosfat gruplarının oksijen molekülleri arasında olabilir (Akkas ve diğerleri, 2007a). Bu, fosfolipid moleküllerinin paketlenmesinde farklılık yaratabilir (Cakmak ve diğ., 2006). Lipid paketlenmesi kavramı, hücre membranlarının oluşumu ve yapısal dinamikleri üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir (Sakai ve diğ., 2019). ATR-FTIR'dan elde edilen sonuçlar, C=O ve PO^{-}_{2} asimetrik bant frenkslarındaki azalmanın membran arayüzünde ve fosfat kafa gruplarında hidrojen bağlarının arttırdığını gösterdi. Bu durum için neonatal dönemde uygulanan kafeinin, daha önce yapılan çalışmalardan da bilinen PTZ'nin lipit paketlenmesini değiştirici etkisini stimule ettiği yorumu yapılabilir (Demir ve diğ., 2015; Türker ve diğ., 2014a; Türker ve diğ., 2014b). Lipit paketlenmesindeki değişim, serbest radikaller ile proteinleri veya lipidler arasındaki reaksiyondan kaynaklanmış olabilir, bu da bu bileşenleri arasındaki çapraz bağlanmayı artırabilir (Türker ve diğ., 2014b). Fosfolipidlerinin değişmiş bileşimi, sinaptik Mg^{+2} gibi proteinlerinin aktivitesi ve kinetik parametrelerinde değişikliklere neden olur. Nöronal aktivitede önemli bir işlevi olan Ca^{+2}-bağımlı ekto-ATPaz ve esas olarak Ca^{+2} ve Mg^{+2} pompalarının aktivitesindeki azalma, nöbete bağlı nöronal hasarda özel bir rol oynadığından şüphelenilen nöronal enerjide daha fazla azalmaya sebep olur (Türker ve diğ., 2014a). Ayrıca, bu tür bir sonuç, hücre alıcıları olarak görev yapan ve hücre sinyallemesinde işlev gören glikolipidlerin ve glikoproteinlerin işlevleri üzerinde bir etkiye sahip olabilir (Türker-Kaya ve diğ., 2018;Türker ve diğ., 2014a; Saberwall ve Nagaraj 1994). Membran protein yapısında ve aktivitesinde etkili olan membran lipidlerindeki tüm bu değişiklikler, epileptik nöbetlerin oluşmasında temel bir rol oynayabilir (Türker ve diğ., 2014a).

Lipitlerin fosfat kafa gruplarından ve nükleik asitlerin fosfodiester omurgasından kaynaklanan PO^{-}_{2} asimetrik ve simetrik bant alanlarının KAF+PTZ grubunda azalması, 7-11. günlerde kafein uygulamasının fosfolipit ve nükleik asit konsantrasyonlarında bir azalmaya sebep olduğuna işarettir. Fosfolipit miktarındaki bu azalma olefinik ve CH_2 bantlarından da tespit ettiğimiz lipit içeriğindeki azalma ile uyumlu bir sonuçtur. Tchekalarova ve ark. (2014) tarafından beyin gelişiminin başladığı 2-10 günlerde uygulanan kafeinin beyincik ağırlığında ve miyelin içeriğinde

bir azalmaya sebep olabileceği bildirilmiştir (Tchekalarova ve diğ., 2014). Miyelin, aksonun çevresini saran ve onu koruyan bir kılıftır ve fosfolipit içerir (Poitelon ve diğ., 2020; Pandya ve diğ., 2004). Fosfolipit içeriğindeki azalmanın miyelin içeriğindeki bir azalma ile korelasyon gösterebileceği düşünüldüğünde, nöronların ani dalga deşarjlarıyla karakterize epileptik nöbetlerin, sinir hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerini arttırabilir. Drenthen ve arkadaşları (2020) epilepsinin azalmış miyelin içeriği ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (Drenthen ve diğ., 2020). Özetlemek gerekirse PO^{-}_{2} simetrik ve asimetrik bant alanlarının azalması fosfolipit içerdiğinden dolayı miyelin konsantrasyonunda bir azalmayla ilgili olabilir. Bu durumda neonatal dönemde uygulanan kafeinin, PTZ'nin indüklediği epileptik nöbetlerin sinir hücrelerine verdiği zararı daha da arttıracaktır.

Ek olarak çalışmamızda PO^{-}_{2} bantları ile lipit bantlarının alan oranları hesaplandı ve KAF+PTZ grubunda artma görüldü ancak bu artma anlamlı değildi. Bu durumun nedeni lipitlerdeki azalmayla paralel olarak fosfolipitlerin miktarında da bir azalma gerçekleşmesi olabilir.

970 cm^{-1} de bulunan C-N^{+}-C bandı nükleik asitlerin nispi yoğunluğu ile ilgilidir. Bu banttaki azalma nükleik asit içeriğinde bir azalmayı gösterir (Simsek Ozek ve diğ., 2010). Sonuçlarımıza göre KAF+PTZ grubunda nükleik asit içeriğindeki azalma, olefinik bant alan değerinde azalma ve TBARs testi sonuçlarımıza paralel olarak dokuda oksidatif stress varlığından kaynaklı olabilir. Serbest radikaller DNA ile etkileşime girerek ribozdan hidrojen atomlarının eksilmesine veya eklenmesine neden olabilir (Karabulut ve diğ., 2016). Nöbetler ROS üretimini artırır ve çalışmalar, bu durumun hücresel antioksidanları tükettiğini, elektron taşıma zinciri enzimlerinin işlevine müdahale ettiğini ve DNA hasarına neden olduğunu ileri sürmektedir (Pearson-Smith ve Patel, 2017). Özellikle mtDNA hasarı ve mtDNA kopya sayısı azalması, epileptik sıçanlardan alınan hipokampal dokuda da bildirilmiş ve bunun, elektron taşıma zinciri aktivitesinin azalmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Lin ve diğ., 2010; Waldbaum ve Patel, 2010). Zamanla, nöronlar nöbetlere ve bunların katyonik aşırı yüklenme gibi zararlı sonuçlarına karşı daha duyarlı hale gelebilir (Waldbaum ve Patel, 2010). Dolayısıyla kafein uygulamasının epileptik nöbetlerin kaynağı ve sonucu olarak görülen oksidatif stressin etkisini arttırdığı yorumu yapılabilir. Diğer taraftan belirtmek gerekir ki, amid I ve amid II bant alanları

ile Bradford testi sonuçlarına göre protein miktarında kafein uygulaması ile bir artma tespit edildi. Normal şartlar altında protein miktarindaki gözlenen bu artışla birlikte protein sentezinin gerçekleşebileceği varsayılarak nükleik bant alanlarında da bir artma beklenmektedir. Fakat nükleik bantlarinda elde edilen azalma amid I ve amid II bantlarındaki artmanın sebebinin protein sentezinden çok protein ikincil yapılarındaki farklılıkların olabileceği yorumu yapılabilir.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kafein, dünyada yaygın olarak kullanılan bir MSS uyarıcısıdır. Kafeinin MSS uyarıcı etkisi epileptik nöbetlerde bir endojen antikonvülsan olarak önemli rol oynayan adenozinin antogonizması yoluyla gerçekleşir. Dolayısıyla kafeinin epileptik nöbetler üzerinde paradoksal etkileri vardır ve bu etkilerin altında yatan mekanizmalar bilinmemektedir.

Tez çalışmamızda konuya katkı sağlamak amacıyla, neonatal dönemde uygulanan kafeinin erişkin dönemde geçirilen epileptik nöbetlere etkileri biyofiziksel parametreler üzerinden değerlendirildi. Bu bağlamda, biyofiziksel değerlendirmeyi gerçekleştirmek için, sıçanların hipokampus dokularını incelemek amacı ile ATR-FTIR tekniği kullanıldı. ATR-FTIR spektroskopisi sonuçlarını biyokimyasal olarak desteklemek amacı ile Bradford ve TBARs testleri çalışmaya dahil edildi. Çalışmamız, literatürde neonatal dönemde uygulanan kafeinin yetişkinlikte epileptik nöbetler üzerinde neden olduğu etkileri inceleyen diğer çalışmalardan biyofiziksel parametreleri araştırması sebebiyle farklılık arz etmektedir. ATR-FTIR spektroskopisi yöntemiyle elde edilen spektral verilerin analizi sonucunda lipitler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler dahil olmak üzere biyomoleküller hakkında bilgiler elde edildi. Ek olarak Bradford testinden protein miktarı, TBARs testinden lipit peroksidasyonu son ürünü MDA miktarı tayini gerçekleştirildi.

Bulgularımız neonatal dönemde kafein uygulanan hipokampus dokusunun moleküler içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir. Kafein uygulanan grupta lipit düzeninde ve lipit paketlenmesinde farklılıklar gözlendi. Lipit içeriği, membran akışkanlığı kafein uygulanan grupta düşüktü, protein kaynaklı bantların ise kafein uygulanan grupta yüksek olduğu tespit edildi. Tüm bu değişimlere göre neonatal dönemde uygulanan kafeinin erişkinlikte meydana gelen epileptik nöbetlerin hipokampusta oluşturduğu biyofiziksel değişimleri etkilediği yorumu yapılabilir. Bu bağlamda tez çalışmamız, mevcut tedavi yöntemlerinin gözden geçirilmesine ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutabilir.

KAYNAKLAR

Abdel-Hady H., Caffeine Therapy In Preterm Infants, *World Journal of Clinical Pediatrics*, 2015, **4**(4), 81.

Abdel-Salam O.M.E., Sleem A.A., Abd El Baset M., Sayed M., Khadrawy Y.A., Morsy F.A., Cannabis Sativa İncreases Seizure Severity and Brain Lipid Peroxidation In Pentylenetetrazole-Induced Kindling in Rats, *Biomedical and Pharmacology Journal*, 2018, **11**(3), 1187–1197.

Acharya M.M., Katyare S.S., Picrotoxin-İnduced Convulsions Alters Rat Brain Microsomal Membrane Structural Properties, *Neuroscience Letters*, 2006, **394**(1), 9–12.

