

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

WİSTAR VE WAG/Rij (ABSANS EPİLEPSİLİ) SIÇANLARDA
BEYİN DOKUSUNDAKİ YAŞA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN
FT-IR SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ

KÜBRA DAĞCI

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

WİSTAR VE WAG/Rij (ABSANS EPİLEPSİLİ) SIÇANLARDA
BEYİN DOKUSUNDAKİ YAŞA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN
FT-IR SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ

KÜBRA DAĞCI

Dr. Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA
Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç. Dr. Özlem AKSOY
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Dr. Öğr. Üyesi Filtiz DEDE YEŞİLİRMAK
Jüri Üyesi, Yıldırım Beyazıt Üniv.





Tezin Savunulduğu Tarih: 10.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Wistar sıçanlar ile genetik olarak absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda yaşla birlikte beyinde meydana gelen moleküler değişikliklerin Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi ile belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bütün bilgi ve birikimiyle her zaman bana çok değerli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER-KAYA'ya en içten dileklerle sonsuz teşekkür ederim.

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

Bütün laboratuvar çalışmalarım ve üniversite hayatımda sonsuz desteklerini hissettiğim arkadaşlarım Gökay KANDİL, Didem ŞENTÜRK, Dilan YILDIRIM, Sabri Can ÇELİK ve Özlem BİLİR'e teşekkür ederim.

Hayatımın her anında, ilkokuldan yüksek lisans eğitimimin sonuna kadar maddi ve manevi desteklerini benden hiç eksik etmeyen Sevgili babam Ahmet DAĞCI'ya ve Sevgili annem Ayten DAĞCI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2017/091) birimine şükranlarımı sunarım.

Temmuz-2019

Kübra DAĞCI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Epilepsi	3
1.1.1. Epilepsi insidansı	4
1.1.2. Epilepsi prevalansı.....	5
1.1.3. Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması	5
1.1.4. Absans epilepsi	8
1.2. Epilepsiye Neden Olan Faktörler	10
1.2.1. Epilepside GABA'nın rolü	10
1.2.2. Epilepside kan-beyin-bariyerinin rolü	11
1.2.3. Glutamat ve epilepsi	13
1.2.4. Oksidatif stres ve epilepsi.....	13
1.3. Hayvan Modelleri.....	15
1.3.1. WAG/Rij sıçan modeli	16
1.4. Beyin Gelişimi.....	18
1.4.1. Beyin gelişiminde yaşın epilepsiye etkisi.....	18
1.5. Spektroskopinin Temelleri	19
1.5.1. Infrared (kızılötesi) spektroskopisi	23
1.5.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi.....	24
1.5.3. FT-IR Spektroskopisin avantajları ve uygulama alanları	25
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	27
2.1. Hayvan DeneYleri.....	27
2.2. FT-IR Spektroskopisi DeneYleri	27
2.3. Bradford Testi.....	28
2.4. TBARs Testi.....	28
2.5. Analiz	30
2.5.1. FT-IR spektral analizi	30
2.5.2. Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA).....	30
2.5.3. İstatistiksel analiz	31
3. BULGULAR.....	32
3.1. FT-IR Çalışmaları.....	32
3.1.1. 3050-2800 cm ⁻¹ frekans aralığı.....	33
3.1.2. 1800-900 cm ⁻¹ frekans aralığı.....	39
3.2. Biyokimyasal Testler.....	46
3.2.1. Bradford testi	46
3.2.2. TBARs testi	47
3.3. HCA analizi	48

4. TARTIŞMA	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63
EKLER.....	80
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	85
ÖZGEÇMİŞ	86



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Epilepsi sınıflandırması	7
Şekil 1.2.	Epilepsi nöbet tipleri sınıflandırması	8
Şekil 1.3.	Elektromanyetik ışınma	20
Şekil 1.4.	Vibrasyonel Enerji Seviye Diyagramı	21
Şekil 1.5.	Işın absorpsiyonu ve emisyonu	22
Şekil 1.6.	Elektromanyetik spektrum bölgeleri.....	22
Şekil 1.7.	Moleküler titreşim tipleri	24
Şekil 1.8.	FT-IR spektrometresinin enstrümantasyonu.....	25
Şekil 3.1.	Sıçan beyin doku örneklerinden elde edilen bir FT-IR spektrumu.....	32
Şekil 3.2.	3050-2800 cm^{-1} bölgeleri arasında 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının FT-IR spektrumları	35
Şekil 3.3.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının olefinik=CH gerilme bant alanı (A) ve olefinik/lipit alan oran (B) değerleri.....	36
Şekil 3.4.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH_2 asimetric (A) ve CH_2 simetric (B) bant frekans değerleri.....	37
Şekil 3.5.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH_2 asimetric (A) ve CH_2 simetric (B) bantlarının bant genişliği değerleri.....	38
Şekil 3.6.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH_2 asimetric (A) CH_2 simetric (B) bant alan değerleri.....	39
Şekil 3.7.	1800-900 cm^{-1} bölgeleri arasında 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının.....	41
Şekil 3.8.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının C=O bant alanı (A) ve C=O/lipit alan oran (B) değerleri.	41
Şekil 3.9.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının C=O bant frekans değerleri.....	42
Şekil 3.10.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının amid I (A) ve amid II (B) bant alanı değerleri.....	43
Şekil 3.11.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının lipit/protein alan oranı değerleri.	43
Şekil 3.12.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının COO^- simetric bant alanı değerleri.....	44
Şekil 3.13.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının PO_2^- simetric bant alanı değerleri.....	45
Şekil 3.14.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının PO_2^- bant frekans değerleri.....	45
Şekil 3.15.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının C-N-C bant alanı (A) ve RNA/protein alan oranı (B) değerleri.	46
Şekil 3.16.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij sıçan gruplarının protein miktarları.	47
Şekil 3.17.	2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij sıçan gruplarının MDA konsantrasyonları.	47
Şekil 3.18.	1729-1579 cm^{-1} spektral aralığın da 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının HCA dendogramı.	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Gelişmiş ülkelerde gerçekleştirilmiş bazı epilepsi insidans çalışma sonuçları (100.000 kişiye göre)	4
Tablo 1.2.	Gelişmekte olan ülkelerde gerçekleştirilmiş bazı epilepsi insidans çalışma sonuçları (100.000 kişiye göre)	5
Tablo 1.3.	Epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik sınıflandırması	6
Tablo 1.4.	IR spektrum bölgeleri	23
Tablo 2.1.	Standart eğri hazırlamada kullanılacak BSA konsantrasyonları.....	28
Tablo 2.2.	Standart eğri hazırlamada kullanılacak MDA konsantrasyonları	29
Tablo 3.1.	Literatüre dayalı sıçan beyninin FT-IR spektrumunun ortalama bant frekansları ve bantların tanımlanması.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

E	: Enerji, (Joule)
λ	: Dalga Boyu, (Nanometre)
V_{vib}	: Vibrasyonel Frekans, (Hertz)
ΔE	: İlgilenilen Enerji Seviyeleri Arasındaki Ayrım, (kJ/K mol)
c	: Işık Hızı, (metre/saniye)
h	: Planck Sabiti, (joule/saniye)
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram

Kısaltmalar

AA	: Araşidonik Asit
AE	: Absans Epilepsi
AEİ	: Antiepileptik İlaç
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil- 4-izoksazol propiyonik asit
BSA	: Sığır Serum Albümin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EEG	: Elektroensofalogram
FT-IR	: Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi
GABA	: Gama Amino Butirik Asit
GLUT	: Glikoz Taşıyıcısı
ILAE	: International League Against Epilepsy (Uluslararası Epilepsi Ligi)
IPSP	: İnhibitör Postsinaptik Potansiyelleri
KBB	: Kan-Beyin-Bariyeri
KBr	: Potasyum Bromür
MDA	: Malondialdehit
NMDA	: N-metil-D-aspartat
nRT	: Talamik Retiküler Çekirdek
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SWD	: Ani Diken-Dalga Deşarj
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARs	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
WAG/Rij	: Wistar Albino Glaxo from Rijswijk
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

WİSTAR VE WAG/Rij (ABSANS EPİLEPSİLİ) SIÇANLARDA BEYİN DOKUSUNDAKİ YAŞA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN FT-IR SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ

ÖZET

Epilepsi tedavisine yönelik çalışmalarda kullanılan Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) sıçanlarda 2 aylıktan 6 aylığa kadar absans nöbetler tam olarak görülmezken, 6 aylıktan itibaren spontan diken dalga deşarjları ile karakterize nöbetler tam olarak görülür. Bu sıçanların epileptogenezinde büyümeyle birlikte beyin gelişimine bağlı bazı faktörlerin rol oynadığını kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. Fakat yine de WAG/Rij sıçanlarda nöbetleri oluşturan epileptojenik mekanizmalar tam olarak açıklanamamaktadır. Konuya katkı sağlamak amacıyla çalışmamızda 2 ve 6 aylık WAG/Rij sıçanların beyinleri, 2 ve 6 aylık Wistar sıçanların beyinleri ile karşılaştırılmalı olarak Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ile incelendi. Ayrıca spektroskopik sonuçları desteklemek amacıyla Bradford ve TBARs testleri çalışmaya dahil edildi. Çalışma kapsamında, olefinik, CH₂ asimetrik, CH₂ simetrik, amid I, amid II, C=O, PO₂⁻ simetrik ve RNA bantlarının frekans ve alanları analiz edildi. Spektral analizlere göre, Wistar grupları ile karşılaştırıldığında, WAG/Rij gruplarında olefinik, CH₂ asimetrik, CH₂ simetrik ve C=O bantlarının alanlarındaki anlamlı düşüş (p<0.05) doymamış ve doymuş lipidlerde, kolesterol esterlerinde, fosfolipitlerde ve triaçilgliserollerde azalma olduğu bulgusunu verdi. Ayrıca, amid I ve amid II bant alanlarındaki anlamlı düşüş (p<0.05) protein miktarında bir azalma olduğunu gösterdi. CH₂ asimetrik bant genişliğinde daralma zar akışkanlığında düşüş olduğu, PO₂⁻ simetrik ve CH₂ asimetrik frekanslarındaki değişiklikler ise zar lipidlerinin paketlenme derecelerinde farklılık olduğu bilgisini verdi. Hiyerarşik kümeleme analiziyle (HCA) spektral farklılıklara göre 2-6 aylık Wistar ve 2-6 aylık WAG/Rij grupları başarılı bir şekilde ayrıldı. Bu tez çalışması sayesinde WAG/Rij sıçanların epileptogenezinde rol oynayabilecek bazı moleküler değişiklikler biyofiziksel parametreler üzerinden FT-IR spektroskopi metodu ile tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Bradford, Epilepsi, FT-IR, HCA, TBARs.

INVESTIGATION OF AGE-RELATED CHANGES IN BRAIN TISSUE IN WISTAR AND WAG/Rij RATS BY FT-IR SPECTROSCOPY

ABSTRACT

Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) rats, used in the studies for treatment of epilepsy, have no complete absence seizure until 6 months age, whereas the seizures characterized by spontaneous wave discharges are seen from 6 months. Although, brain growth related factors which may play a role in the epileptogenesis of such rats were shown by some studies, the mechanisms of seizures cannot be fully explained. To provide information to this, 2 and 6 months WAG / Rij rat brains were analyzed by Fourier Transform Infrared spectroscopy in comparison to age matched Wistar rats. Bradford and TBARs tests were also performed. Olefinic, CH₂ asymmetric, CH₂ symmetric, amid I, amid II, C=O, PO₂ symmetric, RNA frequencies and areas were analyzed. When compared to Wistars, significant decrease ($p < 0.05$) in the areas of olefinic, the CH₂ asymmetric, the CH₂ symmetric and C=O modes revealed a reduction in unsaturated and saturated lipids, cholesterol ester, phospholipid and triacylglycerol. Additionally, significantly lowered ($p < 0.05$) the amide I and amide II band areas suggested a decrease in the amount of protein. The reduction in the CH₂ asymmetric bandwidth resulted in a decrease in membrane fluidity, while the shiftings in frequencies of PO₂ symmetric and CH₂ asymmetric bands showed differences in membrane package. Hierarchical clustering analysis separated Wistar and WAG / Rij groups depending on spectral differences. Hence, some molecular changes that may play a role in the epileptogenesis of WAG/Rij rats were determined by FT-IR spectroscopy method on biophysical parameters.

Keywords: Bradford, Epilepsy, FT-IR, HCA, TBARs.

GİRİŞ

Epilepsi, her yaştan insanı etkileyebilen, bulaşıcı olmayan, kronik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) son verilerine göre dünya çapında 50 milyondan fazla epilepsi hastası olduğu tahmin edilmektedir. Bu durum epilepsiyi en yaygın olarak görülen nörolojik hastalıklardan biri haline getirirse de epilepsinin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmediğinden kesin olarak bir tedavisi yoktur (Yuen ve diğ., 2018; Niso ve diğ., 2015).

Absans epilepsi (AE), çocukluk çağı idiopatik jeneralize nöbetlerin sık görülen bir formudur. Nöbetlerin başlangıç yaşı 4 yaş ile 10 yaş (en sık 5-7 yaş) arasında olup, hasta grubunda çok belirgin kız cinsiyet baskınlığı dikkat çekmektedir. (K.E: %11,4-%2.5) (Waalers ve diğ., 2000; Berg ve diğ., 1999). Epilepsi ile yaşayan kişilerin % 70'inin doğru teşhis ve tedavi edildiğinde nöbetsiz yaşayabileceği tahmin edilmektedir. Epilepsi tedavisine yönelik çalışmalar kapsamında geliştirilmiş olan hayvan modellerinden biri olan Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) sıçanlar, genetik olarak AE'de görülen absans nöbetleri spontan olarak geçirirler (Fedosova ve diğ., 2015; Coenen ve diğ., 2014). WAG/Rij sıçanlarda 2 aylıktan 6 aylık yaşına gelene kadar absans nöbetler tam olarak görülmezken, sıçanlarda 6 aylıktan itibaren absans nöbetlerin tam olarak görülmesi, bu sıçanların epileptogenezinde büyümeyle birlikte beyin gelişiminin ve buna bağlı bir takım faktörlerin rol oynadığı bazı çalışmalarla kanıtlanmıştır (Sitnikova 2011; Holmes ve diğ., 2001). Fakat bu çalışmalara rağmen WAG/Rij sıçanlarda absans nöbetleri oluşturan epileptojenik mekanizmalarda rol oynayan faktörler tam olarak açıklanamamaktadır (Yuen ve diğ., 2018) ve yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda yaşa özgü epilepsi moleküler mekanizmaları, erken yaşam nöbetleri ve antiepileptik ilaç (AEİ) tedavisinin beyin olgunlaşması üzerindeki potansiyel sonuçlarının bilinmesi, çocukluk dönemi epilepsilerinin yaş bağımlılığını daha iyi anlamaya ve yaşa uygun tedavileri optimize etmeye yardımcı olacaktır. Bu konuya moleküler anlamda katkı sağlamak amacı ile 2 ve 6 aylık WAG/Rij sıçanlarının beyinleri, epilepsili olmayan 2 ve 6 aylık Wistar sıçanlarının beyinleri ile

karşılaştırmalı olarak Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ve Bradford, TBARs biyokimyasal testleri ile incelendi. FT-IR analizlerinde lipit düzeni, lipit akışkanlığı, lipit paketlenmesi ve protein miktarı gibi parametereler, Bradford testinde protein miktarı ve son olarak tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARs) testinde ise lipit peroksidasyonu son ürünlerinden biri olan malondealdehit (MDA) miktarındaki değişimler araştırıldı. Böylelikle yaşla birlikte beyin gelişimine bağlı olarak meydana gelen bazı değişimlerin WAG/Rij sıçanların epileptogenezindeki olası etkilerinin ortaya konması amaçlandı.