Acheson K.J., Gremaud G., Meirim I., Montigon F., Krebs Y., Fay L.B., Gay L.J., Schneiter P., Schindler C., Tappy L., Metabolic Effects of Caffeine in Humans: Lipid Oxidation or Futile Cycling?, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, **79**(1), 40–46.

Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Role of Lipids in Brain İnjury and Diseases, *Future Lipidology*, 2007, **2**(4), 403–422.

Aguiar C.C.T., Almeida A.B., Arajo P.V.P., Abreu R.N.D.C., De Chaves E.M.C., Vale O.C., Do Macêdo D.S., Woods D.J., Fonteles M.M.D.F., Vasconcelos S.M.M., Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, (17), 795-259.

Agustin D., Navarro L., Crespo M., Martín M., Oxidative Stress in Epileptogenesis : Febrile Seizures , Chemoconvulsant Pilocarpine , and Electrical Stimulation, *Academic Press*, 2020, 81-94.

Akkas S.B., Inci S., Zorlu F., Severcan F., Melatonin Affects the Order, Dynamics and Hydration of Brain Membrane Lipids, *Journal of Molecular Structure*, 2007, **834,** 207–215.

Akman C.I., Provenzano F., Wang D., Engelstad K., Hinton V., Yu J., Tikofsky R., Ichese M., De Vivo D.C., Topography of Brain Glucose Hypometabolism and Epileptic Network in Glucose Transporter 1 Deficiency, *Epilepsy Research*, 2015, 110, 206–215.

Al-Rawi N.H., Oxidative Stress, Antioxidant Status and Lipid Profile in the Saliva of Type 2 Diabetics, *Diabetes And Vascular Disease Research*, 2011, **8**(1), 22–28.

Alesskndrany A., Sahin I., The Effects of Levothyroxine On The Structure and Dynamics of DPPC Liposome: FTIR and DSC Studies, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembrane*, 2020, **1862**(6), 183-245.

Almeida D.A.T., Braga C.P., Novelli E.L.B., Fernandes A.A.H., Evaluation of

Lipid Profile and Oxidative Stress in STZ-İnduced Rats Treated with Antioxidant, *Human and Animal Health,* 2012, **55**(4), 527–53

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 FTIR Study, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 2019, **220**, 117-128.

Anand K., Dhikav V., Hippocampus İn Health and Disease: An Overview, *Annals of Indian Academy of Neurology*, 2012, **15**(4), 239–246.

Aroniadou-Anderjaska V., Fritsch B., Qashu F., Braga M.F.M., Pathology and Pathophysiology of the Amygdala İn Epileptogenesis and Epilepsy, *Epilepsy Research,* 2008, **78** (2-3), 102–116.

Aronica E., Van Vliet E.A., Mayboroda O.A., Troost D., Lopes Da Silva F.H., Gorter J.A., Upregulation of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype Mglur3 and Mglur5 İn Reactive Astrocytes İn A Rat Model Of Mesial Temporal Lobe Epilepsy, *European Journal Of Neuroscience*, 2000, **12**(7), 2333–2344.

Atik A., Harding R., De Matteo R., Kondos-Devcic D., Cheong J., Doyle L.W., Tolcos M., Caffeine For Apnea of Prematurity: Effects On the Developing Brain, *Neurotoxicology*, 2017, **58**, 94–102.

Atik A., Harding R., De Matteo R., Tolcos M., Caffeine And The Developing Brain: Molecular And Cellular Effects, Editors: Preedy V., *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*, Elsevier Inc, 3nd ed., 753-761, 2016.

Avanzini G., Franceschetti S., Cellular Biology Of Epileptogenesis, *Lancet Neurology*, 2003, **2**(1), 33–42.

Awayda M.S., Shao W., Guo F., Zeidel M., Hill W.G., Enac-Membrane İnteractions: Regulation of Channel Activity by Membrane Order, *Journal Of General Physiology*, 2004, **123**(6), 709–727.

Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S., Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360-438.

Bagheri S., Heydari A., Alinaghipour A., Salami M., Effect of Probiotic Supplementation On Seizure Activity and Cognitive Performance İn PTZ-İnduced Chemical Kindling, *Epilepsy And Behavior*, 2019, **95**, 43–50.

Ballesteros-Yáñez I., Castillo C.A., Merighi S., Gessi S. The Role of Adenosine Receptors in Psychostimulant Addiction, *Frontiers İn Pharmacology*, 2018, **8**, 1–18.

Baptista P., Andrade J.P., Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation and Possible Functional and Clinical Correlates, *Frontiers İn Neuroanatomy*. 2018, **12**(6), 1–23.

Barcelos R.P., Lima F.D., Carvalho N.R., Bresciani G., Royes L.F., Caffeine Effects On Systemic Metabolism, Oxidative-İnflammatory Pathways, and Exercise Performance, *Nutrition Research*, 2020, **80**, 1–17.

Barker-Haliski M., Steve White H., Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures And Epilepsy, *Cold Spring Harbor Perspectives İn Medicine*, 2015, **5**(8), 1–15.

Bashkatova V., Narkevich V., Vitskova G., Vanin A., The İnfluence of Anticonvulsant and Antioxidant Drugs On Nitric Oxide Level and Lipid Peroxidation in the Rat Brain During Penthylenetetrazole-İnduced Epileptiform Model Seizures, *Progress İn Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2003, **27**(3), 487–492.

Bauer J., Maier K., Linderkamp O., Hentschel R., Effect of Caffeine On Oxygen Consumption and Metabolic Rate İn Very Low Birth Weight İnfants with İdiopathic Apnea, *Pediatrics*, 2001, **107**(4), 660–663.

Baulac M., De Boer H., Elger C., Glynn M., Kälviäinen R., Little A., Mifsud J., Perucca E., Pitkänen A., Ryvlin P., Epilepsy Priorities İn Europe: A Report of the ILAE-IBE Epilepsy Advocacy Europe Task Force, *Epilepsia*, 2015, **56**(11), 1687–1695.

Beck H., Elger C.E., Epilepsy Research: A Window Onto Function and Dysfunction of the Human Brain, *Dialogues İn Clinical Neuroscience*, 2008, **10**(1), 7–15.

Beghi E., Giussani G., Aging and the Epidemiology of Epilepsy, *Neuroepidemiology*, 2018, **51**(3-4) 216–223.

Berg A.T., Scheffer I.E., New Concepts İn Classification of the Epilepsies: Entering The 21st Century, *Epilepsia*, 2011, **52**(6), 1058–1062.

Bernard S., Chang M.D., Daniel H., Lowenstein M., Epilepsy, *The New England Journal Of Medicine*, 2003, **8**(2), 265–271.

Bhatt S., Nagappa A.N., Patil C.R., Role Of Oxidative Stress İn Depression, *Drug Discovery Today*, 2020, **25**(7), 1270–1276.

Bien C.G., Granata T., Antozzi C., Cross J.H., Dulac O., Kurthen M., Lassman H., Mantegazza R., Villemure J.G., Spreafico R., Elger C.E., Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Rasmussen Encephalitis: A European Consensus Statement, *Brain*, 2005, **128**(3), 454–471.

Bruce, C., Yates D.H., Thomas P.S., Caffeine Decreases Exhaled Nitric Oxide, *Thora*, 2002, **57**(4), 361–363.

Buzzi A., Chikhladze M., Falcicchia C., Paradiso B., Lanza G., Soukupova M., Marti M., Morari M., Franceschetti S., Simonato M., Loss Of Cortical GABA Terminals İn Unverricht-Lundborg Disease, *Neurobiology of Disease*, 2012, **47**(2), 216–224.

Byrne B., Beattie J.W., Song C.L., Kazarian S.G., *ATR-FTIR Spectroscopy And Spectroscopic İmaging Of Proteins*, Editor(s): Ozaki Y., Baranska Ö., Lednev I.K., Wood R.B., *Vibrational Spectroscopy in Protein Research*, First ed., Academic Press, San Francisco, 1-22, 2020.

Cakmak G., Miller L.M., Zorlu F., Severcan F., Amifostine, A Radioprotectant Agent, Protects Rat Brain Tissue Lipids Against İonizing Radiation İnduced Damage, *Archives of Biochemistry And Biophysics*., 2012, **520**(2), 67–73.

Cakmak G., Togan I., Severcan F., 17β-Estradiol İnduced Compositional, Structural and Functional Changes İn 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*, 2014, **13**(1), 71–88.

Castro A., Jerez M.J., Gil C., Martinez A., Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Their Role İn İmmunomodulatory Responses: Advances in the Development Of Specific Phosphodiesterase İnhibitors, *Medicinal Research Reviews*, 2005, **25**(2), 229–244.

Chen J.F., Lee C., Chern Y., Adenosine Receptor Neurobiology: Overview, *İntenational Review of Neurobiology*, 2014, **119**(1), 1-49.

Chen J.J., Yu B.P., Alterations İn Mitochondrial Membrane Fluidity by Lipid Peroxidation Products, *Free Radical Biology And Medicine*, 1994, **17**(5), 411–418.

Chrościńska-Krawczyk M., Jargiełło-Baszak M., Wałek M., Tylus B., Czuczwar S.J., Caffeine and The Anticonvulsant Potency of Antiepileptic Drugs: Experimental and Clinical Data, *Pharmacological Reports*, 2011, **63**(1), 12–18.

Chuang Y.C., Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Seizure-İnduced Neuronal Cell Death, *Acta Neurologica Taiwanica*, 2010, **19**(1), 3–15.

Chwiej J., Skoczen A., Janeczko K., Kutorasinska J., Matusiak K., Figiel H., Dumas P., Sandt C., Setkowicz Z., The Biochemical Changes in Hippocampal Formation Occurring in Normal and Seizure Experiencing Rats as A Result Of A Ketogenic Diet, *Analyst*, 2015, **140**(7), 2190–2204.

Cooper GM., The Cell: A Molecular Approach, 2nd Ed., Sunderland, Sinauer Associates, 2000.

Coppola A., Moshé S.L., Animal Models, *Handbook of Clinical Neurology*, 2012, **107**, 63–98.