1.GENEL BİLGİLER

1.1.Epilepsi

Epilepsi, tekrarlayan, spontan, beyin nöbetleri ile karakterize en yaygın görülen kronik nörolojik hastalıklardan biridir (Berkovic ve diğ., 2001; Hinose ve diğ., 2000). Bilinen en eski beyin hastalığı olmasına rağmen hala epilepsinin temel patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır (Yuen ve diğ., 2018; Niso ve diğ., 2015; Artur ve diğ., 2014). Genel olarak, nöral devrelerde uyarılma ve inhibisyon arasındaki dengesizlik, epilepsinin ve epileptik nöbetlerin önde gelen mekanizması olarak kabul edilir (Noebels, 2015; Steinlein, 2004). Bir başka deyişle, sinaptik iletimi ve nöronal uyarılabilirliği yöneten faktörler olan, nörotransmitter reseptörlerinin ve taşıyıcılarının ekspresyonu ve moleküler bileşimi, nöromodülatör peptidler ve nöropeptid reseptörleri, voltaj kapılı iyon kanalları ve iyonik homeostaz mekanizmaları dahil olmak üzere epileptogeneze katkı sağlayan pek çok faktör vardır (Sanchez ve Jensen, 2001). Normal olarak, uyarıcı/önleyici denge, nöronal hiper-stabilite durumunu önleyebilen ve epileptik akıntıları önleyen bir homeostatik mekanizma ile kontrol edilir (Sitnikova, 2011; Hartmann ve diğ., 2008). Ancak bunun tam tersi olarak, epilepsi, anormal derecede yüksek nöronal uyarılabilirlikle ilişkili nörolojik bir hastalıktır.

Epilepsi, her yaştan, ırktan ve cinsiyetten hastaları etkileme kabiliyetine sahip olan öngörülemeyen frekans nöbetleri ile karakterizedir. Bu nöbetlerin hastanın fiziksel ve psikolojik durumu yanında, onun yaşam kalitesini de ciddi şekilde etkileyebilecek çeşitli tipleri bulunur. Epileptik nöbetlerin kesin teşhisi sıklıkla zordur, ancak elektroensefalogramdaki (EEG) gelişmeler epileptik olayların tanı oranını büyük ölçüde arttırmıştır (Baysal-Kirac ve diğ., 2016; Wyman ve diğ., 2016). Bu nedenle, kesin patogeneze epilepsiye neden olan moleküler mekanizmaların araştırılması nihayetinde tanıyı iyileştireceği ve daha etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesinde yardımcı olacağı düşünülmektedir.

1.1.1.Epilepsi insidansı

Epilepsi dünya çapında yaklaşık 65 milyon kişiyi etkileyen ciddi bir nörolojik hastalıktır (Shangguan ve diğ., 2018). Epilepsi insidansı ile ilgili sınırlı sayıdaki çalışmalarda kullanılan çeşitli metodolojiler vardır. Gelişmiş ülkelerde gerçekleştirilmiş insidans çalışmalarından bazıları Tablo 1.1’de verilmiştir. Bu çalışmalar tüm yaş gruplarını içine almaktadır. Endüstrileşmiş ülkelerde genellikle insidans değerleri 20-70/100.000 arasında değişmektedir (Scheffer ve diğ., 2017). Gelişmekte olan ülkelerde ise yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur (Tablo 1.2.). Bunlardan bazıları Şili, Tanzanya, Etiyopya, Ekvator ve Honduras çalışmalarıdır (Medina ve diğ., 2005; Rwiza ve diğ., 1992; Placencia ve diğ., 1992; Tekle ve diğ., 1990). Bu ülkelerde izlenen insidans 64-122/100.000 civarındadır. Bu oranlar gelişmiş ülkelere göre daha yüksektir. Sosyoekonomik sebeplere bağlı olarak çalışmaları sağlıklı bir biçimde kıyaslamak mümkün olmamasına karşın elde edilen sonuçlar kıtalara göre dağıtıldığında gelişmiş ülkelerin bulunduğu Avrupa ve Kuzey Amerika kıtasında epilepsi insidansının dünyadaki diğer bölgelere oranla daha düşük olduğu izlenimi elde edilmektedir. Irklar arasında ise epilepsi insidansı açısından bir farklılık izlenmemiştir (Hauser ve diğ., 1998). Dünya nüfusunun önemli bir kısmının Asya, Afrika ve Güney Amerika’da yaşadığı düşünülecek olursa epilepsinin ne ölçüde önemli ve yaygın bir sağlık problemi olduğu görülmektedir (de Bittencourt ve diğ., 1996).

Tablo 1.1. Gelişmiş ülkelerde gerçekleştirilmiş bazı epilepsi insidans çalışma sonuçları (100.000 kişiye göre)

Ülke	Çalışmacılar	Sene	Sonuç
İtalya	Granieri ve diğ.	1983	33
Danimarka	Joensen ve diğ.	1986	43
Fransa	Loiseau ve diğ.	1990	24
ABD	Hauser ve diğ.	1993	44
İngiltere	Cockeeell ve diğ.	1996	23

Tablo 1.2. Gelişmekte olan ülkelerde gerçekleştirilmiş bazı epilepsi insidans çalışma sonuçları (100.000 kişiye göre)

Ülke	Çalışmacılar	Sene	Sonuç
Polonya	Zielinski ve diğ.	1974	14
Çin	Li ve diğ.	1985	35
Şili	Lavados ve diğ.	1992	113
Ekvator	Placencia ve diğ.	1992	190
Tanzanya	Rwiza ve diğ.	1992	73
Etiyopya	Tekle-Haimanot ve diğ.	1997	64
Honduras	Medina MT ve diğ.	2005	92.7

1.1.2.Epilepsi prevalansı

Epilepsi hastalığında düşük insidans değerlerine karşın tüm kronik hastalıklarda olduğu gibi prevalans, geçen yıllar içerisinde giderek artış gösterir ve yüksek değerlere sahiptir. Epilepsi ile ilgili prevalans çalışmaları büyük popülasyonlarda gerçekleştirilmeleri gerekmediği için insidans çalışmalarına göre daha çok sayıdadır. Çok farklı sonuçlar olmasına karşın gelişmiş ülkeler için ortalama epilepsi prevalansının 6/1000 olduğu ve WHO protokolü ile gerçekleştirilen prevalans çalışmalarında gelişmekte olan ülkelere bu oranın ortalama 18.5/1000 olduğu hesap edilmektedir (de Bittencourt ve diğ., 1996). Ancak sonuçlar büyük değişiklikler göstermektedir. Bu değişiklikler metodolojik farklılıklara bağlı olabileceği gibi etnik, coğrafi farklılıkların prevalansa etkilerini de yansıtır olabilir.

1.1.3.Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması

1960 yılında uluslararası epilepsi uzmanlarının toplanması ile ilk kez epileptik nöbetlerin sınıflandırma çalışmaları başlamıştır. Uluslararası Epilepsi Ligi (International League Against Epilepsy, "ILEA") sınıflama komisyonunun uzun yıllar süren çalışmalarının sonucunda hazırlanan ve bugün halen kullanılan, 1981 epileptik nöbetlerin, 1989 epilepsiler ve epileptik sendromların sınıflandırılması, uzun yıllardır tüm dünyada kabul görmüş ve bu tanımlamada ortak bir dil haline gelmiştir. ILAE sistemindeki epilepsi sendromlarının sınıflandırılması, lezyonun yerine (lokalize ve jeneralize) ve bilinen veya şüphelenen nedene (idiyopatik, semptomatik veya kriptojenik) gibi iki farklılığa bağlıdır.

Tablo 1.3. Epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik sınıflandırması, (ILAE 1989).

FOKAL (PARSİYEL) EPİLEPSİLER
İdyopatik (başlangıç yaşına göre) Sentro temporal diken dalgası veren çocukluk çağı selim epilepsisi Oksipital-paroksizmal çocukluk çağı epilepsisi Primer ‘‘okuma’’ epilepsisi
Semptomatik Kojewnikow sendromu (sürekli parsiyel epilepsi) Belirli uyarılarla gelişen epilepsiler Temporal lob epilepsisi Frontal lob epilepsisi Pariyetal lob epilepsisi Oksipital lob epilepsisi
Kriptojenik fokal epilepsiler
JENERALİZE EPİLEPSİLER
İdiopatik (başlangıç yaşına göre) Selim familial neonatal konvülsiyonlar Selim neonatal konvülsiyonlar Çocukluk çağı selim miyoklonik epilepsisi Piknolepsi Juvenil absans Juvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit mal) Uyanınca gelişen tonik klonik (grand mal) epilepsi Belirli uyarılarla gelişen epilepsiler
Kriptojenik/sempomatik (yaş sırasına göre) West sendromu (infantil spazm) Lennox-Gastaut sendromu Miyoklonik-astatik nöbetli epilepsi Miyoklonik absanslı epilepsi
Semptomatik Erken miyoklonik ensefalopati Süpresyon ‘burst’ lü erken infantil epileptik ensefalopati Özgül sendromlar
FOKAL YADA JENERALİZE OLDUĞU BELİRLENMEYEN EPİLEPSİLER Neonatal konvülsiyonlar Çocukluk çağı ağır miyoklonik epilepsi Yavaş dalgalı uykuda beliren sürekli diken dalga bulgulu epilepsi Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)
DİĞER KONVÜLZİYON TÜRLERİ Çevresel nedenlere bağlı konvülsiyonlar Febril konvülsiyonlar İzole epileptik statüs Akut metabolik etkilere bağlı konvülsiyonlar

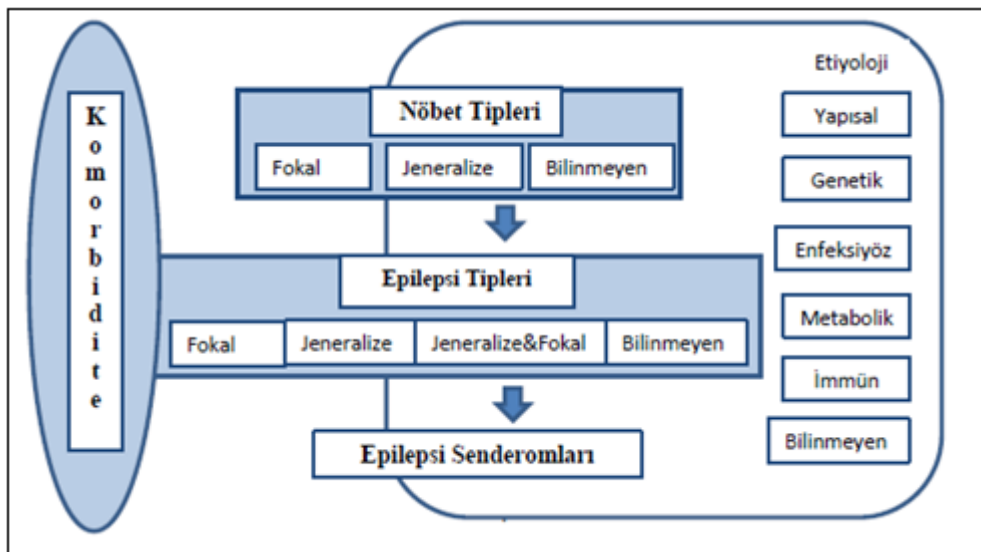
ILAE sistemindeki epilepsi sendromlarının sınıflandırılması, lezyonun yerine (lokalize ve jeneralize) ve bilinen veya şüphelenen nedene (idiyopatik, semptomatik veya kriptojenik) gibi iki farklılığa bağlıdır.

Lokalize epilepsiler fokal hastalıklardan, jeneralize epilepsiler ise tüm korteksi etkileyen hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Sebep, tümör gibi belirgin bir yapısal lezyon yada mikroskobik olarak sadece nörotransmisyonun bir bozukluğuda olabilir.

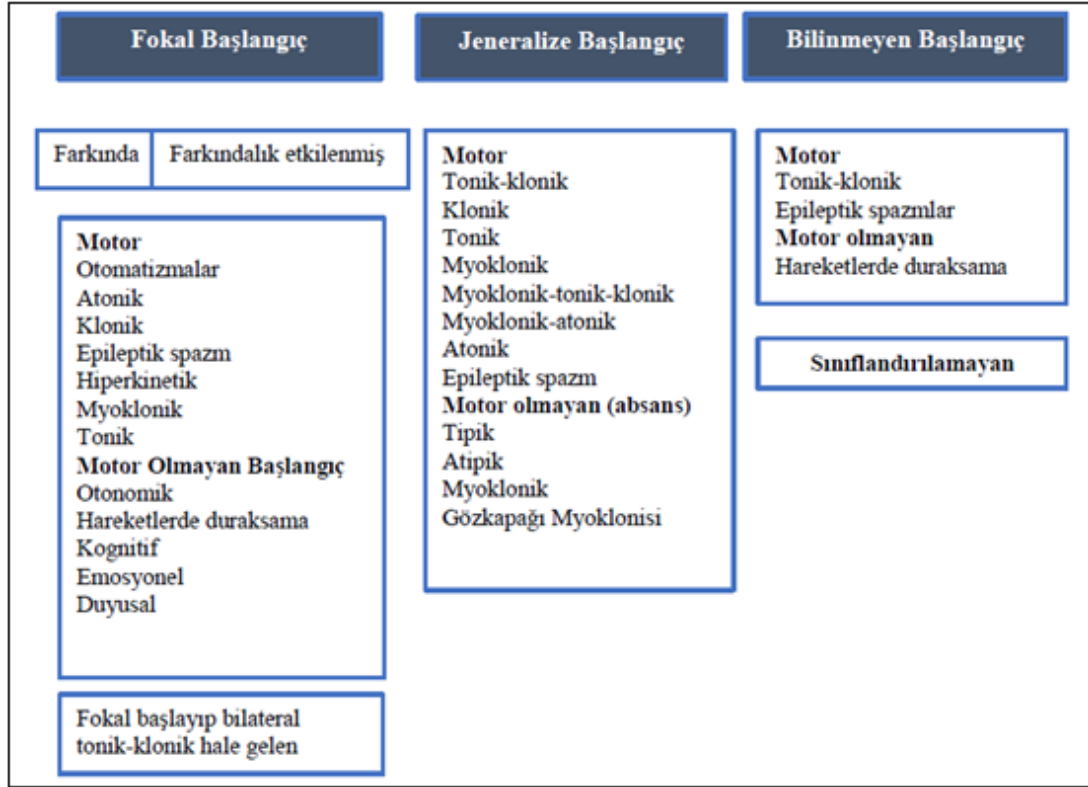
İdiyopatik epilepsiler, genellikle kalıtsaldır ve yapısal anomalilerle ilişkili olmadan nörotransmisyondaki anormalliklerden kaynaklandığı varsayılmaktadır.

Semptomatik epilepsiler, bilinen yapısal hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Yapısal bozukluklar, malformasyon, tümör ve travma gibi genelde nörogörüntüleme belirgin olan olgulardır.