Corradi V., Mendez-Villuendas E., Ingólfsson H.I., Gu R.X., Siuda I., Melo M.N., Moussatova A., Degagné L.J., Sejdiu B.I., Singh G., Wassenaar T.A., Delgado Magnero K., Marrink S.J., Tieleman D.P., Lipid-Protein Interactions are Unique Fingerprints For Membrane Proteins, *ACS Central Science*, 2018, **4**(6), 709–717.

Cortés A., Casadó-Anguera V., Moreno E., Casadó V., Caffeine, Adenosine A1 Receptors, and Brain Cortex, *Academic Press*, 2016, 741-752.

Cutrufo C., Bortot L., Giachetti A., Manzini S., Differential Effects of Various Xanthines On Pentylenetetrazole-İnduced Seizures İn Rats: An EEG and Behavioural Study, *European Journal Of Pharmacology*, 1992, **222**(1), 1–6.

D'Adamo M.C., Catacuzzeno L., Di Giovanni G., Franciolini F., Pessia M., K+ Channelepsy: Progress in the Neurobiology of Potassium Channels And Epilepsy, *Frontiers İn Cellular Neuroscience*, 2013, **7**(11), 1–21.

Daly J., Shi D., The Role of Adenosine Receptors in the Central Action of Caffeine, *Caffeine And Behavior*, 1999, **7**(2), 201–213.

Dastgheib, M., Moezi L., Acute and Chronic Effects of Agomelatine On İntravenous Penthylenetetrazol-İnduced Seizure in Mice and the Probable Role of Nitric Oxide, *European Journal of Pharmacology*, 2014, **736**, 10–15.

Delorenzo R.J., Sun D.A., Deshpande L.S., Cellular Mechanisms Underlying Acquired Epilepsy: The Calcium Hypothesis Of The İnduction and Maintainance of Epilepsy, *Pharmacology and Therapeutics*, 2005, **105**(3), 229–266.

Demir P., Akkas S.B., Severcan M., Zorlu F., Severcan F., Ionizing Radiation İnduces Structural and Functional Damage On the Molecules of Rat Brain Homogenate Membranes: A Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spectroscopic Study, *Applied Spectroscopy*, 2015, **69**(1), 154–164.

Deng Y.Q., Xu G.G., Duan P., Zhang Q., Wang J.Z., Effects of Melatonin On Wortmannin-İnduced Tau Hyperphosphorylation, *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, **26**(5), 519–526.

Devinsky O., Vezzani A., O'Brien T.J., Jette N., Scheffer I.E., de Curtis M., Perucca

P., Epilepsy, Disease Primers, 2018, **3**, 18024.

Dheer P., Chaitanya G., Pizarro D., Esteller R., Majumdar K., Pati S., Seizure Detection and Network Dynamics Of Generalized Convulsive Seizures: Towards Rational Designing of Closed-Loop Neuromodulation, *Neuroscience Journal*, 2017, **2017**, 1–9.

Dinkel K., Meinck H.M., Jury K.M., Karges W., Richter W., Inhibition Of Γ-Aminobutyric Acid Synthesis by Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies İn Stiff-Man Syndrome, *Annals of Neurology*, 1998, **44**(2), 194–201.

Divecha N., Irvine R.F., Phospholipid Signaling, *Cell*, 1995, **80**(2), 269–278.

Drenthen G.S., Backes W.H., Aldenkamp A.P., Vermeulen R.J., Klinkenberg S., Jansen J.F.A., On The Merits Of Non-İnvasive Myelin İmaging in Epilepsy, A Literature Review, *Journal Of Neuroscience Methods*, 2020, **338**(6), 108687.

Dugladze T., Maziashvili N., Börgers C., Gurgenidze S., Häussler U., Winkelmann A., Haas C.A., Meier J.C., Vida I., Kopell N.J., Gloveli T., GABAB Autoreceptor-Mediated Cell Type-Specific Reduction of İnhibition in Epileptic Mice, *Proceedings Of The National Academy of Sciences of the United States Of America*, 2013, **110**(37), 15073–15078.

Dzhala V., Desfreres L., Melyan Z., Ben-Ari Y., Khazipov R., Epileptogenic Action pf Caffeine During Anoxia in the Neonatal Rat Hippocampus, *Annals Of Neurology*, 1999, **46**(1), 95–102.

Elibol-Can B., Jakubowska-Dogru E., Severcan M., Severcan F., The Effects of Short-Term Chronic Ethanol İntoxication and Ethanol Withdrawal on the Molecular Composition of the Rat Hippocampus by FT-IR Spectroscopy, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*., 2011, **35**(11), 2050–2062.

Elmasry S.A., Al-Azzawi M.A., Ghoneim A.H., Nasr M.Y., Abozaid M.M.N., Role of Oxidant–Antioxidant İmbalance in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Egyptian Journal Of Chest Diseases and Tuberculosis*, 2015, **64**(4), 813–820.

Endesfelder S., Strauß E., Scheuer T., Schmitz T., Bührer C., Antioxidative Effects of Caffeine in A Hyperoxia-Based Rat Model Of Bronchopulmonary Dysplasia, *Respiratory Research*, 2019, **20**(1), 1–13.

Ergul Erkec O., Pentylenetetrazol Kindling Epilepsy Model, *Journal of the Turkish Epilepsi Society*, 2015, **21**(1), 6–12.

Ergul Erkec O., Pentylenetetrazol Kindling Epilepsy Model, *Journal Of The Turkish Epilepsi Society*, 2015, **21**(1), 6–12.

Esmaili Z., Heydari., Effect Of Acute Caffeine Administration on PTZ-İnduced Seizure Threshold in Mice: Involvement of Adenosine Receptors and NO-Cgmp Signaling Pathway, *Epilepsy Research*, 2019, **149**(haziran 2018), 1–8.

Falco-Walter J.J., Scheffer I.E., Fisher R.S., The New Definition And Classification Of

Seizures And Epilepsy, *Epilepsy Research* , 2018, **139**, 73-79.

Fernández-Pérez E.J., Sepúlveda F.J., Peters C., Bascuñán D., Riffo-Lepe N.O., González-Sanmiguel J., Sánchez S.A., Peoples R.W., Vicente B., Aguayo L.G., Effect of Cholesterol on Membrane Fluidity and Association of Aβ Oligomers and Subsequent Neuronal Damage: A Double-Edged Sword. *Frontiers İn Aging Neuroscience*, 2018, **10**(8), 1–14.

Ferreira I.C.C., Aguiar E.M.G., Silva A.T.F., Santos L.L.D., Cardoso-Sousa L., Araújo T.G., Santos D.W., Goulart L.R., Sabino-Silva R., Maia Y.C.P., Li C.J., Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis, *Journal Of Oncology*, 2020, **2020**(4), 1-11.

Fisone G., Borgkvist A., Usiello A., Caffeine As A Psychomotor Stimulant: Mechanism Of Action, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**(7–8), 857–872.

Foldvary-Schaefer N., Wyllie E., Epilepsy., *Textbook Of Clinical Neurology: Third Edition*, 2007, 1213–1244.

Fredholm B.B., Bättig K., Holmén J., Nehlig A., Zvartau E.E., Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to its Widespread Use. *Pharmacological Reviews*, 1999, **51**(1), 83–133.

Galanopoulou A., GABAA Receptors in Normal Development and Seizures: Friends or Foes? *Current Neuropharmacology*, 2008, **6**(1), 1–20.

Gallala H.D., Breiden B., Sandhoff K., Regulation of the NPC2 Protein-Mediated Cholesterol Trafficking by Membrane Lipids, *Journal Of Neurochemistry*, 2011, **116**(5), 702–707.

García J.J., Lõpez-Pingarrõn L., Almeida-Souza P., Tres A., Escudero P., García-Gil F.A., Tan D.X., Reiter R.J., Ramírez J.M., Bernal-Pérez M., Protective Effects of Melatonin in Reducing Oxidative Stress And in Preserving The Fluidity Of Biological Membranes: A Review. *Journal Of Pineal Research*, 2014, **56**(3), 225–237.

Gaschler M.M., Stockwell B.R., Lipid Peroxidation in Cell Death. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 2017, **482**(3), 419–425.

German S.P., German S.M., Extrasynaptic GABA and Glutamate Receptors in Epilepsy, *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2008, **6**(4), 288–300.

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

Geronzi U., Lotti F., Grosso S., Oxidative Stress in Epilepsy, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2018, **18**(5), 427–434.

Gessi S., Merighi S., Varani K., Borea P.A., Adenosine Receptors in Health and Disease, 1. Baskı, *Elsevier Inc*, 2011.

Ghosh A., Shcherbik N., Effects of Oxidative Stress on Protein Translation: Implications For Cardiovascular Diseases, *International Journal Of Molecular Sciences*, 2020, **21**(8), 1–25.

Glassford S.E., Byrne B., Kazarian S.G., Recent Applications of ATR-FTIR Spectroscopy and İmaging To Proteins, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2013, **1834**(12), 2849–2858.

Gordon L.A., Morrison E.Y., Mcgrowder D.A., Young R., Fraser Y.T.P., Zamora E., Alexander-Lindo R.L., Irving R.R, Effect of Exercise Therapy On Lipid Profile and Oxidative Stress İndicators İn Patients with Type 2 Diabetes, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2008, **8**, 1–10.

Götz A., Nikzad-Langerodi R., Staedler Y., Bellaire A., Saukel J., Apparent Penetration Depth in Attenuated Total Reflection Fourier-Transform İnfrared (ATR-FTIR) Spectroscopy of Allium Cepa L. Epidermis and Cuticle, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 2020, **224**, 117460.

Guerrini R., Marini C., Barba C., Generalized Epilepsies. 1. Baskı, *Elsevier B.V.*, 2019.

Guillet R., Dunham L., Neonatal Caffeine Exposure and Seizure Susceptibility in Adult Rats, *Epilepsia*, 1995, **36**(8), 743–749.

Guo C., Ding P., Xie C., Ye C., Ye M., Pan C., Cao X., Zhang S., Zheng S., Oncotarget 75767 Www.İmpactjournals.Com/Oncotarget Potential Application of the Oxidative Nucleic Acid Damage Biomarkers İn Detection Of Diseases, *Oncotarget*, 2017, **8**(43), 75767–75777.

Gursahani R., Gupta N., The Adolescent or Adult with Generalized Tonic-Clonic Seizures, *Annals Of Indian Academy Of Neurology*, 2012, **15**(2), 81–88.

Hansen S.L., Sperling B.B., Sánchez C., Anticonvulsant and Antiepileptogenic Effects of GABAA Receptor Ligands in Pentylenetetrazole-Kindled Mice, *Progress İn Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry*, 2004, **28**(1), 105–113.

Haviv H., Habeck M., Kanai R., Toyoshima C., Karlish S.J.D., Neutral Phospholipids Stimulate Na,K-Atpase Activity: A Specific Lipid-Protein İnteraction, *Journal Of Biological Chemistry*,2013, **288**(14), 10073–10081.

Heckman M.A., Weil J., De Mejia E.G., Caffeine (1, 3, 7-Trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review On Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters, *Journal Of Food Science*, 2010, **75**(3), 77–87.

Hu F., Zhou J., Lu Y., Guan L., Wei N.N., Tang Y.Q., Wang K.W., Inhibition of Hsp70 Suppresses Neuronal Hyperexcitability and Attenuates Epilepsy by Enhancing A-Type Potassium Current, *Cell Reports*, 2019, **26**(1), 168-181.E4.

Hussain G., Wang J., Rasul A., Anwar H., Imran A., Qasim M., Zafar S., Kamran S.K.S., Razzaq A., Aziz N., Ahmad W., Shabbir A., Iqbal J., Baig S.M., Sun T., Role Of Cholesterol And Sphingolipids İn Brain Development And Neurological Diseases, *Lipids İn Health And Disease*, 2019, **18**(1), 1–12.

Inkielewicz-Stepniak I., Czarnowski W., Oxidative Stress Parameters in Rats Exposed to Fluoride and Caffeine, *Food And Chemical Toxicology*, 2010, **48**(6), 1607–1611.

Isokawa M., Caffeine-Induced Suppression Of Gabaergic Inhibition and Calcium-Independent Metaplasticity, *Neural Plasticity*, **2016**.

Janero D.R., Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic İndices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue İnjury, *Free Radical Biology And Medicine*, 1990, **9**(6), 515–540.

Jarero-Basulto J.J., Gasca-Martínez Y., Rivera-Cervantes M.C., Ureña-Guerrero M.E., Feria-Velasco A.I., Beas-Zarate C., Interactions Between Epilepsy and Plasticity, *Pharmaceuticals*, 2018, **11**(1), 1–18.

Jennum P., Pickering L., Christensen J., Ibsen R., Kjellberg J., Morbidity and Mortality Of Childhood- and Adolescent-Onset Epilepsy: A Controlled National Study, *Epilepsy and Behavior*, 2017, **66**, 80–85.

Jeya Krishna Sri P S.B., S P., A Short Review on the Effect of Functional Group in Methylxanthine (Caffeine) Class of Drugs, *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 2018, **07**(04), 4–8.

Ji G.J., Zhang Z., Xu Q., Zang Y.F., Liao W., Lu G., Generalized Tonic-Clonic Seizures: Aberrant İnterhemispheric Functional and Anatomical Connectivity, *Radiology*, 2014, **271**(3), 839–847.

Jin U., Park S.J., Park S.M., Cholesterol Metabolism in the Brain and İts Association With Parkinson's Disease, *Experimental Neurobiology*, 2019, **28**(5), 554–567.

Jonas P., Lisman J., Structure, Function, and Plasticity of Hippocampal Dentate Gyrus Microcircuits, *Frontiers İn Neural Circuits*, 2014, **8**, 107.

Jurkiewicz P., Olzyńska A., Cwiklik L., Conte E., Jungwirth P., Megli F.M., Hof M., Biophysics of Lipid Bilayers Containing Oxidatively Modified Phospholipids: Insights From Fluorescence and EPR Experiments and from MD Simulations, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 2012, **1818**(10), 2388–2402.

Kafle B.P., Infrared (IR) Spectroscopy, Editors: Kafle B.P., *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, first ed., Elsevier inc, 199-243, 2020.

Kamboj S.S., Chopra K., Sandhir R., Hyperglycemia-İnduced Alterations in Synaptosomal Membrane Fluidity and Activity of Membrane Bound Enzymes: Beneficial Effect of N-Acetylcysteine Supplementation, *Neuroscience*, 2009, **162**(2), 349–358.

Kandratavicius L., Alves Balista P., Lopes-Aguiar C., Ruggiero R.N., Umeoka E.H., Garcia-Cairasco N., Soares Bueno-Junior L., Leite J.P., Neuropsychiatric Disease and Treatment Dovepress Animal Models of Epilepsy: Use and Limitations, *Neuropsychiatric Disease And Treatment*, 2014, **10**, 1693–1705.

Kao Y.C., Ho P.C., Tu Y.K., Jou I.M., Tsai K.J., Lipids And Alzheimer's Disease, *International Journal Of Molecular Sciences*, 2020, **21**(4), 1–37.

Karabulut, H., Gülay Ş.M., Serbest Radikaller, *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg*, 2016, **4**(41), 50–59.

Kardas M., Gozen A.G., Severcan F., FTIR Spectroscopy Offers Hints Towards Widespread Molecular Changes in Cobalt-Acclimated Freshwater Bacteria, *Aquatic Toxicology*, 2014, **155**, 15–23.

Kayir H., Uzbay I.T., Evidence for the Role of Nitric Oxide in Caffeine-İnduced Locomotor Activity in Mice, *Psychopharmacology*, 2004, **172**(1), 11–15.

Kazarian S.G., Chan K.L.A., ATR-FTIR Spectroscopic İmaging: Recent Advances and Applications to Biological Systems, *Analyst*, 2013, **138**(7), 1940–1951.

Kazemzadeh-Narbat M., Annabi N., Tamayol A., Oklu R., Ghanem A., Khademhosseini A., Adenosine-Associated Delivery Systems, *Journal Of Drug Targeting*, 2015, **23**(7–8), 580–596.

Kepenek E.S., Gozen A.G., Severcan F., Molecular Characterization of Acutely and Gradually Heavy Metal Acclimated Aquatic Bacteria by FTIR Spectraoscopy, *Journal of Biophotonics*, 2019, **12**(5), :e201800301

Khazipov R., Gabaergic Synchronization in Epilepsy, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, **6**(2), 1–14.

Khondker A., Dhaliwal A., Alsop R.J., Tang J., Backholm M., Shi A.C., Rheinstädter M.C., Partitioning Of Caffeine İn Lipid Bilayers Reduces Membrane Fluidity And İncreases Membrane Thickness, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, **19**(10), 7101–7111.

Khurana D.S., Valencia I., Goldenthal M.J., Legido, A., Mitochondrial Dysfunction in Epilepsy, *Seminars İn Pediatric Neurology*, 2013, **20**(3), 176–187.

Kinnunen, P.K.J., Lipid Bilayers as Osmotic Response Elements, *Cellular Physiology And Biochemistry*, 2000, **10**(5–6), 243–250.

Kneipp J., Lasch P., Baldauf E., Beekes M., Naumann D., Detection of Pathological Molecular Alterations in Scrapie-İnfected Hamster Brain by Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis Of Disease*, 2000, **1501**(2–3), 189–199.

Knopp A., Frahm C., Fidzinski P., Witte O.W., Behr J., Loss of Gabaergic Neurons in the Subiculum and its Functional İmplications in Temporal Lobe Epilepsy, *Brain*, 2008, **131**(6), 1516–1527.

Knutti R., Rothweiler H., Schlatter C., Effect of Pregnancy on the Pharmacokinetics of Caffeine, *Obstetrical and Gynecological Survey*, 1982, **37**(8), 518–519.

Ko M., Zou K., Minagawa H., Yu W., Gong J.S., Yanagisawa K., Michikawa M., Cholesterol-Mediated Neurite Outgrowth is Differently Regulated Between Cortical and Hippocampal Neurons, *Journal Of Biological Chemistry*, 2005, **280**(52), 42759–42765.

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 and Behavior*, 2018, **80**, 37–47.

Korff C., Nordli D.R., Do Generalized Tonic-Clonic Seizures in İnfancy Exist? *Neurology*, **65**(11), 2005, 1750–1753.

Kovac S., Kostova A.T.D., Herrmann A.M., Melzer N., Meuth S.G., Gorji A., Metabolic and Homeostatic Changes in Seizures and Acquired Epilepsy—Mitochondria, Calcium Dynamics and Reactive Oxygen Species, *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(9), 1935.

Kraaijenga J. V., Hutten G.J., De Jongh F.H., Van Kaam A.H., The Effect of Caffeine On Diaphragmatic Activity and Tidal Volume in Preterm İnfants, *Journal Of Pediatrics*, 2015, **167**(1), 70–75.

Kucuk Baloglu F., Baloglu O., Heise S., Brockmann G., Severcan F., Triglyceride Dependent Differentiation of Obesity in Adipose Tissues by FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics, *Journal Of Biophotonics*, 2017, **10**(10), 1345–1355.

Kumar S., Kumar V., Abhilasha Garg M., Jain, D.C., Fourier Transform İnfraRed Spectroscopic Studies on Epilepsy, Migraine and Paralysis, *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, 2010, **23**(3–4), 277–290.

Kuruba R., Hattiangady B., Shetty A.K., Hippocampal Neurogenesis and Neural Stem Cells İn Temporal Lobe Epilepsy, *Epilepsy And Behavior*, 2009 **14**(1), 65–73.

Kutluhan S., Nazıroğlu M., Çelik Ö., Yilmaz M., Effects of Selenium and Topiramate On Lipid Peroxidation and Antioxidant Vitamin Levels in Blood of Pentylentetrazol-İnduced Epileptic Rats, *Biological Trace Element Research*, 2009, **129**(1–3), 181–189.

Lee A.G., Lipid-Protein İnteractions in Biological Membranes: A Structural Perspective, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2003, **1**, 1-40.

Leite M.R., Wilhelm E.A., Jesse C.R., Brandão R., Nogueira C.W., Protective Effect of Caffeine and A Selective A2A Receptor Antagonist On İmpairment Of Memory And Oxidative Stress Of Aged Rats, *Experimental Gerontology*, 2011, **46**(4), 309–315.