Ancak günümüzde, nöbet temellerinin anlaşılması, video EEG'nin yaygın kullanımı, moleküler biyoloji ve genetik alanındaki ilerlemeler ve nörolojik görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler ile birlikte 1981 ve 1989'da yayınlanmış olan sınıflandırmalar yetersiz kalmıştır. ILAE sınıflama komisyonları aracılığıyla 4-5 yılda bir (2001, 2006, 2010 ve 2017) en son bilgilere göre güncellemek amacı ile öneriler sunulmuştur. 2017 yılı için önerilen sınıflandırma Şekil 1.1.'de ve genişletilmiş hali Şekil 1.2. 'de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Epilepsi sınıflandırması, (ILAE, 2017; Scheffer ve diğ., 2017)



Şekil 1.2. Epilepsi nöbet tipleri sınıflandırması (ILAE 2017, Scheffer ve diğ., 2017)

1.1.4. Absans epilepsi

AE, fiziksel aktivitenin durmasıyla birlikte geçici bir bilinç değişikliği ile ilişkili olan genel konvülsif olmayan nöbetler ile karakterize özel bir epileptik sendromdur. Absans nöbetlerine insanlarda genellikle hafif otomatizmalar veya uzuvlarda ve göz kapaklarında ılımlı tonik veya klonik komponentler eşlik eder (Panayiotopoulos, 1999). Bir dizi farklı yöntem kullanarak yapılan son araştırmalar, primer somatosensoriyel kortekste başak ve dalga deşarjlarının başladığını ve daha sonra hızlı bir şekilde motor kortekslere ve talamik çekirdeklere yayıldığını göstermiştir. Daha spesifik olarak, in vivo elektrofizyolojik hücre içi kayıtlar, korteksin derin tabakalarının piramidal nöronlarının, absans nöbetlerinde iktojenik nöronlar rolleri lehine hızlı aktivasyon, hipersensitivite ve hiper senkronize edici özellikler sergilediğini göstermiştir. Ayrıca, beyin olgunlaşması sırasındaki çalışmalar, bu özelliklerin ileri gelişimini göstermektedir (Depaulis ve Charpier, 2017). Bu nöbetler önce 5-7 yaş arasında ve düzenli olarak sessiz uyanıklık, dikkatsizlik ve uyku ile uyanma arasındaki geçişlerde ortaya çıkar. Genellikle 10-20 saniyeden daha az dayanırlar, ancak bazı hastalarda çok sık ortaya çıkabilirler.

AE'sisinde iki temel özellik vardır. Birincisi klinik belirtidir: ani ve bilincin kısa bozulması (yokluk) şeklindedir. Nöbet sırasında devam eden aktivite kesintiye uğrar, cevap verilebilirlik azalır ve zihinsel işlevsellik bozulur. Gözlerin ve periyodik otomatizmlerin sadece minimal bir miyoklonik bölümü vardır. Bilinç seviyesindeki düşüş, nöbetler sırasında ortaya çıkan görsel ve işitsel uyarılmış potansiyeller ile gösterilir (Luijtelaar ve Sitnikova, 2006; Meeren ve diğ., 2001). İkinci belirti ise, elektroensefalografik bir işarettir, yani genelleştirilmiş 3–4 Hz ani diken-dalga deşarjlar olan (SWD'ler) “bütün beyni istila eden” karakteristik paroksizmal elektriksel aktivitedir (van Luijtelaar ve diğ., 2011; Sitnikova ve diğ., 2009; van Luijtelaar ve Sitnikova, 2006). Vakaların %50'sinde tipik diken dalga morfolojisi görülürken diğerlerinde tek diken, çoklu diken veya irregüler jeneralize diken dalga aktiviteleri gözlemlenebilmektedir (Yıldız ve diğ., 2018; Panayiotopoulos ve diğ., 1989).

AE'li hastalarla yapılan klinik çalışmalar, dikkat, duygusal ve davranışsal değişikliklerin yanı sıra (Vega ve diğ., 2011; Bhise ve diğ., 2010; Hermann ve diğ., 2008) genel bilişsel gerileme (Pavone ve diğ., 2001), visiyospatik disfonksiyon, dil problemleri (Pothion ve diğ., 2004), sözel olmayan ve kısa süreli sözel hafıza bozukluğu (Bhise ve diğ., 2010; Pothion ve diğ., 2004) dahil olmak üzere bilişsel bozuklukların varlığını göstermektedir. Bu çalışmaların birçoğu yeni ortaya çıkan nöbet geçiren ilaçlı olmayan hastalarla yapılmış çalışmalardır (Balcı ve diğ., 2012; Bhise ve diğ., 2010; Hermann ve diğ., 2008).

AE'nin ortaya çıkışında güçlü bir genetik yatkınlık da söz konusudur. Çalışmalarda, vakaların %15-45'inde aile öyküsü pozitif iken ebeveynlerde epilepsi frekansı %42, kardeşte ise %20 olarak belirlenmiştir (Medina ve diğ., 2012).

AE çoğu zaman EEG'de ve diğer epilepsi formlarıyla paylaşılan davranış özelliklerinde genelleştirilmiş epilepsinin prototipik bir formu olarak kabul edilir (Depaulis ve Charpier, 2017). AE konusundaki mevcut mekanik bilgi temel olarak hayvan modellerinde yapılan deneylerden ve daha spesifik olarak da fareler ve sıçanlardaki genetik modellerden elde edilmektedir (Depaulis ve Charpier, 2017; Jarre ve diğ., 2017). Ayrıca, AE'nin sıçan modellerinde, SWD deşarjları EEG'de

kendiliğinden ortaya çıkar ve epileptik aktivite insidansı yaşla birlikte artar (Sitnikova ve diğ., 2014).

AE yaş bağımlı ve kendini sınırlayan bir epilepsi tipi olsa da gün içerisinde çok sayıda yinelemesi, nörokognitif fonksiyonlara olumsuz etkisi ve yaşam kalitesini bozması nedeniyle antiepileptik tedavi de gerektirmektedir (Sanchez ve Jensen, 2001; Nehlig ve diğ., 1999)

Bu çalışmada, tüm bunlar göz önüne alındığında yaş ile bağımlılığı bulunan bu epilepsi sınıfının, AE'li sıçan modelinde moleküler anlamda araştırılması amaçlandı.

1.2.Epilepsiye Neden Olan Faktörler

1.2.1.Epilepside GABA'nın rolü

Gama-aminobütirik asit (GABA) önemli bir inhibitör nörotransmitterdir ve postsinaptik GABA_A reseptörü ve presinaptik GABA_B reseptörü ile etkileşime girerek çalışır. Klinik çalışmalar GABA_A'nın epileptik nöbetleri sona erdirmeye kabiliyetine sahip olduğunu gösterirken, GABA_B reseptörü agonistlerinin, baklofen, ağırlaştırıcı hipereksitabilite ve nöbet olaylarına sebebiyet verdiği bilinmektedir. Ayrıca, deneysel kanıtlar, GABA'nın epilepsinin patojenik ve terapötik mekanizmalarında hayati bir rol oynadığını ve GABA_A reseptör agonistlerinin GABA aracılı inhibisyonu artırabileceğini göstermiştir (Yafei Shangguan ve diğ., 2018; Karayannis ve diğ., 2014; Treiman ve diğ., 2001).

Diğer epilepsi formlarında olduğu gibi, beyin GABA sistemindeki işlev bozukluklarının AE patogeneğinde çok önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Özellikle, bu nöbetlerden etkilenen insanlarda yapılan pek çok çalışmada, taşıyıcılar, enzimler, GABA_A ve GABA_B reseptör alt birimleri de dahil olmak üzere GABAerjik sistemin proteinlerini kodlayan çeşitli genlerle ilgili potansiyel anormallikler vurgulanmıştır (Bombardi ve diğ., 2018; Hirose, 2014; Crunelli ve Leresche, 2002). Ayrıca, GABA_A ve B reseptörlerinde olduğu gibi, kalsiyum (Ca²⁺) kanalları (CACNA1A, CACNA1H, CACNA1G, CACNA1I ve CACNG3), sodyum (Na⁺) kanalları (SCN1B, SCN1A), klor (Cl⁻) kanalları (CLCN2) mutasyonlarının AE ile ilişkisi gösterilmiştir (Yafei Shangguan ve diğ., 2018; Yıldız ve diğ., 2018; Yalçın, 2012). Yapılan in vivo çalışmalarda, GABAerjik mekanizmaların etkinliğinin,

epileptik olmayan Wistar kontrollerine kıyasla, WAG / Rij sıçanlarının fronto-parietal kortikal dilimlerinde önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Luhmann ve diğ., 1995). Talamokortikal nöronlar, reseptörler aracılığıyla GABA_A reseptörleri aracılığıyla talamik retiküler çekirdek (nRT) nöronlarında uyarıcı postsinaptik potansiyelleri (EPSP'ler) indükler. nRT nöronlarındaki düşük eşikli Ca²⁺ kanalları, Na⁺ kanallarının açılmasına neden olarak harekete geçmesini sağlar ve aksiyon potansiyellerini başlatır. Bu inhibitör nöronların aktivasyonu, GABA_A reseptörleri aracılığıyla talamokortikal nöronlarda inhibitör postsinaptik potansiyelleri (IPSP'ler) indükler. Bu engelleyici faz, bir süre boyunca devredeki patlama ateşlemesini ortadan kaldırır. Bu hiperpolarize durum sırasında, talamokortikal nöronlardaki düşük eşikli Ca²⁺ kanalları inaktivasyondan kurtulur. Ca²⁺ kanalları, membranı depolarize ederek hücreyi bir sonraki eylem potansiyeli patlaması için açar. Bununla birlikte, bu devrede anormal aktivite, eksitator ve inhibitör aktivitenin dönüşümlü döngülerini bozarak 3-4 Hz başak dalga deşarjlarına yol açabilir. Örneğin, korteks veya talamokortikal bölgedeki artmış eksitator aktivite, nRT nöronlarının ateşlenmesinin daha uzun bir patlamasına yol açarak, talamokortikal bölgede G-protein ile bağlanmış potasyum (K⁺) kanalları yoluyla GABA_B reseptörlerinin aracılık ettiği daha uzun IPSP'lere neden olacaktır. Bu uzun hiperpolarize durum sırasında, kalsiyum kanalları açılır, her döngüde birkaç aksiyon potansiyeli başlatır, bu da paroksizmal sivri ve yavaş dalga deşarjları ile sonuçlanır (Yalçın, 2012).

1.2.2.Epilepside kan-beyin-bariyerinin rolü

Kan-beyin bariyerinin (KBB) başlıca görevi santral sinir sistemini korumaktır (Gültürk ve diğ., 2007; Johnson ve Gross, 1993). Beyin kapiler kan damarlarının endotel hücreleri tarafından oluşturulan KBB, santral sinir sistemindeki fizyolojik fonksiyonların sürdürülebilirliği için gerekli olan bir difüzyon bariyeridir (Abbott ve diğ., 2010; Ballabh ve diğ., 2004). KBB sahip olduğu hem transselüler hem de paraselüler taşıma mekanizmalarını sıkı bir şekilde kontrol ederek beyne madde geçişini sınırlar, ancak ihtiyaç duyulan maddelerin geçişine izin verir.

Epilepside KBB'nin bozulması sonucu beyne kan kaynaklı maddelerin geçişinin arttığı bilinmektedir (Morin-Brureau ve diğ., 2013; Friedman, 2011). Epileptogeneze neden olan moleküler olayların daha iyi anlaşılabilmesi ve tedavilerin geliştirilebilmesi açısından KBB'nin epilepsideki rolünün bilinmesi oldukça

önemlidir. Nöbetlerin ortaya çıkışında KBB neden ya da sonuç olarak bu süreç içinde yer alabilir. KBB'nin nöbetlere verdiği yanıtla ilgili öncü deneysel çalışmalarda, nöbetin odağını oluşturan beyin bölgelerinde KBB bütünlüğünün kaybolduğu ve bariyer tip damarların geçirgenliğinde artış meydana geldiği ortaya konulmuştur (Cornford ve Oldendorf, 1986; Hedley-Whyte ve diğ., 1977). Ayrıca, deneysel ve klinik veriler KBB'nin bütünlüğünde meydana gelen bir bozukluğun epilepsi gelişiminde ve ilerlemesinde kritik bir rolü olduğunu göstermiştir (Van Vliet ve diğ., 2015; Friedman ve diğ., 2012) ve epilepsili hastalarda KBB'nin zayıfladığı iyi bilinen bir olgudur (Van Vliet ve diğ., 2016; Mihaly ve Bozok, 1984).

Elektron mikroskopik bulgular epileptik beyinde pinositik aktivitenin arttığını, sıkı bağlantı yapılarındaki değişiklikleri ve kapiler bazal membranın fizyolojik koşullara göre daha ince bir hal aldığını göstermiştir (Marchi ve diğ., 2012; Ahishali ve diğ., 2010; Westergaard ve diğ., 1978). Glukoz ve beyin iyon hemeostazisinin de KBB ile ilişkili olduğu ve hayvan çalışmalarında nöbetleri takiben bariyer tip endotel hücrelerine yerleşik olan glukoz taşıyıcısı (GLUT) -1'in yapımında artış olduğu (Sheen ve diğ., 2011; Cornford ve diğ., 2000), insan beyni kortikal alanlarından elde edilen kesitlerde GLUT-1 ekspresyonunda belirgin bir azalma olduğu, pozitron emisyon tomografisi verilerinde ise epileptik alanlarda hipometabolizma ve beyin glukoz alımında azalmanın olduğu gösterilmiştir (Marchi ve diğ., 2012; Cornford ve diğ., 1998 ab). KBB patolojilerinde GLUT-1 eksikliğin patolojik olarak beyin enerji seviyeleri ve fonksiyonu ile etkileşime girdiği ve bozulmuş olan KBB yapısı ile birlikte nöbetleri teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Janigro, 1999). Diğer yandan, beyin inflamasyonu, transkripsiyonel değişiklikler, astroglizis ya da hasarlanmış potasyum tamponlanması gibi astrosit aktivitesini değiştirebilecek durumlar nedeniyle meydana gelen KBB zayıflaması sonucunda uyarılabilirliğin artması ve epilepsinin ortaya çıkması mümkün olabilmektedir (Van Vliet ve diğ., 2016; Weissberg ve diğ., 2015; Kim ve diğ., 2012).

Sonuç olarak, KBB bütünlüğündeki bir bozulma beyinin nöronal uyarılabilirliğini etkileyebilir ve epileptogenezin ortaya çıkmasına sebep olabilir. Aynı zamanda, nöbetler de beyinde nöronal uyarılabilirliğe, anjiyogeneze, enflamasyonda artışa, metabolik enzimlerin ve çoklu ilaç direnci proteinlerin ekspresyonunun artmasına neden olur ve bu durum döngüsel bir şekilde yaşam boyu devam edebilir (Gültürk ve

diğ., 2007; Cornford ve diğ., 2000). Bu patolojiyi durdurabilmek, nöbetleri önlemek veya ortadan kaldırmak için epilepsinin KBB’de meydana getirdiği değişikliklerin bilinmesi oldukça önemlidir (Cornford ve diğ., 2000).