Lekoubou A., Bishu K.G., Ovbiagele B., Nationwide Trends in Medical Expenditures Among Adults With Epilepsy: 2003–2014, *Journal of the Neurological Sciences*, **384**, 113–120.

Li Y.F., Ouyang S.H., Tu L.F., Wang X., Yuan W.L., Wang G.E., Wu Y.P., Duan W.J., Yu H.M., Fang Z.Z., Kurihara H., Zhang Y., He R.R., Caffeine Protects Skin From Oxidative Stress-İnduced Senescence Through the Activation of Autophagy. *Theranostics*, 2018, **8**(20), 5713–5730.

Lin Y., Han Y., Xu J., Cao L., Gao J., Xie N., Zhao X., Jiang H., Chi Z., Mitochondrial DNA Damage and the İnvolvement of Antioxidant Defense and Repair System İn Hippocampi of Rats with Chronic Seizures, *Cellular And Molecular Neurobiology*, 2010, **30**(6), 947–954.

Liu X.Y., Yang J.L., Chen L.J., Zhang Y., Yang M.L., Wu Y.Y., Li F.Q., Tang M.H., Liang S.F., Wei Y.Q., Comparative Proteomics And Correlated Signaling Network Of Rat Hippocampus İn The Pilocarpine Model Of Temporal Lobe Epilepsy, *Proteomics*, 2008, **8**(3), 582–603.

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

Lodha A., Doucette S., Bhandari V., Use of Caffeine For Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia, Editor: Bhandari V., *Tantalizing Therapeutics in Bronchopulmonary Dysplasia*, Elsevier Inc, United States, 21-46, 2020

López-Muñoz F.J., Castañeda-Hernández G., Flores-Murrieta F.J., Granados-Soto V., Effect Of Caffeine Coadministration And Of Nitric Oxide Synthesis İnhibition On The Antinociceptive Action Of Ketorolac, *European Journal of Pharmacology*, 1996, **308**(3), 275–277.

López G., Martínez R., Gallego J., Tarancón M.J., Carmona P., Fraile M.V., Dietary Fats Affect Rat Plasma Lipoprotein Secondary Structure as Assessed by Fourier Transform İnfrared Spectroscopy, *Journal Of Nutrition*, 2001, **131**(7), 1898–1902.

Lorigados L., Morales L.M., Orozco-Suarez S., Gallardo J.M., Díaz-Hung M.L., González, M.E., Estupiñán, B., Pavón, N., Rocha, L., Oxidative Stress in Pharmacoresistant Epilepsy, *Biotecnologia Aplicada*, 2016, **33**(2), 2101–2107.

Lüders H., Vaca G.F.B., Akamatsu N., Amina S., Arzimanoglou A., Baumgartner C., Benbadis S.R., Bleasel A., Bermeo-Ovalle A., Bozorgi A., Carreño M., Devereaux M., Francione S., Losarcos N.G., Hamer H., Holthausen H., Jamal-Omidi S., Kalamangalam G., Kanner A.M., Knake S., Lacuey N., Lhatoo S., Lim S.H., Londoño L. V., Mani J., Matsumoto R., Miller J.P., Noachtar S., Palmini A., Park J., Rosenow F., Shahid A., Schuele S., Steinhoff B.J., Ákos Szabó C., Tandon N., Terada K., Van Emde Boas W., Widdess-Walsh P., Kahane P., Classification of Paroxysmal Events

and the Four-Dimensional Epilepsy Classification System. *Epileptic Disorders*, 2019, **21**(1), 1–29.

Łuszczki J.J., Zuchora M., Sawicka K.M., Kozińska J., Czuczwar S.J., Acute Exposure to Caffeine Decreases the Anticonvulsant Action of Ethosuximide, But Not That of Clonazepam, Phenobarbital and Valproate Against Pentetrazole-İnduced Seizures İn Mice, *Pharmacological Reports*, 2006, **58**(5), 652–659.

Lv X., Chen Z., Li J., Zhang L., Liu H., Huang C., Zhu P., Caffeine Protects Against Alcoholic Liver İnjury by Attenuating İnflammatory Response and Oxidative Stress, *Inflammation Research*, 2010, **59**(8), 635–645.

Di Maio R., Neuronal Mechanisms of Epileptogenesis, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, **8**, 1–2.

Mantegazza M., Curia G., Biagini G., Ragsdale D.S., Avoli M., Voltage-Gated Sodium Channels as Therapeutic Targets in Epilepsy and Other Neurological Disorders, *The Lancet Neurology*, 2010, **9**(4), 413–424.

Martinc B., Grabnar I., Vovk, T., The Role of Reactive Species in Epileptogenesis and Influence of Antiepileptic Drug Therapy On Oxidative Stress, *Current Neuropharmacology*, 2012, **10**(4), 328–343.

Mazarati A., Neuropeptides: Epilepsy, *Encyclopedia of Neuroscience*, 2009, 907–914.

Mcdonald T., Puchowicz M., Borges K., Impairments in Oxidative Glucose Metabolism in Epilepsy and Metabolic Treatments Thereof, *Frontiers İn Cellular Neuroscience*, 2018, **12**, 1–13.

Van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W., Membrane Lipids: Where They are and How They Behave, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, **9**(2), 112–124.

Méndez-Armenta M., Nava-Ruíz C., Juárez-Rebollar D., Rodríguez-Martínez E., Yescas Gómez P., Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy, *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2014 **2014**(1), 1-12.

Miana-Mena F.J., Piedrafita E., González-Mingot C., Larrodé P., Muñoz M.J., Martínez-Ballarín E., Reiter R.J., Osta R., García J.J., Levels of Membrane Fluidity in the Spinal Cord and the Brain in An Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2011, **43**(2), 181–186.

Lazarus M., Chen F.J., Huang Z.L., Fredholm B.B., Adenosine and Sleep, *Handbook Of Experimental Pharmacology*, 2017, 1–23.

Minnes R., Nissinmann M., Maizels Y., Gerlitz G., Katzir A., Raichlin Y., Using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infra-Red (ATR-FTIR) Spectroscopy To Distinguish Between Melanoma Cells with A Different Metastatic Potential, *Scientific Reports*, 2017, **7**(1), 1–7.

Moore D.J., Sills R.H., Mendelsohn R., Peroxidation of Erythrocytes: FTIR Spectroscopy Studies of Extracted Lipids, İsolated Membranes, and İntact Cells, *Biospectroscopy*, 1995, **1**(2), 133–140.

Morimoto K., Fahnestock M., Racine R.J., Kindling and Status Epilepticus Models of Epilepsy: Rewiring The Brain, *Progress İn Neurobiology*, 2004, **73**(1), 1–60.

Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I.U., Fourier Transform İnfrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2008, **43**(2), 134–179.

Mseddi M., Mansour R. Ben Mnif F., Gargouri B., Abid M., Guermazi F., Attia H., Lassoued S., Lipid Peroxidation, Proteins Modifications, Anti-Oxidant Enzymes Activities and Selenium Deficiency in the Plasma of Hashitoxicosis Patients, *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 2015, **6**(5), 181–188.

Müller, C.P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Gulbins, E., Kornhuber, J. (2015) Brain Membrane Lipids İn Major Depression And Anxiety Disorders. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular And Cell Biology Of Lipids*. **1851**(8), 1052–1065.

Muller M.P., Jiang T., Sun C., Lihan M., Pant S., Mahinthichaichan P., Trifan A., Tajkhorshid E., Characterization of Lipid-Protein Interactions and Lipid-Mediated Modulation of Membrane Protein Function Through Molecular Simulation, *Chemical Reviews*, 2019, **119**(9), 6086–6161.

Naumann D., Infrared Spectroscopy in Microbiology, Editor: Meyers R.A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, USA, 2006, 1–29.

Naylor D.E., Glutamate and GABA in the Balance: Convergent Pathways Sustain Seizures During Status Epilepticus, *Epilepsia*, 2010, **51**(3), 106–109.

Naziroğlu M., Role of Melatonin On Calcium Signaling and Mitochondrial Oxidative Stress in Epilepsy: Focus On TRP Channels, *Turkish Journal of Biology*, 2015, **39**(6), 813–821.

Nehlig A., Effects of Coffee/Caffeine On Brain Health and Disease: What Should İ Tell My Patients?, *Practical Neurology*, 2016, **16**(2), 89–95.

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.

Nieber K., The Impact of Coffee On Health Author Pharmacokinetics and Mode of Action Bioactive Components in Coffee, *Planta Med*, 2017, **83**(1), 1256–1263.

Noutsi P., Gratton E., Chaieb S., Assessment of Membrane Fluidity Fluctuations During Cellular Development Reveals Time and Cell Type Specificity, *Plos ONE*, 2016, **11**(6) 1-15.

Onaolapo O.J., Onaolapo A.Y., *Caffeine, Sleep, And Antioxidant Status*. Elsevier Inc, 2020.

Onozuka M., Watanabe K., Intracellularly Applied Anti-P70 Antibody Blocks The İnduction of Abnormal Membrane Properties by Pentylenetetrazole in İdentified Euhadra Neurons, *Brain Research*, 1996, **716**(1–2), 187–191.

Onwuka F., Erhabor., The Effect of Caffeine on Lipid Peroxidation in the Liver and

Kidney of Wister Albino rats, Journal of Phytotherapy and Pharmacology, 2012, **1**(9), 01-06

Van Der Paal J., Neyts E.C., Verlackt C.C.W., Bogaerts A., Effect of Lipid Peroxidation on Membrane Permeability of Cancer and Normal Cells Subjected To Oxidative Stress, *Chemical Science*, 2016, **7**(1), 489–498.

Pack A.M., Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies, *CONTINUUM Lifelong Learning İn Neurology*, 2019, **25**(2), 306–321.

Palaniappan P.R., Pramod K.S., The Effect of Titanium Dioxide on the Biochemical Constituents of the Brain of Zebrafish (Danio Rerio): An FT-IR Study, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, **79**(1), 206–212.

Pandey M.K., Mittra P., Maheshwari, P.K, The Lipid Peroxidation Product As A Marker of Oxidative Stress in Epilepsy, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2012, **6**(4 SUPPL. 2), 590–592.