1.2.3.Glutamat ve epilepsi

Glutamat, beyindeki ana uyarıcı nörotransmitterdir ve glutamat reseptörünün birçok alt tipi bulunmaktadır. Bunlar arasında *N* -metil - D - aspartat (NMDA), α -amino-3 - hidroksi-5-metil- 4- izoksazol propiyonik asit (AMPA) reseptörleri başlıca epileptik aktivitede role sahip olanlardır (Sanchez ve Jensen, 2001; Dingledine ve diğ., 1999; Wong ve diğ., 1999). AMPA reseptörleri, hızlı aktivasyon ve duyarsızlaştırma gösterdiklerinden hızlı uyarıcı sinyallemeye aracılık ederler ve istirahat membran potansiyelinin yakınında lineer olarak çalışırlar. NMDA reseptörleri, aktivasyonları eş zamanlı glutamat bağlanması ve membran depolarizasyonu gerektirdiğinden daha yavaş ve daha uzun süreli uyarma ile sonuçlandığından daha modülatör bir rol oynar. NMDA-reseptör kanalları Ca^{2+} 'ya karşı yüksek derecede geçirgendir (Na^+ ve K^+ ya ek olarak) ve Ca^{2+} 'nın NMDA reseptörlerinin girişi sinaptik fonksiyonu ve aktivite odaklı sinaptogenezi (Sanchez ve Jensen, 2001; Aamodt ve diğ., 1999) düzenleyen sinyal yollarını tetikleyebilir. NMDA reseptörlerinin kinetiği ve geçirgenlik özellikleri, iktal nöbet deşarjları ve hipoksik/iskemik nöron yaralanması (Chapman, 1998) gibi patofizyolojik süreçlerde kilit rol oynarlar. Doğumdan sonraki ilk haftalar, glutamat aracılı sinaptik plastisitenin arttığı ve bazı beyin bölgelerinin, glutamat reseptör agonistlerinin epileptojenik ve eksitotoksik etkilerine karşı yüksek duyarlılık sergilediği bir pencereyi temsil eder. Bu nedenle, fonksiyonel glutamat reseptörlerinin ekspresyonundaki artışın, postnatal erken gelişimde beyin uyarlabilirliğinin artmasında büyük bir rol oynamaktadır (Sanchez ve Jensen, 2001; Swann ve diğ., 1999).

1.2.4.Oksidatif stres ve epilepsi

Tüm biyolojik sistemler redoks dengesinde bulunur, oksidatif dengeyi sağlar ve yaşam için uygun koşulları sağlamak için reaksiyonları azaltır. Redoks homeostazındaki bozulmalar, aşırı üretim veya hücrel indirgeme kabiliyeti kaybı nedeniyle oksitleyici moleküllerin birikmesine neden olur. Her iki durumda, biriken oksitleyici maddeler, deoksiribo nükleik asit (DNA), protein ve lipitleri

oksitleyebilir, böylece yapılarını, etkinliklerini ve fiziksel özelliklerini değiştirebilirler. Bu tür yaygın oksidatif hasarın potansiyel ciddiyeti göz önüne alındığında, redoks dengesinin bozulması, potansiyel olarak hastalığa veya ölüme yol açan biyolojik homeostazın ciddi şekilde bozulmasına neden olabilir (Gaschler ve Stockwell, 2017). Savunma mekanizmalarının oksidatif hasara karşı azlığı ve yüksek oksijen tüketimi, nöronları oksidatif stres nedeniyle yaralanmalara karşı hassas kılmaktadır (Ruipérez ve diğ., 2010; Farooqui ve diğ., 2006). Beyin lipitleri arasında, doymamış yağ asitleri doymamış bağlarından dolayı oksidasyona karşı özellikle hassastır (Ruipérez ve diğ., 2010).

Serbest radikallerin en önemli etkisi, hücre zarının bozulmasına neden olan ve bunların yıkımına yol açan lipit peroksidasyonudur (Sudha ve diğ., 2001). Lipit peroksitler, hücrelerde oksidatif stres tarafından üretilen önemli bir biyomolekül sınıfıdır. Lipit peroksitleri birden fazla hastalık durumunda gözlenmiş olsa da, hastalığı ne ölçüde başlattıkları ya da diğer hastalıkları ne ölçüde etkiledikleri genellikle belirsizdir (Gaschler ve Stockwell, 2017).

Lipit peroksidasyonu, hücrel membranlarda doymamış yağ asitleri içeriğinde azalmaya, membran özelliklerinde değişikliklere yol açmaya, enzimatik aktiviteleri etkilemeye ve ayrıca reseptör fonksiyonlarının değişmesine sebep olmaktadır (Ruipérez ve diğ., 2010). Lipozomal membranlarda okside lipit konsantrasyonunun artırılmasının, membran akışkanlığında ve daha yavaş lateral difüzyonda ve buna bağlı olarak azalmaya neden olduğu bilinmektedir (Gaschler ve Stockwell, 2017; Borst ve diğ., 2000). Yapılan bir çalışmada, membran lipit peroksidasyonunun bazı epilepsi formlarına nedensel olarak dahil olabileceğini ve farklılıkların serbest radikal temizleyici enzim seviyelerinde meydana geldiğini göstermektedir (Cengiz ve diğ., 2000).

Proteinlerdeki oksidasyon ise, DNA ve lipitlerin serbest radikal aracılı hasarına ek olarak, oksidatif stresin önemli bir sonucu olduğu iyi bilinmektedir. Proteinlere (reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile) oksidatif modifikasyon, sıklıkla proteinin açılımı ve enzimatik kayıp ile birlikte görülür. Bu tür protein hasarının hücrel yaşayabilirlik üzerinde önemli bir etkisi vardır. Çoğu protein hasarı onarılamaz ve protein yapısı ve işlevi üzerinde zararlı sonuçlar doğurur (Grune ve diğ., 2001). Bir

dizi kemirgen ve sinek türünde yaşam beklentisi ve protein oksidasyonu arasında ters bir korelasyon olduğunun belirlenmesi tüm bu sonuçları kanıtlar niteliktedir (Grune ve diğ., 2001; Yasuda ve diğ., 1999; Sohal ve diğ., 1995). Ek olarak, hasar görmüş ve değiştirilmiş proteinler çapraz bağlar oluşturabilir, yaşa bağlı olarak birçok değişiklik için bir temel sağlayabilir ve bir dizi insan patolojisine katkıda bulunabilir (Höhn ve diğ., 2013). Hücreler bu nedenle oksidatif hasar görmüş proteinlerin uzaklaştırılması için verimli enzimatik sistemler geliştirmiştir (Grune ve diğ., 2001).

Oksidatif stres, epilepsinin patogenezinde olası mekanizmalardan biridir. Oksidatif stresin hücre içi kalsiyum homeostazisini yavaş yavaş bozduğu, nöronal uyarılabilirliğin, nöbet duyarlılığının ve ek stres ve nöron hücre kaybına karşı savunmasızlığa yol açtığı düşünülmektedir (Haznedar ve diğ., 2019). Mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ile yakından ilişkilidir ve edinilmiş kronik epilepsi gelişiminde önemli oldukları düşünülmektedir (Ambrogini ve diğ., 2019; Yuen ve diğ., 2018; Chang ve Yu, 2010; Waldbaum ve Patel, 2010). Bu çalışmalar, epilepsiye, oksidatif stresin aracılık ettiği hipotezini desteklemektedir (Meric ve diğ., 2016; Shin ve diğ., 2011). Lipitlerin, serbest radikallerin oluşturduğu hasara karşı en hassas biyomoleküller olduğu bilinmektedir. Bu durum beynin lipit bakımından zengin olması nedeniyle dokularda oksidatif strese karşı savunmasızlığını arttırmaktadır ve epilepsiyle olan ilişkisini açıklar niteliktedir. (Ambrogini ve diğ., 2019; Yis ve diğ., 2009). Ayrıca son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda muhtemelen tekrarlayan nöbetlerin olduğu hayvanların beyin dokularında lipit peroksidasyonunda bir artış olduğu gözlemlenmiştir. (Yuen ve diğ., 2018; Meric ve diğ., 2016; Arhan ve diğ., 2011).

1.3.Hayvan Modelleri

Hastalıkların fizyopatolojik yapılarının aydınlatılabilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin ortaya çıkarılması açısından birçok hayvan modeli kullanılmaktadır. Bunun en önemli sebebi insanlar üzerindeki deneylerin etik açıdan uygun olmayışıdır. Bu durumda hastalıklar hakkında yapılan araştırmalarda deneysel hayvan modelleri önemli bir rol üstlenmektedir.

İnsan epilepsisinin birçok önemli özelliğini özetleyen, bilinen mutasyonlarla birlikte birçok genetik kemirgen modeli ortaya çıkmıştır. Bu modeller, iktogenez ve

epileptogenezdeki spesifik bir mutasyonun rolü hakkında temel bilgiler sağlar. Ayrıca, bu modellerin birçoğu epilepsinin tedavisi ve önlenmesi için yeni hedeflerin doğrulanması için önemli bir araç olarak ortaya çıkmaktadır (Löscher, 2016).

AE'sinin ve nöbetlerinin pek çok deneysel genetik ve farmakolojik modelleri bulunmaktadır. Kimyasal olarak oluşturulan AE'nin nöbet modellerinden en yaygın olanları penisilin, düşük doz pentilenetetrazol (20 mg/kg), kolesterol sentez inhibitörü ve gama hidroksi-bütirat modelleridir (Onat ve diğ., 2013; Snead, 1988). Genetik AE'li modeller olan GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) ve WAG/Rij ise AE'nin gelişmesinde rol oynayan mekanizmaları aydınlatmak üzere yaygın olarak kullanılmaktadır (Fedosova ve diğ., 2015; Coenen ve diğ., 2014, Bazyan ve van Luijtelaar, 2013; Deneve, 2012, Coenen ve van Luijtelaar, 2003).

1.3.1.WAG/Rij sıçan modeli

WAG / Rij sıçanlar, Wistar kökenli ve yaygın olarak kullanılan geçerli bir AE genetik modelidir (Karimzadeh ve diğ., 2017; Fedosova ve diğ., 2015; Coenen ve van Luijtelaar, 2003). Wistar sıçanlarının 'inbred' olarak üretilmesiyle elde edilmiş sıçanlardır. WAG/Rij sıçanlarındaki absans nöbetleri kendiliğinden gelişir ve bunlara EEG'deki SWD'ler eşlik eder (Sitnikova, 2011). Genç yetişkin WAG/Rij sıçanları (2 aya kadar) epileptik akıntılarını ifade etmez ve bu yaşta sadece olgunlaşmamış SWD formları kaydedilebilir. SWD sayısının, nöbet aktivitesinin EEG özelliklerinin kademeli olarak değişmesine paralel olarak yavaş yavaş 2 ila 6 aylık arasında sıklığı ve süresi artar. WAG/Rij sıçanlarında, SWD en belirgin şekilde 6-7 aylıkken ifade edilir ve yaşlı sıçanlarda daha da belirginleşir (Sarkisova ve van Luijtelaar, 2011; Sitnikova, 2011; Coenen ve van Luijtelaar, 1987). Yaşla birlikte, SWD'lerin sayısı, süresi ve sıklığı artarken genlikleri değişmez. Ayrıca nöbet görülen hayvan sayısı yaşla bağlı olarak artar: 2 aylık WAG / Rij sıçanlarının %50'sinde tamamen gelişmiş SWD'ler gözlemlenirken, 6 aylık hayvanların %100'ü olgun SWD'leri (saatte yaklaşık 16-20) göstermektedir (Sarkisova ve van Luijtelaar, 2011; Coenen ve van Luijtelaar, 1987, Chahboune ve diğ., 2009). 6 aylık WAG/Rij sıçanlarında, saat başına SWD sayısında ve ortalama süre içinde yaşla bağlı bir artış vardır (Sarkisova ve van Luijtelaar, 2011).

Yapılan nörofizyolojik çalışmalarda, WAG / Rij sıçanları ile epileptik olmayan kontroller arasındaki somatosensoriyel kortekste eksitabilitede fonksiyonel farklılıklar gözlenmiştir (Luijtelaar ve Sitnikova, 2006). WAG/Rij sıçanlarının somatosensoriyel korteksindeki piramidal nöronların hiperpolarizasyonla aktive olan akımlarının doğal özellikleri, bu alanda diğer iki sıçan suşununkilerden (Wistar ve ACI) farklı olmuştur ve bu fizyolojik özelliklerin bu modifikasyonu nöronlara, azaltılmış bir protein ifadesi eşlik ettiği belirlenmiştir (Luijtelaar ve Sitnikova, 2006; Strauss ve diğ., 2004).

WAG / Rij sıçanlarının neokorteksindeki sinaptik ağ özelliklerinin epileptik olmayan Wistar kontrolleri ile karşılaştırıldığında bozulmuş olduğu bilinmektedir. Daha doğrusu, GABA-erjik inhibisyonunun etkinliği (hücre içi kayıtlarla ölçüldüğü gibi), fronto-parietal kortikal bölgelerde büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir. (Luijtelaar ve Sitnikova, 2006; Luhmann ve diğ., 1995). Bu durumun WAG / Rij sıçanlarında kortikal uyarılabilirliğin artması ve GABA-erjik inhibe edici sistemin etkinliğinin düşük olması, GABA-erjik nöronlarında daha az miktarda inhibitör nöron varlığı veya GABA metabolizmasının bozulmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Luijtelaar ve Sitnikova, 2006).

Ayrıca, AE genetik modellerinde yapılan bir dizi *in vitro* araştırma, voltaj kapılı iyon kanalları fonksiyonlarında bulunan nöronal uyarılma kabiliyetini, aktivitesini ve epileptik salınımları üretme eğilimini açıklayabilecek sinaptik sinyallemede bir dizi kusuru vurgulamıştır. Voltaj kapılı sodyum kanallarının mRNA'larının WAG /Rij'de arttığı bulunmuştur (Depaulis ve Charpier, 2017; Klein ve diğ., 2003). Bu, anormal membran depolarizasyonundan sorumlu kalıcı bir depolarize akıma (Crill, 1996) neden olabilir. Bu kanallarda bir artışın, epileptik hayvanlarda, olgunlaşmamış SWD'nin başlangıcından önce gözlemlenip gözlemlenmediği henüz belirlenmemiştir (Depaulis ve Charpier, 2017).

Genetik olduklarından, bu modeller, klinik durumlara yakın doğal bir geçmişe sahip bireyleri inceleme fırsatı sunar ve bu nedenle, insan AE'nin patofizyolojisini ve yaşamdaki evrimini anlamak için ideal koşulları sağlar (Depaulis ve Charpier, 2017). Tüm bu literatür verileri dikkate alındığında, WAG/Rij sıçanlardaki yaşa bağlı

değişiklikleri 2 ve 6 aylık sıçanlarda FT-IR spektroskopisinde karşılaştırmalı olarak inceleyip moleküler değişiklikleri hakkında bilgi sunmaktayız.

1.4.Beyin Gelişimi

Beyin gelişimi doğumdan sonra hatta ergenlik döneminde devam eden sürekli bir süreçtir (Mengler ve diğ., 2013). İnsan beyninin yaşamın ilk yıllarındaki gelişimini anlamak, hem temel bilim hem de toplumsal ve eğitimsel konulara uygulanması için kritik öneme sahiptir (Haartsen ve diğ., 2016). Beyin gelişiminin dinamik aktivitesinin çoğu uterusda meydana gelir ancak değişiklikler doğumdan sonraki ilk iki yıl boyunca devam eder. Bu noktada, beyin yetişkin ağırlığının % 80'ine ulaşmıştır (Casey ve diğ., 2000; Kretschmann ve diğ., 1986). Toplam beyin hacmi, yaşamın ilk yıllarında artar ve daha sonra nispeten sabit kalır. 6 yaşına geldiğinde, beynin toplam büyüklüğü yetişkin büyüklüğünün yaklaşık% 90'ı kadardır (Mills ve diğ., 2016; Giedd ve diğ., 2012). Beyindeki bölgesel olgunlaşma değişiklikleri ergenlik boyunca ve yetişkinliğe kadar devam eder.