Pandya J.D., Dave K.R., Katyare S.S., Effect of Long-Term Aluminum Feeding on Lipid/Phospholipid Profiles of Rat Brain Myelin, *Lipids in Health and Disease*, 2004, **3**, 1–6.

Patel M., Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress: Cause and Consequence of Epileptic Seizures, *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, **37**(12), 1951–1962.

Patsoukis N., Zervoudakis G., Panagopoulos N.T., Georgiou C.D., Angelatou F., Matsokis N.A., Thiol Redox State (TRS) and Oxidative Stress in the Mouse Hippocampus After Pentylenetetrazol-İnduced Epileptic Seizure, *Neuroscience Letters*, 2004, **357**(2), 83–86.

Pearson-Smith J.N., Patel M., Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy, *International Journal Of Molecular Sciences*, 2017, **18**(11), 1–13.

Penderis J., Pathophysiology of Epileptic Seizures, *In Practice*, 2014, **36**, 3–9.

Peng L., Bonaguidi M.A., Function and Dysfunction of Adult Hippocampal Neurogenesis in Regeneration and Disease, *American Journal of Pathology*, 2018, **188**(1), 23–28.

Pippa E., Zacharaki E.I., Koutroumanidis M., Megalooikonomou V., Data Fusion For Paroxysmal Events' Classification From EEG, *Journal of Neuroscience Methods*, 2017, **275**, 55–65.

Pisoschi A.M., Pop A., The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, **97**, 55–74.

Pitkänen A., Lukasiuk, K., Mechanisms of Epileptogenesis and Potential Treatment Targets, *The Lancet Neurology*, 2011, **10**(2), 173–186.

Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A., Oxidative Stress: Harms And Benefits for Human Health, *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*,2017, **2017**(1), 1- 13.

Poitelon Y., Kopec A.M., Belin S., Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism, *Cells*, 2020, **9**(4), 812.

Pooler A.M., Xi S.C., Wurtman R.J., The 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Co-Enzyme A Reductase İnhibitor Pravastatin Enhances Neurite Outgrowth in Hippocampal Neurons, *Journal Of Neurochemistry*, 2006, **97**(3), 716–723.

Porter J.J., Mehl R.A., Genetic Code Expansion: A Powerful Tool For Understanding the Physiological Consequences of Oxidative Stress Protein Modifications, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, **2018**(1), 1-12.

Puttachary S., Sharma S., Stark S., Thippeswamy T., Seizure-İnduced Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy, *Biomed Research International*, 2015, **2015**(3), 1-20.

Rauca C., Zerbe R., Jantze H., Formation of Free Hydroxyl Radicals After Pentylenetetrazol-İnduced Seizure and Kindling, *Brain Research*, 1999, **847**(2), 347–351.

Ray P., Ray R., Broomfield C.A., Berman J.D., Inhibition of Bioenergetics Alters İntracellular Calcium, Membrane Composition, and Fluidity in A Neuronal Cell Line, *Neurochemical Research*, 1994, **19**(1), 57–63.

Renda G., De Caterina R., Caffeine, Editors: Kohlmeier M., Martinez J.A., Caterina R.D., *Principles Of Nutrigenetics and Nutrigenomics: Fundamentals of Individualized Nutrition*, Elsevier İnc., first ed., 2019, 335–340.

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

Roganovic M., Pantovic S., Dizdarevic S., Role of the Oxidative Stress in the Pathogenesis of Epilepsy, *Neurological Sciences And Neurophysiology*, 2019, **36**(1), 1–8.

Rohman A., Che Ma Y.B., Application of FTIR Spectroscopy for Monitoring the Stabilities of Selected Vegetable Oils During Thermal Oxidation, *International Journal Of Food Properties*, 2013, **16**(7), 1594–1603.

Rouquette M., Lepetre-Mouelhi S., Couvreur P., Adenosine and Lipids: A Forced Marriage or A Love Match? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, **151**–**152**, 233–244.

Rubin R.D., Watson P.D., Duff M.C., Cohen N.J., The Role of the Hippocampus in Flexible Cognition qnd Social Behavior, *Frontiers İn Human Neuroscience*, 2014, **8**(9), 1–15.

Sakai T., Kawano, K., Iino M., Takeuchi T., Imanishi M., Futaki S., Loosening of Lipid Packing by Cell-Surface Recruitment of Amphiphilic Peptides by Coiled-Coil Tethering, *Chembiochem*, 2019, **20**(16), 2151–2159.

Dos Santos-Rodrigues A., Pereira M.R., Brito R., De Oliveira N.A., Paes-De-Carvalho R., Adenosine Transporters and Receptors: Key Elements for Retinal Function and Neuroprotection, *Vitamins and Hormones*, 2015, **98**, 487–523.

Santos Í.M.S., Da Rocha Tomé A., Saldanha G.B., Ferreira P.M.P., Militão G.C.G., De Freitas R.M., Oxidative Stress in the Hippocampus During Experimental Seizures Can Be Ameliorated with the Antioxidant Ascorbic Acid. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, **2**(4), 214–221.

Sariisik E., Koçak M., Küçük Baloğlu F., Severcan, F., Interaction of the Cholesterol Reducing Agent Simvastatin With Zwitterionic DPPC and Charged DPPG Phospholipid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 2019, **1861**(4), 810–818.

Schmitt F., Hussain G., Dupuis L., Loeffler J.P., Henriques, A., A Plural Role For Lipids in Motor Neuron Diseases: Energy, Signaling and Structure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, **8**(2), 1–10.

Schmitt S., Cantuti Castelvetri L., Simons M., Metabolism and Functions of Lipids in Myelin, *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2015, **1851**(8), 999–1005.

Schwabe K., Ebert U., Animal Models of Epilepsy, *Animal Models of Neuropsychiatric Diseases*, 2006, 75–117.

Sebastião A.M., Ribeiro J.A., A*denosine Receptors And The Central Nervous System*, 2009

Seifert G., Schröder W., Hinterkeuser S., Schumacher T., Schramm J., Steinhäuser C., Changes İn Flip / Flop Splicing of Astroglial AMPA Receptors in Human Temporal Lobe Epilepsy, 2002, **43**, 162–167.

Sendrowski K., Sobaniec, W., Hippocampus, Hippocampal Sclerosis and Epilepsy. *Pharmacological Reports*, 2013, **65**(3), 555–565.

Seo S., Leitch B., Synaptic Changes in GABAA Receptor Expression in the Thalamus of the Stargazer Mouse Model of Absence Epilepsy, *Neuroscience*, 2015, **306**, 28–38.

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

Sevinc A., Yonar D., Severcan F., Investigation of Neurodegenerative Diseases From Body Fluid Samples Using Fourier Transform İnfrared Spectroscopy, *Biomedical Spectroscopy And Imaging*, 2015, **4**(4), 341–357.

Shao L.-R., Habela C.W., Stafstrom C.E., Pediatric Epilepsy Mechanisms: Expanding the Paradigm of Excitation/Inhibition Imbalance, *Children*. 2019, **6**(2), 23.

Shaw R.A., Mantsch H.H., Infrared Spectroscopy İn Clinical and Diagnostic Analysis, *Encyclopedia Of Analytical Chemistry*, 2006.

Shimada T., Yamagata K., Pentylenetetrazole-İnduced Kindling Mouse Model, *Journal of Visualized Experiments*, 2018, **2018**(136), 1–10.

Shin E.J., Jeong J.H., Chung Y.H., Kim W.K., Ko K.H., Bach J.H., Hong J.S., Yoneda

Y., Kim H.C., Role of Oxidative Stress in Epileptic Seizures, *Neurochemistry International*, 2011, **59**(2), 122–137.

Shivanoor S.M., David M., Reversal of Deltamethrin-İnduced Oxidative Damage in Rat Neural Tissues by Turmeric-Diet: Fourier Transform-İnfrared and Biochemical İnvestigation, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2016, **77**, 56–68.

Shoffner J.M., Lott M.T., Lezza A.M.S., Seibel P., Ballinger S.W., Wallace D.C., Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber Disease (MERRF) is Associated with A Mitochondrial DNA Trnalys Mutation, *Cell*, 1990, **61**(6), 931–937.

Shorvon S.D., Bermejo P.E., Gibbs A.A., Huberfeld G., Kälviäinen R., Antiepileptic Drug Treatment of Generalized Tonic–Clonic Seizures: An Evaluation of Regulatory Data and Five Criteria for Drug Selection, *Epilepsy And Behavior*, 2018, **82**, 91–103.

Siesjö, B.K., Acidosis and İschemic Brain Damage, *Neurochemical Pathology*, 1988, **9**(1–3), 31–88.

Sills R.H., Moore D.J., Mendelsohn R., Erythrocyte Peroxidation: Quantitation by Fourier Transform İnfrared Spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, 1994, **218**(1), 118–123.

Da Silva R.S., *Caffeine*, Elsevier Inc, 2011.

Simsek Ozek N., Bal I.B., Sara Y., Onur R., Severcan, F., Structural and Functional Characterization of Simvastatin-İnduced Myotoxicity in Different Skeletal Muscles, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2014, **1840**(1), 406–415.

Simsek Ozek N., Sara Y., Onur R., Severcan F., Low Dose Simvastatin İnduces Compositional, Structural and Dynamic Changes in Rat Skeletal Extensor Digitorum Longus Muscle Tissue, *Bioscience Reports*, 2010, **30**(1), 41–50.

Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti, S., Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases, *Molecules*, 2019, **24**(8), 1–20.

Sivakumar S., Khatiwada C.P., Sivasubramanian J., Raja B., FTIR Study of Protective Action of Deferoxamine and Deferiprone on the Kidney Tissues of Aluminum Loaded Mice, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **118**, 488–497.

Sivakumar S., Sivasubramanian J., Raja, B., Aluminium İnduced Structural, Metabolic Alterations and Protective Effects of Desferrioxamine in the Brain Tissue of Mice: An FTIR Study, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, **99**, 252–258.

Souza, M.A., Mota B.C., Gerbatin R.R., Rodrigues F.S., Castro, M., Fighera M.R., Royes L.F.F., Antioxidant Activity Elicited By Low Dose of Caffeine Attenuates Pentylenetetrazol-İnduced Seizures and Oxidative Damage in Rats, *Neurochemistry International*, 2013, **62**(6), 821–830.