1.4.1.Beyin gelişiminde yaşın epilepsiye etkisi

Epileptik nöbetler, çocuklarda en sık görülen ve korkutucu nörolojik hastalıklardan biridir. Çocuklarda nöbet insidansı yetişkinlerden daha yüksektir ve yaşamın ilk yılında en yüksek oranda görülmektedir (Hauser, 1995). Her ne kadar yaş grupları arasında hastalığın birçok ortak özelliği olsa da, epilepsinin hem patogenezinde hem de sonuçlarında küçük çocuklar ve yetişkinler arasında da önemli farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. Yaş, epilepsi risk faktörleri için önemli bir belirteçtir ve yaş beyin olgunlaşmasının bir sebebi olarak, epilepsili hastalarda nöbet bozukluğunun spesifik özelliklerinin bir belirleyicisidir (Hauser, 1992).

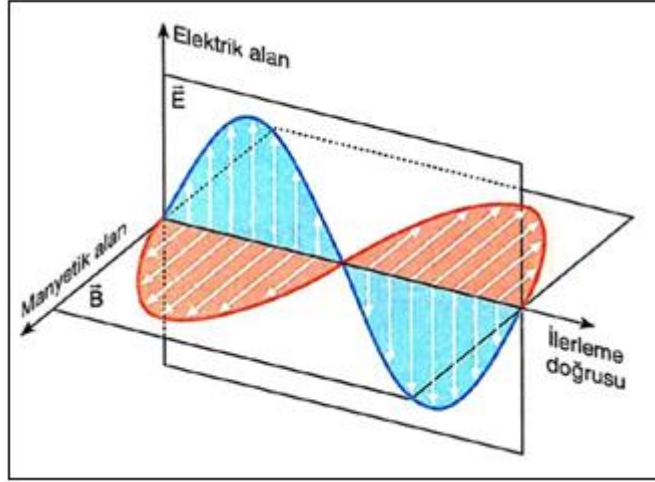
En yüksek nöbet riski, yaşamın ilk on yılında ortaya çıkar. Nöbetlere karşı artan bu duyarlılık, uyarıcı ve önleyici süreçler arasındaki gelişimsel dengesizlik ile ilgilidir. Olgunlaşmamış beyin, nöbet kaynaklı hasara karşı olgun beyinden daha az korunmasa da, nöbetler tarafından kalıcı olarak değiştirilen bazı gelişimsel süreçler vardır (Holmes ve diğ., 2001).

Olgunlaşmış beyin erişkin beyninden nöbetlere, nöbet özelliklerine ve AEİ'lere karşı verilen yanıtlara duyarlılığı bakımından birbirinden ayrılır. Hayvan modellerinden

elde edilen kanıt epileptik sendromların ve özellikle erken yaştaki epileptik tabloların beynin normal olgunlaşmasını değiştirebileceğini göstermiştir (Sanchez ve Jensen, 2001). Ayrıca klinik deneyimler, beyin olgunlaşması ve epilepsi arasındaki ilişkiyle ilgili bazı temel prensipleri ortaya koymaktadır. İlk olarak, olgunlaşmamış beyin, yetişkin beynine kıyasla nöbetlere daha hassastır. İkincisi, olgunlaşmamış beyin AEİ tepkisi daha değişkendir ve erken yaşamda uzun süreli AEİ tedavisi beyin gelişimini ters yönde etkileyebilmektedir. Üçüncüsü, erken yaşamdaki bazı nöbet türleri, kronik epilepsi olasılığının artmasıyla ilişkilidir ve epileptogenezise katkıda bulunabilir (Sanchez ve Jensen, 2001). Her ne kadar nöbet oluşma eşiği olgunlaşmamış beyinde erişkin beyinde olduğundan daha düşük olsa da, gelişen nöronlar, nöronal hasar ve hücre kaybı açısından, çok çeşitli patolojik değişikliklere karşı yetişkin nöronlarından daha az hassastır. Olgunlaşmış beyin, nöbetlerin patolojik sonuçlarına daha duyarlı oluşu, temel sinyalleme yollarının sıralı gelişimi ve ekspresyonu ile ilişkilidir (Holmes ve diğ., 2001). Örneğin, olgunlaşmamış hipokampal nöronlar, tamamen anoksik bir ortamda sinaptik uyarılara erişkinlerden daha uzun süre boyunca yanıt vermeye devam edecektir; benzer şekilde, genç hayvanlarda sinir yollarını geri dönüşümsüz biçimde yok etmek için daha uzun anoksik ataklar gerekmektedir. Genç hayvanlar, olgun hayvanlara göre uzun süreli bir nöbet geçirdikten sonra hücre kaybına daha az uğrarlar (Holmes ve diğ., 2001; Hirsch ve diğ., 1992). Bu durum olgunlaşmamış nöronların nöbet oluşumuna karşı daha hassas olduğu ancak patolojik sonuçlarından da yetişkinlere göre daha az etkilendiği sonucunu vermektedir (Holmes ve diğ., 1998). Bu durum hayvanlarda yapılan bazı çalışmalarla da kanıtlanmıştır. Epilepsili erişkin hayvanların öğrenme, hafıza ve davranış gibi özelliklerde önemli eksikliklere sahip olduğu görülmektedir (Stafstrom ve diğ., 1993). Aynı şekilde genç sıçanlarda ise öğrenme, hafıza ve davranışlarda daha az eksiklik olduğu gözlemlenmiştir (Holmes ve diğ., 2001; Liu ve diğ., 1995).

1.5.Spektroskopinin Temelleri

Elektromanyetik ışın yayılma eksenine ve birbirlerine dik açılarda olan aynı fazda yayılan sinüs salınımları şeklinde elektrik ve manyetik alanların varlığı ile tanımlanır. Şekil 1.3.'te görülen E elektrik alanının yönünü, B ise manyetik alanın yönünü göstermektedir (Stuart, 1997).

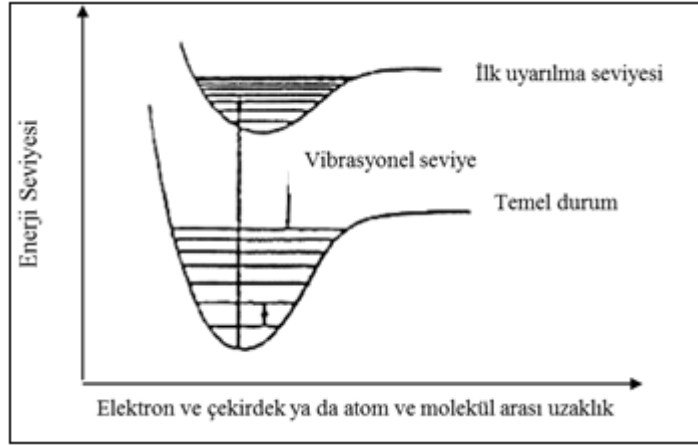


Şekil 1.3. Elektromanyetik ışınma

Elektromanyetik ışınmanın dalga ve tanecik olarak davrandığı ispatlanmıştır. Elektromanyetik ışınmanın frekans, dalga boyu, hız ve genlik gibi özellikleri klasik sinüs dalgası modeliyle incelenebilir. Ancak ışın enerjisinin absorpsiyonu ve emisyonu ile ilgili olayların açıklanmasında dalga modeli başarılı olmamıştır. Bunun için tanecik modeli geliştirilmiştir. Bu modelde elektromanyetik ışın, enerjileri frekansıyla orantılı olan ve foton adı verilen parçacıklar veya enerji paketlerinden oluşmuş olarak tanımlanır.

Elektromanyetik radyasyon ve madde arasındaki etkileşim, atomların veya moleküllerin enerji seviyeleri arasındaki radyasyonun yeniden yönlendirilmesine neden olabilir. Bu olayda, enerji bir molekülü daha yüksek bir enerji seviyesine uyarır ve uyarma tipi ışığın dalga boyuna bağlıdır (Freifelder ve diğ., 1982). Vibrasyonel enerji seviyeleri, Şekil 1.4.'te gösterilen enerji seviyesi diyagramı ile tanımlanmaktadır.

Elektromanyetik ışınma yayılma eksenine ve birbirlerine dik açılarda olan aynı fazda yayılan sinüs salınımları şeklinde elektrik ve manyetik alanların varlığı ile tanımlanır. Şekil 1.3.'te görülen E elektrik alanının yönünü, B ise manyetik alanın yönünü göstermektedir (Stuart, 1997).



Şekil 1.4. Vibrasyonel Enerji Seviye Diyagramı (Freifelder, 1982).

Örnekteki moleküller farklı enerji seviyelerine geçiş yapmasıyla birlikte enerji soğrulur ve frekansa bağlı olarak emilim ortaya çıkar. Molekül ile gelen radyasyon arasında kuvvetli bir etkileşim olduğunda (Eşitlik 1.1, 1.2, 1.3) bir üst enerji seviyesine geçiş (Freifelder ve diğ., 1982) gerçekleşir;

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

ΔE ilgilenilen enerji durumları arasındaki ayırmadır, ν uygulanan radyasyonun sıklığı ve h Planck'ın sabitidir ($h = 6.6 \times 10^{-34}$ joule saniye).

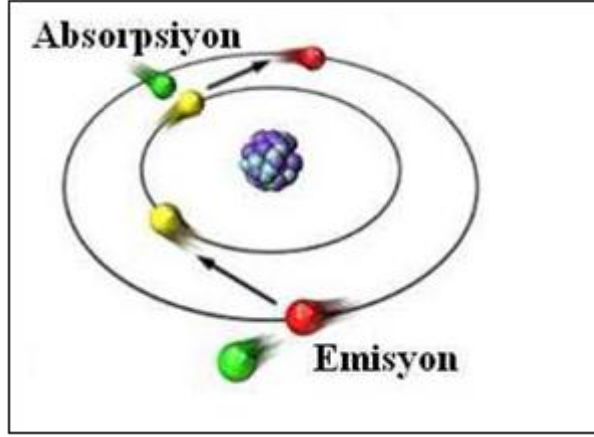
$$c = \lambda \cdot \nu \quad (1.2)$$

c , vakumdaki ışığın hızıdır (3.0×10^8 ms⁻¹) ve λ ışığın dalga boyudur. Bu iki denklem, ν ile gösterilen dalga boyu denilen ortak bir spektroskopik birimi tanımlamak için kullanılabilir. Dalga boyu aşağıdaki gibi dalga boyunun karşıtı olarak tanımlanır;

$$\bar{\nu} = \text{dalga boyu} = (1 / \lambda) \text{ [birimi cm}^{-1}\text{'dir]}$$

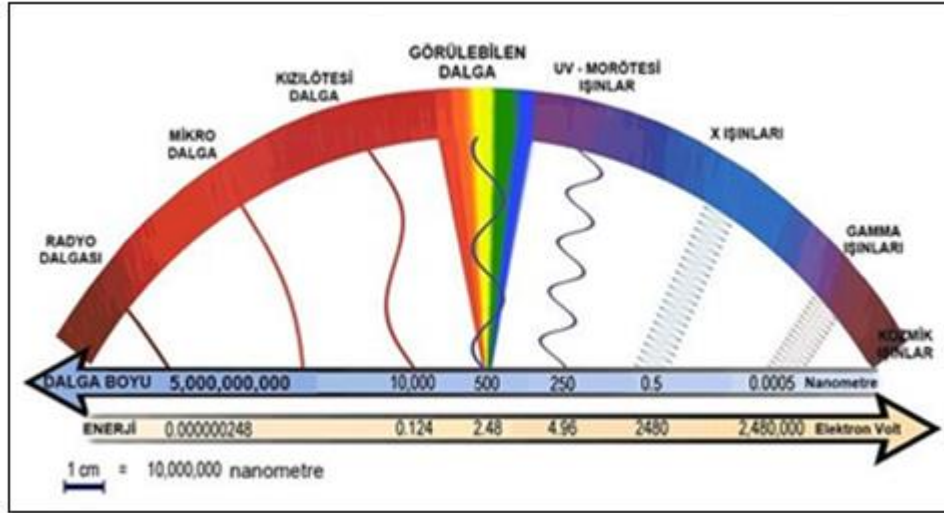
$$\text{Böylece, } E = h\nu = h c \bar{\nu} \quad (1.3)$$

Bu denklemlerden, hem dalga sayısının hem de frekansın doğrudan enerji ile orantılı olduğu açıktır.



Şekil 1.5. Işın absorpsiyonu ve emisyonu

Spektroskopi, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşiminin incelenmesi olarak tanımlanır. Spektroskopik teknikler, bir numunenin bir miktar elektromanyetik radyasyon formuyla ışınlanması, saçılmanın ölçülmesi, absorpsiyon veya emisyonun (Şekil 1.5.) bazı ölçülen parametreler açısından incelenmesi ve bu ölçülen parametrelerin yararlı bilgiler vermek için yorumlanmasını içerir. Şekil 1.6.'da elektromanyetik spektrumun önemli bölgelerinin çoğu gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Elektromanyetik spektrum bölgeleri

Çoğu amaç için, bir molekülü birkaç farklı enerji rezervine sahipmiş gibi ele almak uygundur. Toplam enerji aşağıdaki denklemde görülmektedir (Eşitlik 1.4) (Campbell ve Dwek, 1984).

$$E_{\text{toplam}} = E_{\text{translasyon}} + E_{\text{rotasyon}} + E_{\text{vibrasyon}} + E_{\text{elektronik}} + E_{\text{elektronikspinrotasyon}} + E_{\text{nükleerspin}} + E_{\text{oryantasyon}} \quad (1.4)$$

1.5.1. Infrared (kızılötesi) spektroskopisi

Elektromanyetik spektrumun infrared (IR) bölgesi, dalga sayısı 12800-10 cm⁻¹ veya dalga boyu 0.77-1000 µm aralığındaki ışını kapsar; uygulama ve cihaz yönünden IR spektrumu üç grupta toplanır;

Tablo 1.4. IR spektrum bölgeleri

	Dalga Boyu, µm	Dalga sayısı, cm ⁻¹	Frekans, Hz
Yakın IR	0.78-2.5	12500-4000	3.8×10 ¹⁴ -1.2×10 ¹⁴
Orta IR	2.5-50	4000-200	1.2×10 ¹⁴ -6.0×10 ¹²
Uzak IR	50-1000	200-10	6.0×10 ¹² -3.0×10 ¹¹

Analitik uygulamalarda en çok kullanılan bölge, orta IR ışınının bir bölümü olan 4000-670 cm⁻¹ veya 2.5-15 µm aralığındaki kısımdır (Eşitlik 1.5, 1.6) (Smith, 1999)

IR ışınının absorbe olabilmesi için bir molekülün, dönme hareketine veya titreşimine bağlı olarak, molekülün dipol momentinde net bir değişiklik olması gerekir.

Bir molekülde, atomlar titreşir ve kütle merkezlerine göre döner. Titreşim enerjisi küçükse, hareket basit harmonik harekettir. Bu titreşimsel ve dönme olayları, maddenin bileşiklerini ve yapısını belirlemek için kullanılır.

Yay benzeri bağın titreşim frekansı (ν_{vib});

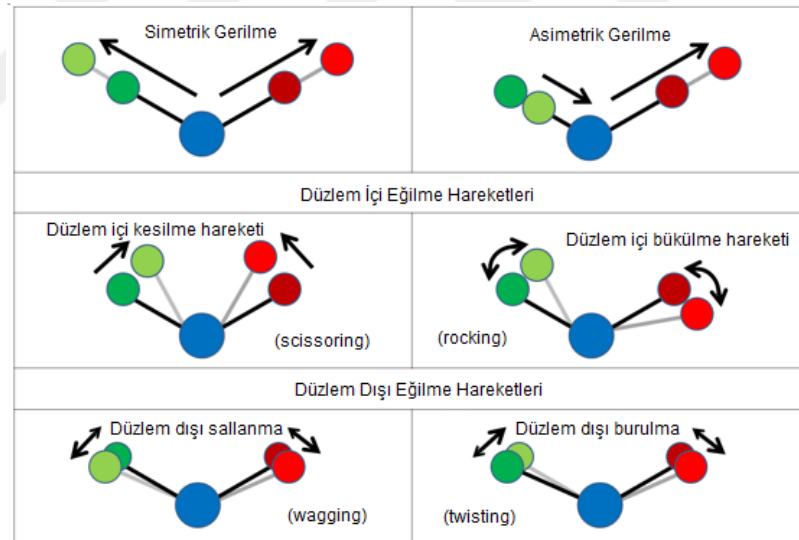
$$\nu_{vib} = \frac{1}{2} \left[\sqrt{\frac{k}{\mu}} \right] \quad (1.5)$$

k, kuvvet sabiti, μ , indirgenmiş kütle olmak üzere; indirgenmiş kütle aşağıdaki formülde olduğu gibidir ve atom A için molekül kütlesi (m_A), atom B için ise molekül kütlesi (m_B) olarak belirtmiştir.

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} \quad (1.6)$$

Moleküler titreşim tipleri, bir moleküldeki atomların birbirine göre yerleşim durumları tam olarak sabit olmayışıyla, moleküldeki bağlar etrafında çok sayıda titreşim ve dönme sonucu devamlı değişir. Basit iki veya üç atomlu bir molekül için,

böyle titreşimlerin sayısını, özelliğini ve bu titreşimlerle absorblanan enerji arasındaki ilişkiyi açıklamak kolaydır. Böyle bir analiz, çok sayıda atomdan meydana gelen moleküller için zordur. Büyük moleküllerde sadece çok sayıda titreşim merkezi bulunmaz, ayrıca bazı titreşim merkezleri arasında etkileşim de söz konusudur ve bu etkileşimlerin de göz önüne alınması gerekir. Titreşimler gerilme ve eğilme denilen iki grupta toplanabilir. Gerilme titreşiminde iki atom arasındaki bağ eksenini boyunca atomlar arasındaki uzaklığın devamlı değişmesi söz konusudur. Eğilme titreşimleri ise iki bağ arasındaki açının değişmesi ile karakterize edilir ve dört tiptir. Makaslama, sallanma, salınma ve burkulma. Titreşim tipleri Şekil 1.7.'de şematik olarak görülmektedir. Şekilde gösterilen titreşim tiplerinin hepsi ikiden fazla atom içeren bir molekülde mümkündür. Ayrıca, titreşimler tek bir merkez atomundaki bağlarla ilgili ise, titreşimlerin etkileşimi veya örtüşmesi meydana gelebilir. Etkileşme sonucu, mevcut titreşimlerin özelliklerinde bir değişme meydana gelir.

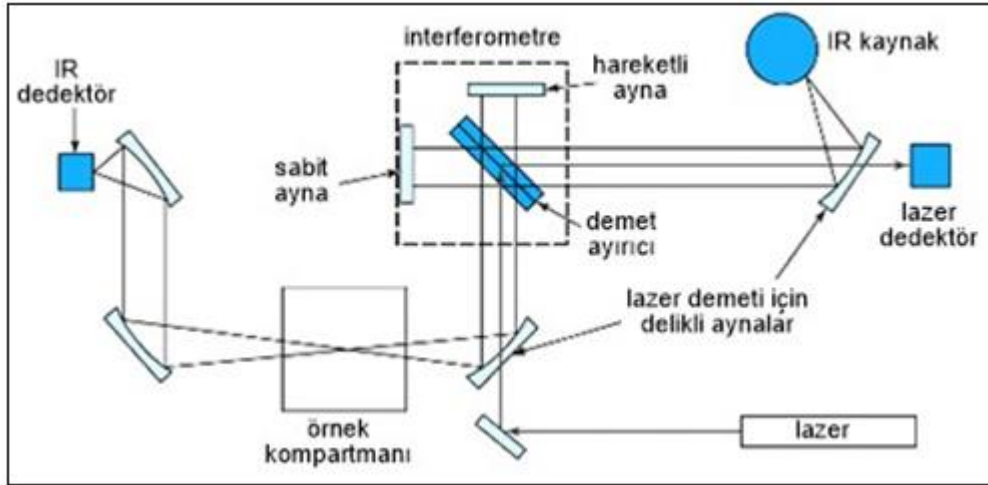


Şekil 1.7. Moleküler titreşim tipleri

1.5.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi

FT-IR spektrometresi, IR spektrometrenin gelişmiş bir şeklidir. FT-IR da IR kaynağından gelen ışın difraksiyon prizmaları ile farklı frekansta IR ışınlarına dönüştürülmektedir. Örnek hücresinden geçen her bir frekanstaki IR ışını dedektörde kaydedilerek analiz edilen örneğe ait IR spektrumu elde edilir. FT-IR spektrometresindeki önemli bölüm, genellikle Michelson İnterferometresi olan

interferometredir. İnterferometre, ışınların girişim yapmasını sağlayan cihazdır. IR spektrometrenin ışın kaynaklarından geniş bant bir ışın gönderilir. Işın bölücü gelen ışının bir bölümünü sabit aynaya; bir kısmını da sabit aynaya 90 derece açıyla konumlandırılmış hareketli aynaya gönderir. Aynalardan yansıyan ışınlar birleşir ve girişim yaparlar. Hareketli ayna sabit bir hızda sürekli olarak ileri geri hareket eder. Bu, ışınların girişim yapmasını sağlar. Bunun sonucunda farklı dalga boylarında kompleks bir girişim deseni oluşur. Bu desen üst üste geçmiş sinüsoidal dalgalar içerir. FT-IR da girişim yapan IR ışını örnek üzerine gönderilmektedir. Örnek içerisinde bulunan bileşenler yollanan bu girişim yapmış ışın içerisindeki ilgili frekanstaki ışını absorbe ederler. Numuneden geçen ışın dedektörde kaydedilerek interferogram elde edilir. Bundan sonra, elde edilen interferograma bir matematiksel dönüşüm (Fourier transformation) uygulanarak yatay ekseninde dalga sayısı, dikey ekseninde de transmittans bulunan grafik elde edilir.



Şekil 1.8. FT-IR spektrometresinin enstrümantasyonu

1.5.3. FT-IR Spektroskopisinin avantajları ve uygulama alanları

Biyolojik örneklerde, FT-IR spektroskopisi spesifik olanlardan ziyade biyomoleküller hakkında global bilgi vermesine rağmen, genel olarak örnekte, dört biyomolekül gruplarını ve onların çeşitlerini örneğin doymuş lipitleri, doymamış lipitleri, kolesterol esterleri, trigliseridleri, proteinleri, nükleik asitleri ve karbonhidratları tespit etmek mümkündür (Türker-Kaya ve diğ., 2018; Bozkurt ve diğ., 2007; Garip ve diğ., 2007; Kneipp ve diğ., 2000). Bu tekniğin bir diğer avantajı ise hızı ve hassasiyetidir. Dahası, birkaç mikrogram kadar düşük numune miktarlarından yüksek kaliteli kızılötesi spektrumları verir (Dighton ve diğ., 2001).

Ayrıca, numuneler katı, sıvı ve gaz gibi çeşitli fiziksel durumlarda incelenebilir. Ek olarak, örnek herhangi prob kullanılmadan incelenebilir bundan dolayı örnek hakkında yapısal ve işlevsel bilgi sağlayan kullanışlı bir tekniktir (Toyran ve diğerleri, 2006; Doğan ve diğ., 2007; Liu ve diğ., 1996). Zirve pozisyonundaki, bant genişliğindeki ve zirve alan / yoğunluğundaki değişim, dokular, membranlar, hücreler ve biyo-akışkanlar gibi çeşitli biyolojik numunelerde patolojik durumlarının hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması için kullanılabilen değerli bilgiler verir. Bu nedenle, bu yöntem birçok hastalığın teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Turker ve diğ., 2014; Doğan ve diğ., 2007; Bozkurt ve diğ., 2007; Toyran ve diğ., 2006; Petibois ve diğ., 2006; Çakmak ve diğ., 2006; Severcan ve diğ., 2000; Schultz ve diğ., 1998; Liu ve diğ., 1996; Yano ve diğ., 1996). Bu tekniğin epilepsi alanında kullanımı oldukça sınırlıdır. Literatürde akut spontane olmayan epileptik nöbetlerin etkileri tüm beyin doku ve membranları üzerine etkileri yine bu teknikle Türker ve diğ., (2014a; 2014b) tarafında incelenmiştir. Buna ek olarak FT-IR spektroskopisinin mikroskop eklentili bir çeşidi olan FT-IR mikrospektroskopisi de farklı epileptik nöbetlerin sıçan femur ve tibia kemiklerindeki (Garip ve diğ., 2013); hippocampusteki (Dudala ve diğ., 2012; Chwiej diğ., 2010) etkileri incelemek üzere kullanılmıştır.

2.MALZEME VE YÖNTEM

2.1.Hayvan Deneyleri

Hayvan Deneyleri, Kocaeli Üniversitesi DETAB biriminde, Hayvanların Etik Uygulamaları Avrupa Konsey Direktifi'ne (86/609 / EEC) ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesinin (KOÜ HAYDEK 1/1-2017) (Ek-D) tüm yazarlarının onayına uyumlu olarak gerçekleştirildi. Çalışmada, 2 aylık Wistar (n=7), 6 aylık Wistar (n=7), 2 aylık WAG/Rij (n=7) ve 6 aylık WAG/Rij (n=6) olmak üzere 4 grup belirlendi. Hayvanların 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık döngüde sabit ısıda bir oda da yiyecek ve su alımları serbest tutuldu. Hayvanlar 2 ve 6 aylık olduklarında derin eter anestezi altında iken dekapite edildi. Dekapite edilen beyin dokuları spektroskopik ve biyokimyasal incelemeye kadar -80°C derin dondurucuda bekletildi.

2.2.FT-IR Spektroskopisi Deneyleri

Sıçan beyin dokuları içerisindeki suyun uzaklaştırılması için 24 saat boyunca dondurarak kurutucu (Freeze-Drier) cihazı kullanılarak kurutma işlemi gerçekleştirildi. Kurutulan beyin dokuları ağız havanı içerisinde sıvı azot yardımı ile ezildi ve 2 mg olarak tartıldı. 2 mg'lık doku örneği 100 mg kuru potasyum bromür (KBr) ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Hazırlanan karışım hidrolik preste 100 kg/cm²'lik basınç altında 5 dk bekletildi ve katı bir KBr peleti elde edildi. Hazırlanan KBr peletlerinin spektrum eldeleri, 4000-450 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ve 4 cm⁻¹ çözünürlükte Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spektrometresi ile gerçekleştirildi. Sonuçların güvenilirliğini artırmak için her sıçan beyin dokusundan 2 pelet hazırlandı ve her örnekten 2 kez çekim yapıldı. Bu 2 çekimden elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak detaylı analizler bu spektrumlar üzerinde gerçekleştirildi.

Atmosferdeki CO₂ ve H₂O'ten kaynaklanan soğurma bantları, doku örneklerinin soğurma bantlarını kamufle eder. Dolayısıyla, bu atmosferik su buharının etkisini önlemek amacıyla FT-IR spektrometresinden sürekli kuru hava geçirilmektedir.

Örnek çekimi öncesinde havanın çekimi yapılmakta ve elde edilen spektrum bilgisayar programı aracılığıyla örnek spektrumundan otomatik olarak çıkarılmaktadır (Türker ve diğ., 2016; Türker ve diğ., 2014a; 2014b).

2.3. Bradford Testi

Beyin dokularının toplam protein miktar tayinleri Thermo Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit ile gerçekleştirildi. Öncelikle kit içerisinde hazır olarak bulunan standart sığır albümin (BSA) çözeltisinden tüplere final BSA konsantrasyonları 0, 25, 125, 250, 500 ve 750 µg/ml olacak şekilde aşağıdaki Tablo 2.1.'de şematize edildiği gibi hazırlandı.

Tablo 2.1. Standart eğri hazırlamada kullanılacak BSA konsantrasyonları

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

Hazırlanan tüplere 1,5 ml Coomassie Reagent ekledi ve vortekslendi. 10 dk inkübe edilip 595 nm'de okutuldu. Elde edilen sonuçlar ile standart eğri hazırlanıp beyin doku homojenatlarının hazırlanmasına geçildi. Her beyin örneğinden 5 mg tartıldı. Üzerine 1 ml fosfat buffer eklenip homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan her homojenattan 30 µL alındı ve üzerine 1,5 ml Coomassie Reagent eklendi. 10 dk inkübe edildikten sonra 595 nm'de okutuldu. Sonuçlar standart eğri grafiğinde (Ek-B) değerlendirildi.

2.4. TBARs Testi

Örneklerdeki malondialdehit (MDA) miktar tayini için TBARs testi gerçekleştirildi. Test için Cayman markalı TBARs Assay Kit kullanıldı. Öncelikle kit içerisindeki kimyasallar renk reaktifi için aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı;

1. 530 mg Tiyobarbitürik Asit (TBA) tartıldı.

2. 20 ml TBA asetik asit üzerine 160 ml distile su eklendi.

3. 20 ml TBA sodyum hidroksit üzerine 160 ml distile su eklendi.

4. Son olarak 2 ve 3. maddelerde hazırlanan kimyasallar 150 ml'lik beher içerisinde 530 mg'lık TBA'ya eklenerek TBA çözünene kadar karıştırıldı ve renk reaktifi hazırlandı. Daha sonrasında, standart eğri için gerekli hazırlıklar yapıldı. Kit içerisindeki MDA solüsyonlarından 125 µm'lik bir stok çözelti elde etmek için 250 µl MDA standardı 750 µl distile su ile seyreltildi. 8 adet cam tüp A ile H arasında isimlendirildi. Tablo 2.2.' de gösterilen µl'lerde her tüpe 125 µl'lik stok MDA çözeltisinden eklendi.

Tablo 2.2. Standart eğri hazırlamada kullanılacak MDA konsantrasyonları

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

Hazırlanan cam tüplere 1,5 ml renk reaktifi eklendi ve 20 dk boyunca kaynayan su dolu beher içerisinde kaynatıldı. Kaynatma sonrası tüpler 10 dk buza alınarak reaksiyon durduruldu. Tüplerdeki aynı isimler ile ependorflara alınan standartlar rpm x 1600'de 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar 1 ml şeklinde küvetlere alınarak okutuldu. Alınan sonuçlarla standart eğri grafiği oluşturuldu. Örneklerin hazırlanması için ise her beyin dokusundan 25 mg tartıldı. Üzerine 250 µl Ripa Buffer eklendi ve homojenize edildi. Bu işlem sonrası rpm x 1600'de 20 dk santrifüj edilip oluşan süpernatantlardan tüplere 100 µl örnek alınarak üzerine 1,5 ml renk reaktifi eklendi. Standart eğri hazırlama prosedüründeki kaynatma-soğutma uygulamaları burada da uygulandı. Tekrar rpm x 1600'de santrifüj edilerek süpernatantlar okutulup kaydedildi ve sonuçlar standart eğri grafiğinde (Ek-C) değerlendirildi.