Spencer R.L., Bland, S.T., Hippocampus And Hippocampal Neurons, *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology Handbook Of Stress Series*,2019, **3**, 57–68.

Srinivasan S., Avadhani, N.G., Cytochrome C Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, **53**(6), 1252–1263.

Stadtman E.R., Metal İon-Catalyzed Oxidation of Proteins: Biochemical Mechanism and Biological Consequences, *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, **9**(4), 315–325.

Stafstrom C.E., Carmant, L., Seizures And Epilepsy: An Overview for Neuroscientists, *Cold Spring Harbor Perspectives İn Biology*, 2015, **7**(5), 1–19.

Steinlein O.K., Calcium Signaling And Epilepsy, *Cell And Tissue Research*, 2014, **357**(2), 385–393.

Su L.J., Zhang J.H., Gomez H., Murugan R., Hong X., Xu D., Jiang F., Peng Z.Y., Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, And Ferroptosis, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, **2019**.

Szalontai B., Nishiyama Y., Gombos Z., Murat, N., Membrane Dynamics As Seen by Fourier Transform İnfrared Spectroscopy in A Cyanobacterium, Synechocystis PCC 6803, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2000, **1509**(1–2), 409–419.

Szczerbowska-Boruchowska M., Dumas P., Kastyak M.Z., Chwiej J., Lankosz M., Adamek D., Krygowska-Wajs, A., Biomolecular İnvestigation of Human Substantia Nigra in Parkinson's Disease by Synchrotron Radiation Fourier Transform İnfrared Microspectroscopy, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 2007, **459**(2), 241–248.

Tatulian S.A., *FTIR Analysis of Proteins And Protein–Membrane Interactions*, 2019,

Tavares C., Sakata R.K., Caffeine in the Treatment of Pain, *Revista Brasileira De Anestesiologia*, 2012, **62**(3), 387–401.

Tchekalarova J., Kubová H., Mareš, P., Effects of Postnatal Caffeine Exposure On Seizure Susceptibility in Developing Rats, *Brain Research*, 2007, **1150**(1), 32–39.

Tchekalarova J.D., Kubová H., Mares P., Different Effects of Postnatal Caffeine Treatment On Two Pentylenetetrazole-İnduced Seizure Models Persist İnto Adulthood, *Pharmacological Reports*, 2013, **65**(4), 847–853.

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

Tenney J.R., Rozhkov L., Horn P., Miles L., Miles, M. V., Cerebral Glucose Hypometabolism is Associated with Mitochondrial Dysfunction in Patients with İntractable Epilepsy and Cortical Dysplasia, *Epilepsia*, 2014, **55**(9), 1415–1422.

Theodore W.H., Porter R.J., Albert P., Kelley K., Bromfield E., Devinsky O., Sato, S., The Secondarily Generalized Tonic–Clonic Seizure: A Videotape Analysis, *Neurology*, 1994, **44**(8), 1403–1407.

Thijs R.D., Surges R., O'Brien T.J., Sander J.W., Epilepsy in Adults, *The Lancet*,

2019, **393**(10172), 689–701.

Toader O., Forte N., Orlando M., Ferrea E., Raimondi A., Baldelli P., Benfenati F., Medrihan, L., Dentate Gyrus Network Dysfunctions Precede the Symptomatic Phase İn A Genetic Mouse Model of Seizures. *Frontiers İn Cellular Neuroscience*, 2013, **7**(8), 1–15.

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**, 1–7.

Toyran N., Lasch P., Naumann D., Turan B., Severcan F., Early Alterations in Myocardia and Vessels Of The Diabetic Rat Heart: An FTIR Microspectroscopic Study, *Biochemical Journal*, 2006, **397**(3), 427–436.

Tramutola A., Lanzillotta C., Perluigi M., Butterfield D.A., Oxidative Stress, Protein Modification and Alzheimer Disease, *Brain Research Bulletin*, 2017, **133**, 88–96.

Traynelis S.F., Wollmuth L.P., Mcbain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R., Glutamate Receptor İon Channels: Structure, Regulation, and Function, *Pharmacological Reviews*, 2010, **62**(3), 405–496.

Treiman D.M., Gabaergic Mechanisms in Epilepsy, *Epilepsia*, 2001, **42**(3), 8–12.

Türker-Kaya S., İlbay G., Analysis of Rat Blood Plasma Upon Acute Epileptic Seizures by İnfrared Spectroscopy with Chemometrics, *Vibrational Spectroscopy*, 2020,**209**

Turker S., Ilbay G., Severcan M., Severcan F., Investigation of Compositional, Structural, and Dynamical Changes of Pentylenetetrazol-İnduced Seizures On A Rat Brain by FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(3), 1395–1403.

Turker S., Severcan M., Ilbay G., Severcan F., Biochimica et Biophysica Acta Epileptic Seizures İnduce Structural and Functional Alterations On Brain Tissue Membranes, *BBA – Biomembranes*, 2014, **1838**(12), 3088–3096.

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.

Ullah F., Ali T., Ullah N., Kim M.O., Caffeine Prevents D-Galactose-İnduced Cognitive Deficits, Oxidative Stress, Neuroinflammation and Neurodegeneration in the Adult Rat Brain, *Neurochemistry International*, 2015, **90**, 114–124.

Waldbaum S., Patel, M., Mitochondria, Oxidative Stress, and Temporal Lobe Epilepsy, *Epilepsy Research*, 2010, **88**(1), 23–45.

Walker M.C., Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention, *Seminars in Neurology*, 2015, **35**(3), 193–200.

Watanabe N., Suga K., Umakoshi H., Functional Hydration Behavior: Interrelation Between Hydration and Molecular Properties at Lipid Membrane İnterfaces, *Journal*

Of Chemistry, 2019, **2019**.

Whitfield K., Rambaldi A., Gluud C., Pentoxifylline for Alcoholic Hepatitis, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2008, (3).

Wible C.G., Hippocampal Physiology, Structure and Function and the Neuroscience of Schizophrenia: A Unified Account of Declarative Memory Deficits, Working Memory Deficits and Schizophrenic Symptoms, *Behavioral Sciences*, 2013, **3**(2), 298–315.

Willson C., The Clinical Toxicology of Caffeine: A Review and Case Study, *Toxicology Reports*, 2018, **5**, 1140–1152.

Wong-Ekkabut J., Xu Z., Triampo W., Tang I.M., Tieleman D.P., Monticelli L., Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study, *Biophysical Journal*, 2007, **93**(12), 4225–4236.

Yavuz M., Albayrak N., Özgür M., Gülçebi İdriz Oğlu M., Çavdar S., Onat F., The Effect of Prenatal and Postnatal Caffeine Exposure on Pentylentetrazole İnduced Seizures in the Non-Epileptic and Epileptic Offsprings, *Neuroscience Letters*, 2019, **713**.

Yi J.H., Hazell A.S., Excitotoxic Mechanisms and the Role of Astrocytic Glutamate Transporters in Traumatic Brain İnjury, *Neurochemistry International*, 2006, **48**(5), 394–403.

Yin Y.H., Ahmad N., Makmor-Bakry M., Pathogenesis of Epilepsy: Challenges in Animal Models, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2013, **16**(11), 1119–1132.

Zack M., Kobau R., Letter Re: Prevalence And İncidence Of Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis of İnternational Studies, *Neurology*, 2017, **89**(6), 641.

Zhang J., Liu Q., Cholesterol Metabolism and Homeostasis İn the Brain, *Protein And Cell*, 2015, **6**(4), 254–264.

Zhong Q., Wei B., Wang S., Ke S., Chen J., Zhang H., Wang H., The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived From Marine Organisms: An Overview, 2019,

Zubair M.U., Hassan M.M.A., Al-Meshal I.A., Caffeine, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 1986,**15**, 71–150.

EKLER

EK-A

PTZ ve KAF+PTZ uygulanan sıçan hipokampus gruplarına ait spektral parametreler Tablo A.1'de gösterilmektedir. Değerler her örnek için ortalama ± standart sapma şeklinde belirtilmiştir. İstatistiksel anlamlılık derecesi ($p<0,05$*) ve ($p<0,001$**) şeklinde belirtilmiştir.