2.5.Analiz

2.5.1.FT-IR spektral analizi

Spektral analiz kapsamında bant alanı, bant pozisyonu ve bant genişliği değerleri Perkin Elmer Spektrum One programı ile analiz edildi. Bant pozisyonları pik yüksekliğinin %70'i alınarak hesaplanırken, bant genişliği pik yüksekliğinin %70'inden elde edilen cm birimini cm^{-1} 'e çevrilerek elde edildi. Bant alanı için ise Baseline düzeltilmesi, 4000 cm^{-1} , 2000 cm^{-1} ve 900 cm^{-1} noktalarına uygulandıktan sonra alan hesaplaması hedeflenen pikin başlangıç ve bitiş noktaları belirlendi. Ardından pikin alanı Perkin Elmer Spektrum One programı tarafından otomatik olarak hesaplandı. Tüm spektrumlar arasında farkların görsel olarak gösterimi için $3050\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde CH_2 asimetrik bandı, $1800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde amid I bandı baz alınarak normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. Normalizasyon işlemi sadece görsel amaçlı yapılmasından dolayı tüm analizler (bant alanı, bant pozisyonu ve bant genişliği) ham spektrumlar üzerinden gerçekleştirildi. 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 ve simetrik gerilme ($2924 \text{ cm}^{-1} - 2851 \text{ cm}^{-1}$) bantları altındaki alanın toplamının, amid I ve amid II ($1645 \text{ cm}^{-1} - 1547 \text{ cm}^{-1}$) 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 bant alanlarının toplam doymuş lipite (CH_2 asimetrik ve simetrik gerilme bantları altındaki alanın toplamı) bölümüyle hesaplandı. Ayrıca RNA/protein oranı ise $\text{C}^+\text{-N-C}$ (970 cm^{-1}) bantı altındaki alanın, amid I ve amid II bantları altındaki alanın toplamına bölünmesi ile elde edildi.

2.5.2.Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA)

Hiyerarşik kümeleme metodu (HCA) örneklerin spektral farklılıklarına göre ayrılıp ayrılmadığını test etmek için uygulandı. HCA analizi için OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics, Ettlingen, Germany) programı kullanıldı. Analiz için spektrumların birincil türevi alındı ve analiz $1729 - 1579 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde gerçekleştirildi.

2.5.3. İstatistiksel analiz

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

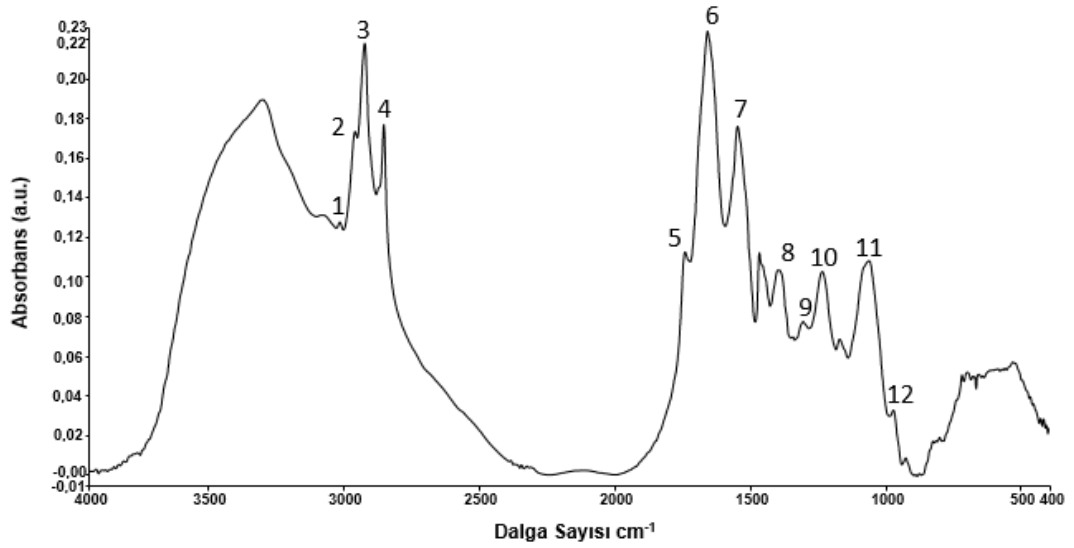


3.BULGULAR

3.1.FT-IR Çalışmaları

Literatüre dayalı olarak FT-IR spektrumlarından ve biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlar, 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij olacak şekilde karşılaştırıldı (Sitnikova ve diğ., 2014; Mengler ve diğ., 2013; Sarkisova ve van Lujtelaar., 2011). Ayrıca bu karşılaştırmalara ek olarak tez kapsamında yaşın etkisini saptamak amacı ile 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları da karşılaştırıldı.

Sıçan beyin örneklerinden elde edilen bir FT-IR spektrumunda farklı dalga sayılarında birçok bant bulunmaktadır, dolayısıyla spektrum oldukça komplekstir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sıçan beyin doku örneklerinden elde edilen bir FT-IR spektrumu

Bu bantlar beyin dokusunda bulunan değişik biyomolekülerin yapısındaki fonksiyonel grupların titreşimlerinden kaynaklı bantlardır (Turker ve diğ., 2014a; Kumar ve diğ., 2014; Bozkurt ve diğ., 2012). Literatüre dayalı olarak her bir spesifik dalga sayısındaki bandın hangi biyomolekülden kaynaklandığı tespit edilebilmekte ve tanımlanabilmektedir. Tablo 3.1. kontrol beyin dokusuna ait spektrumdaki (Şekil

3.1.) çalışma kapsamında analiz edilen bantların tanımlamalarını göstermektedir. Tabloda her bir bant numaralandırılmıştır.

Tablo 3.1. Literatüre dayalı sıçan beyninin FT-IR spektrumunun ortalama bant frekansları ve bantların tanımlanması.

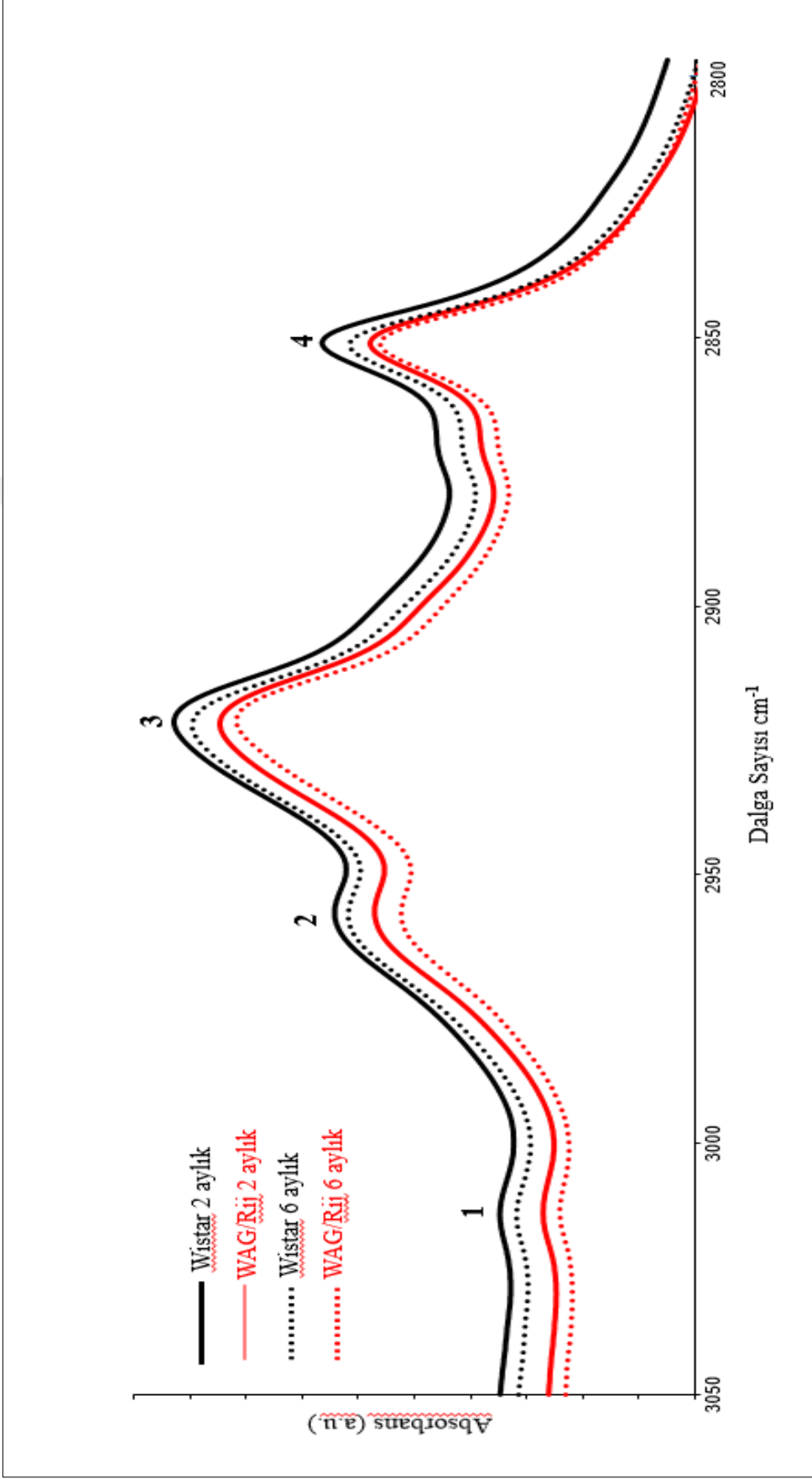
No (cm ⁻¹)	Frekans	Spektral Bantların Tanımı
1	3012	Olefinik = CH gerilme: doymamış lipitler
2	2956	CH ₃ asimetrik gerilme: esas olarak lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
3	2925	CH ₂ asimetrik gerilme: esas olarak lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
4	2852	CH ₂ simetrik gerilme: esas olarak lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
5	1740	Doymuş ester C = O gerilme: fosfolipitler, kolesterol esterler, 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
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 gerilme: nükleik asitler

Belirtildiği üzere sıçan beyin dokularına ait spektrumlar bir çok bant içeren kompleks yapıda olduklarından örnekler arasındaki spektral farklılıkları daha ayrıntılı göstermek amacıyla spektrumlar 3050-2800 cm⁻¹ (Şekil 3.2.) ve 1800-900 cm⁻¹ (Şekil 3.7.) olmak üzere iki ayrı bölgede gösterildi. Analiz sonuçlarının numerik verileri ise Ek-A'da tablo olarak verildi.

3.1.1. 3050-2800 cm⁻¹ frekans aralığı

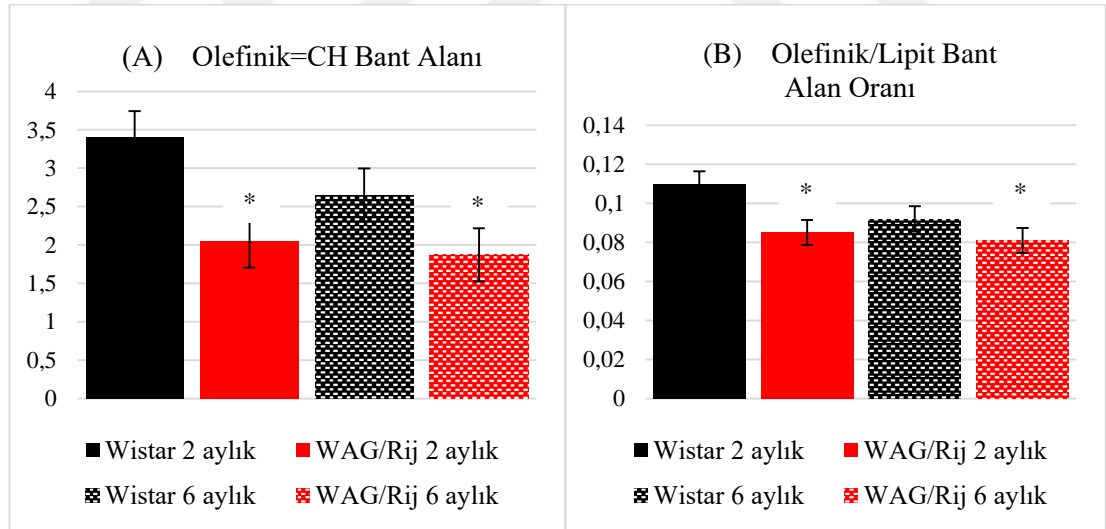
3050-2800 cm⁻¹ frekans aralığı, membran lipitlerini ve proteinlerini içeren olefinik = CH, CH₂ ve CH₃ gruplarının C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan

absorpsiyonları içerir (Liyanage ve diğ., 2018; Baloglu ve diğ., 2015; Çakmak ve diğ., 2006). Şekil 3.2. 3050-2800 cm^{-1} bölgeleri arasında 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının FT-IR spektrumlarını göstermektedir. Spektral analiz kapsamında bant alanı, bant pozisyonu ve bant genişliği değerleri Perkin Elmer Spektrum One programı ile analiz edildi. Bant pozisyonları pik yüksekliğinin %70'i alınarak hesaplanırken, bant genişliği pik yüksekliğinin %70 'inden elde edilen cm birimini cm^{-1} 'e çevrilerek elde edildi. Bant alanı için ise Baseline düzeltilmesi, 4000 cm^{-1} , 2000 cm^{-1} ve 900 cm^{-1} noktalarına uygulandıktan sonra alan hesaplaması hedeflenen pikin başlangıç ve bitiş noktaları belirlendi. Ardından pikin alanı Perkin Elmer Spektrum One programı tarafından otomatik olarak hesaplandı. Tüm spektrumlar arasında farkların görsel olarak gösterimi için 3050-2800 cm^{-1} bölgesinde CH_2 asimetrik bandı, 1800-900 cm^{-1} bölgesinde amid I bandı baz alınarak normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. Normalizasyon işlemi sadece görsel amaçlı yapılmasından dolayı tüm analizler (bant alanı, bant pozisyonu ve bant genişliği) ham spektrumlar üzerinden gerçekleştirildi. 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 ve simetrik gerilme (2924 cm^{-1} – 2851 cm^{-1}) bantları altındaki alanın toplamının, amid I ve amid II (1645 cm^{-1} – 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 bant alanlarının toplam doymuş lipite (CH_2 asimetrik ve simetrik gerilme bantları altındaki alanın toplamı) bölümüyle hesaplandı. Ayrıca RNA/protein oranı ise C⁺-N-C (970 cm^{-1}) bantı altındaki alanın, amid I ve amid II bantları altındaki alanın toplamına bölünmesi ile elde edildi. Literatüre dayalı olarak FT-IR spektrumlarından ve biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlar, 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij olacak şekilde karşılaştırıldı (Sitnikova ve diğ., 2014; Mengler ve diğ., 2013; Sarkisova ve van Luijtelaa., 2011). Ayrıca bu karşılaştırmalara ek olarak tez kapsamında yaşın etkisini saptamak amacı ile 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları da karşılaştırıldı.