Tablo A.1.KAF+P TZ ve PTZ gruplarının spektral parametreleri

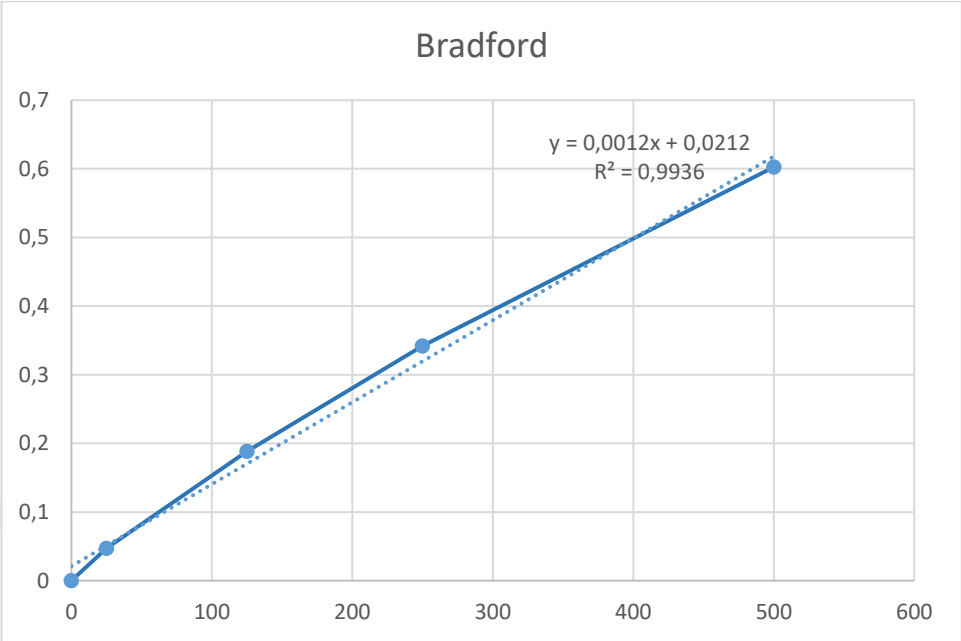
	PTZ (n=7)	**Kafein + PTZ (n=7)**
Frekans		
CH_3 asimetrik	2957,72 ± 0,14	2957,40 ± 0,09*
CH_2 asimetrik	2922,97 ± 0,42	2923,36 ± 0,17**
CH_2 simetrik	2852,43 ± 0,36	2852,47 ± 0,15
C=O	1735,43 ± 0,39	1734,99 ± 0,17*
PO^-_2 asimetrik	1233,10 ± 0,24	1231,93 ± 0,44**
PO^-_2 simetrik	1066,33 ± 0,59	1066,51 ± 0,56
Bant alanları		
Olefinik	1,68 ± 0,22	1,26 ± 0,096**
CH_3 asimetrik	3,46 ± 0,21	2,87 ± 0,05*
CH_2 asimetrik	7,37 ± 0,23	6,38 ± 0,23**
CH_2 simetrik	12,46 ± 0,77	11,04 ± 0,58
C=O	0,89 ± 0,05	1,06 ± 0,05**
Amid I	17,07 ± 0,42	18,43 ± 0,97*
Amid II	13,53 ± 0,37	15,22 ± 1,27**
COO- simetrik	6,26 ± 0,50	5,37 ± 0,31**
PO^-_2 asimetrik	6,87 ± 0,23	6,24 ± 0,43*
PO^-_2 simetrik	11,64 ± 0,36	9,12 ± 0,40**
C+-N-C	1,03 ± 0,11	0,81 ± 0,06**
Bant alan oranları		
Olefinik/lipit	0,068 ± 0,01	0,065 ± 0,01
C=O/lipit	0,048 ± 0,005	0,054 ± 0,004*
PO^-_2 /lipit	0,33 ± 0,04	0,36 ± 0,02
Lipit/protein	0,60 ± 0,04	0,55 ± 0,07
Bant genişliği		
CH_2 asimetrik	18,59 ± 0,53	17,93 ± 0,29*
CH_2 simetrik	9,47 ± 0,26	8,41 ± 0,22**
Bradford Test		
	0,72 ± 0,006	0,87± 0,0005**
TBARs Test		
	0,1523 ± 0	0,1792 ± 0,0001**

EK-B

Tablo B.1 Amid I bandının alt bantlarına ait ikincil türev spektrumları absorpsiyon değerleri

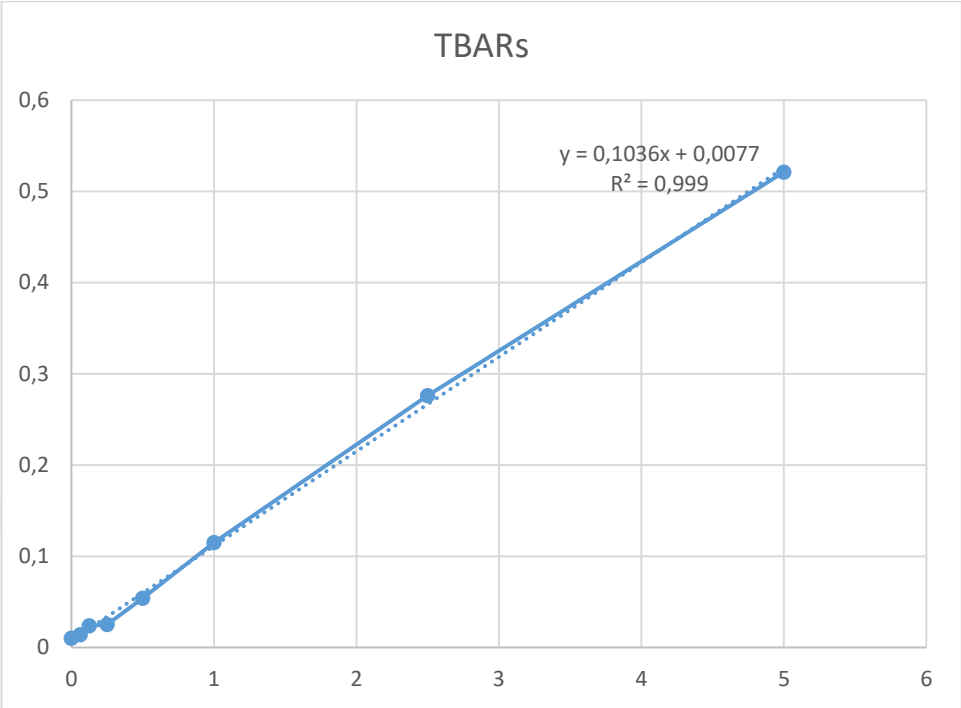
	PTZ	**KAF+PTZ**
1-Beta dönüş (1682 m^{-1})	-1,09	-9,06
2-Alfa heliks (1652 cm^{-1})	-5,44	-5,25
3-Düzensiz katlanma (1645 cm^{-1})	-5,44	-5,91
4-Beta plakalı (1633 cm^{-1})	-3,38	-3,36

EK-C



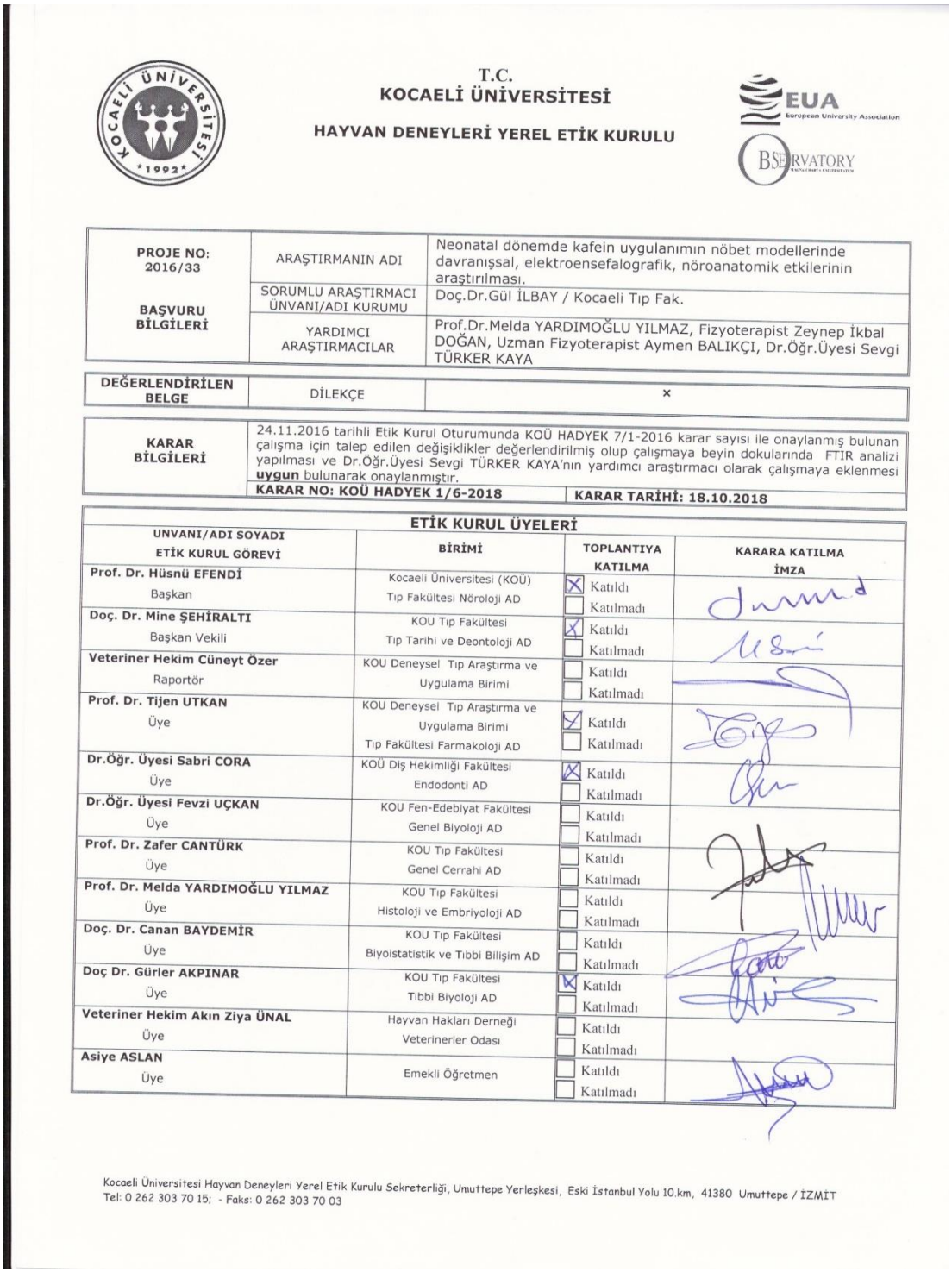
Şekil C.1. Bradford standart eğri grafiği.

EK-D



Şekil D.1. TBARs standart eğri grafiği.

EK-E



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

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

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	DİLEKÇE	×

KARAR BİLGİLERİ	24.11.2016 tarihli Etik Kurul Oturumunda KOÜ 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: KOÜ 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 (KOÜ) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Raportör	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Dr.Öğr. Üyesi Sabri CORA Üye	KOÜ Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Dr.Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	KOU Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç Dr. Gürler AKPINAR Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	

Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Sekreterliği, Umuttepe Yerleşkesi, Eski İstanbul Yolu 10.km, 41380 Umuttepe / İZMİT
Tel: 0 262 303 70 15; - Faks: 0 262 303 70 03

Şekil E.1. Hayvan deneyleri etik kurul belgesi

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Kandil G., Türker-Kaya S., İlbay G., Wistar Sıçanlarda Neonatal Dönemde Uygulanan Kafeinin Epileptik Nöbetlerine Etkisinin ATR-FTIR Spektroskopisi ile incelenmesi, *Uluslararası Marmara Fen ve Sosyal Bilimler Kongresi*, Kocaeli, Kasım 2019.

ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı lisans eğitimini 2018 yılında tamamladı. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde başladığı yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.