Şekil 3.2. 3050-2800 cm⁻¹ bölgeleri arasında 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının FT-IR spektrumları

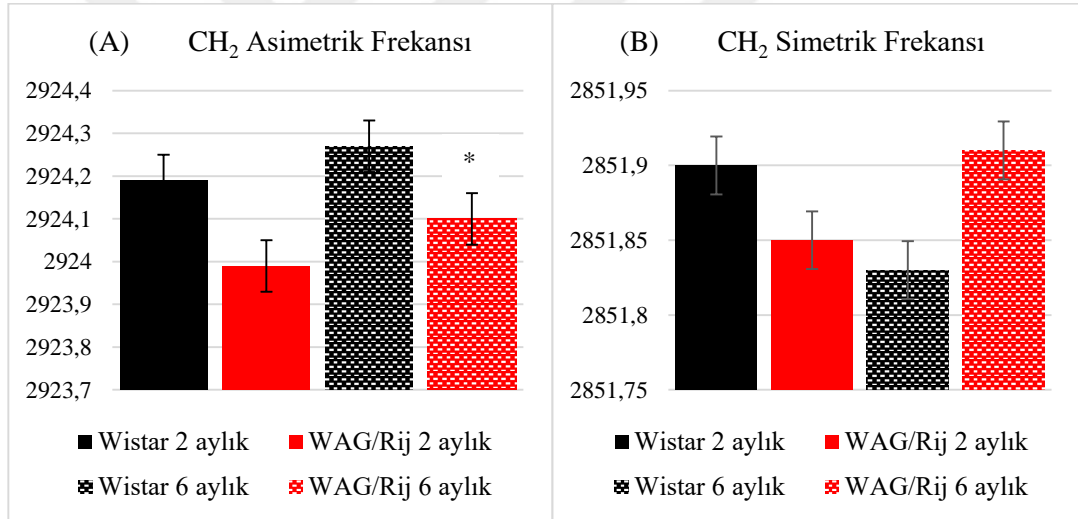
3050-2800 cm^{-1} frekans aralığındaki 1 numaralı absorsiyon (3012 cm^{-1}), olefinik bandı, doymamış yağ asitlerinin HC = CH gruplarının C-H gerilme modundan kaynaklıdır (Leskovjan ve diğ., 2010; Hendry ve diğ., 2008; Toyran ve diğ., 2006). Şekil 3.3.(A) olefinik band alanı değerlerini göstermektedir. Şekilden görüldüğü üzere 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij gruplarının olefinik bant alan değerleri karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının her ikisinde de anlamlı seviyede ($p < 0,001^{**}$) düşük değerlere kayma saptandı. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında da 6 aylık gruplarda anlamlı seviyede ($p < 0,001^{**}$) azalma tespit edildi. Şekil 3.3.(B)'de ise olefinik/lipit alan oranları verildi. Şekile göre 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında anlamlı olarak ($p < 0,05^*$) WAG/Rij gruplarının alan oran değerlerinde düşük değerlere kayma olduğu gözlemlendi. 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij gruplarının karşılaştırılması yapıldığında da 6 aylık grupların olefinik/lipit alan oranları anlamlı derecede ($p < 0,05^*$) düşme saptandı.



Şekil 3.3. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının olefinik=CH gerilme bant alanı (A) ve olefinik/lipit alan oran (B) değerleri.

2925 cm^{-1} 'deki 3 numaralı CH_2 asimetric ve 2852 cm^{-1} 'deki 4 numaralı CH_2 simetric bantları esas olarak lipit açil zincirlerinden kaynaklanmaktadır (Türker-Kaya ve diğ. 2016; Baloglu ve diğ., 2015; Akkaş ve diğ., 2007). Şekil 3.4.(A)'da CH_2 asimetric bandının bant frekans değerleri verildi. 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının

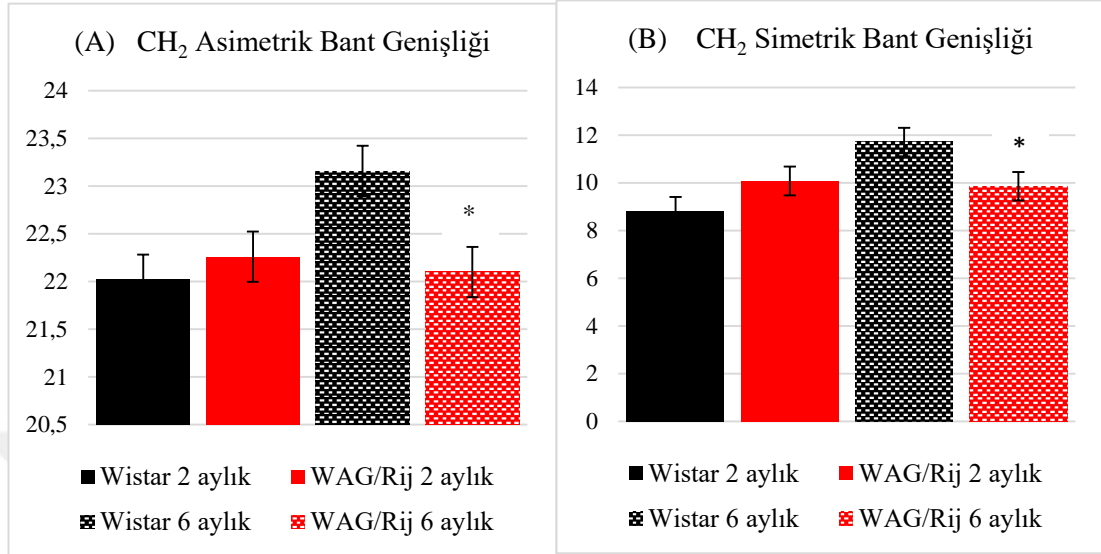
frekans değerlerinde anlamlı olarak düşük değerlere kayma ($p<0,05^*$) gözlemlenirken, 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında 6 aylık grupların frekans değerlerinde belirgin düzeyde artma tespit edildi. Şekil 3.4. (B)'de ise CH_2 simetrik bandının bant frekans değerleri verildi. Şekilde de görüldüğü üzere 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij grubunda azalma gözlemlenirken, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij grubunun frekans değerinde artma olduğu tespit edildi. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları karşılaştırmasında 6 aylık grupta azalma söz konusu iken 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında 6 aylık grubun frekans değerinde artma olduğu tespit edildi. Ancak CH_2 simetrik frekans değerlerindeki bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 3.4. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH_2 asimetrik (A) ve CH_2 simetrik (B) bant frekans değerleri.

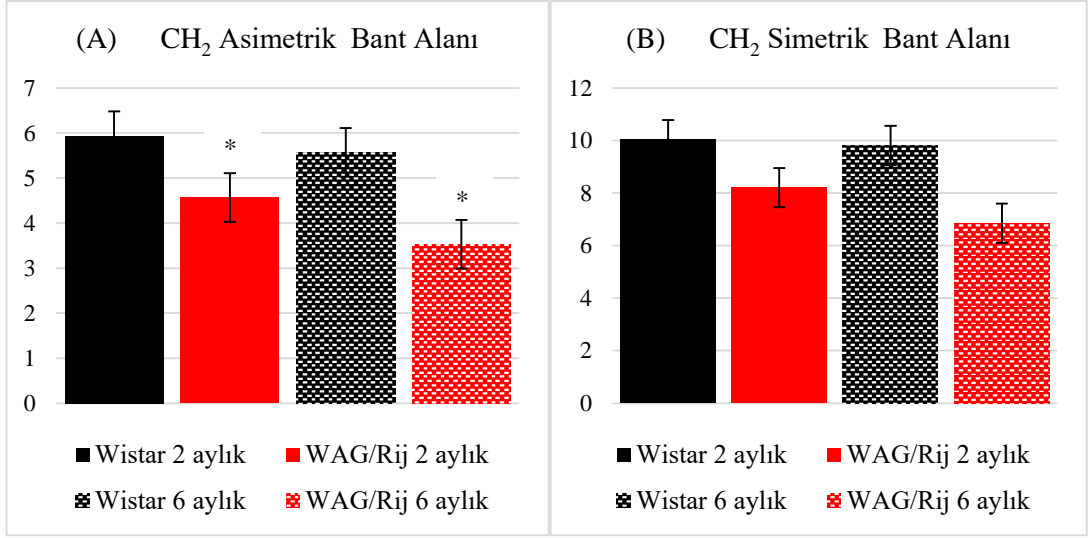
Şekil 3.5. (A) ve (B)'de 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH_2 asimetrik ve CH_2 simetrik bant genişliği değerleri verildi. Her iki bant içinde Şekil 3.5.(A) ve (B)'de görüldüğü üzere, 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij gruplarının değerleri karşılaştırıldığında WAG/Rij grubunun bant genişliği yüksek değerlerde elde edilirken, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij grubunda belirgin şekilde azalma tespit edildi. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları karşılaştırıldığında 6 aylık grupta artma gözlemlenirken, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij gruplarının karşılaştırılmasında 6 aylık grubun bant

genişliği değeri belirgin düzeyde düşük değerlerde tespit edildi. Ayrıca tüm bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001^{**}$) olduğu belirlendi.



Şekil 3.5. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH₂ asimetrik (A) ve CH₂ simetrik (B) bantlarının bant genişliği değerleri.

Şekil 3.6.'da 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH₂ asimetrik (A) ve CH₂ simetrik (B) bant alan değerleri gösterilmektedir. Şekil 3.6. (A) ve (B)'den görüldüğü üzere her iki bant için de 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij gruplarının alan değerleri karşılaştırıldığında WAG/Rij grubunda dramatik bir düşüş olduğu tespit edildi. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında 6 aylık grupların bant alan değerlerinde azalma olduğu belirlendi. Ancak CH₂ asimetrik bandının bant alan değerlerindeki bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001^{**}$) iken CH₂ simetrik bandının bant alan değerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Bu durum CH₂ simetrik bandının tüm gruplar için değerlerinin arasında oldukça fazla fark olmasından (standart sapma değerlerinin yüksek olmasından) kaynaklanmaktadır. Daha da önemlisi CH₂ simetrik bandının CH₃ simetrik bandı (Şekil 3.2.) ile çakışma oranı oldukça yüksek olduğundan CH₃ simetrik bandının kamuflaj etkisi oldukça fazladır. Bundan dolayı CH₂ asimetrik bandında görülen istatistiksel anlamlılık CH₂ simetrik bandında görülmemiş olabilir.

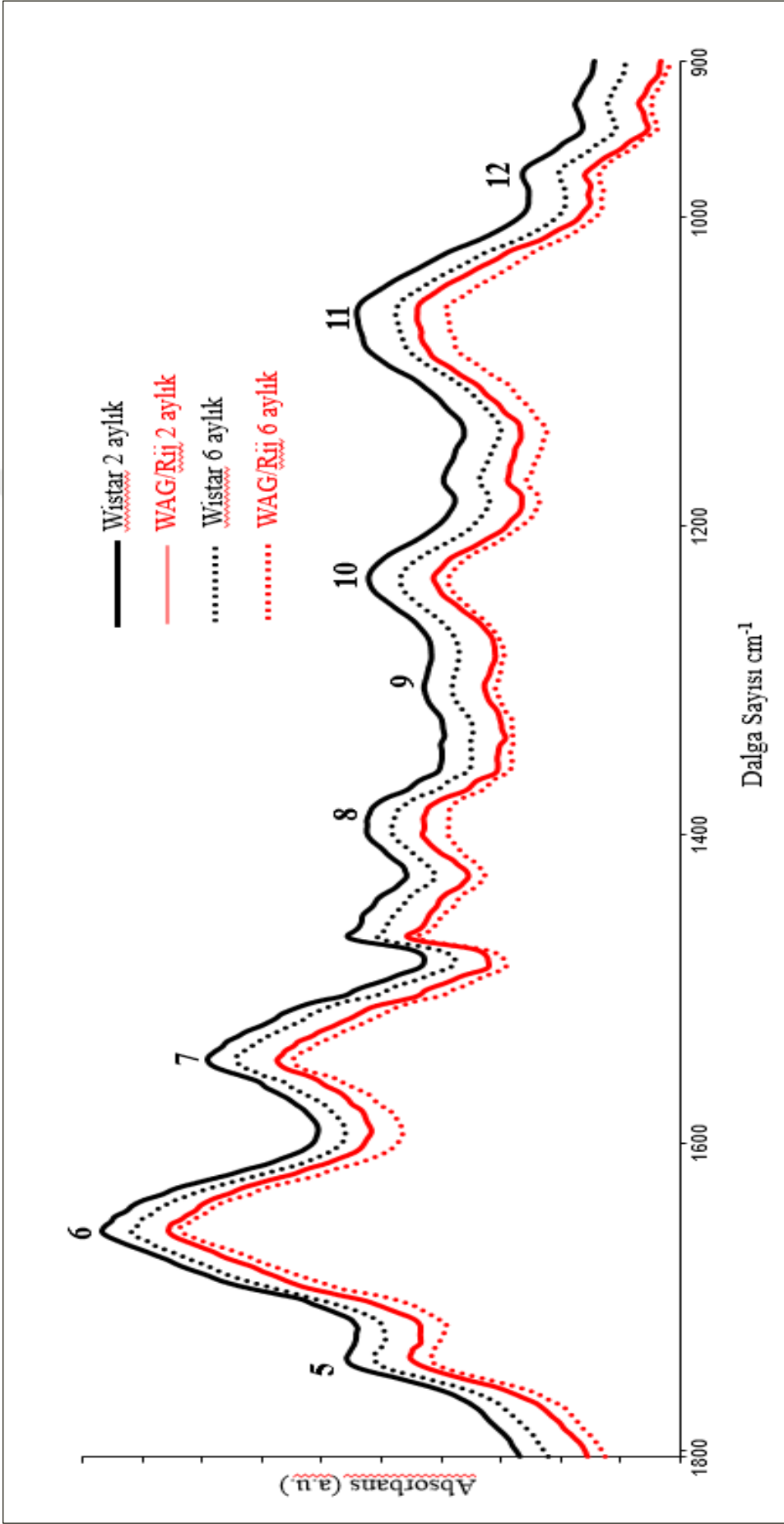


Şekil 3.6. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının CH₂ asimetrik (A) CH₂ simetrik (B) bant alan değerleri.

3.1.2. 1800-900 cm⁻¹ frekans aralığı

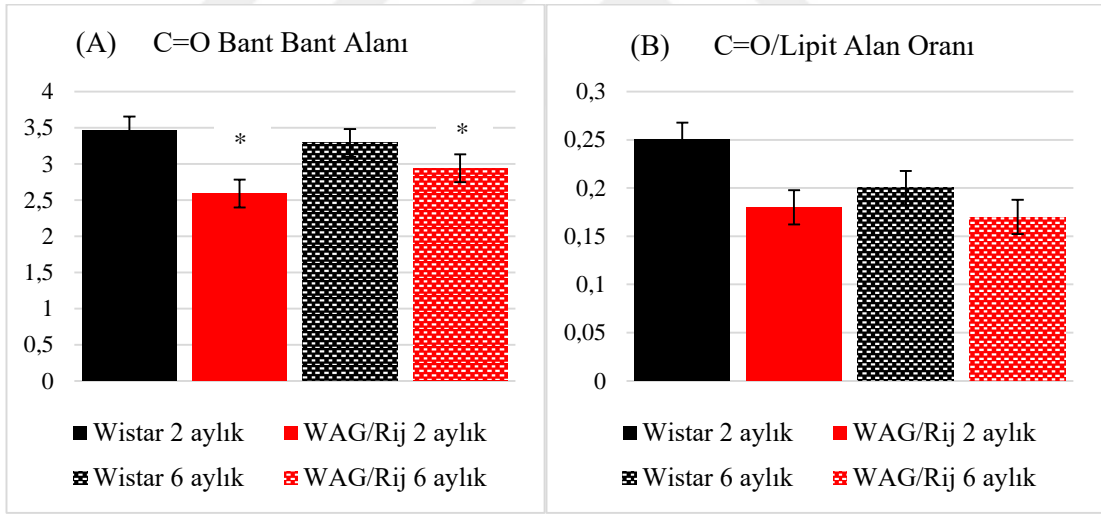
Şekil 3.7. ise 1800-900 cm⁻¹ bölgeleri arasında 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının FT-IR spektrumlarını göstermektedir.

1740 cm⁻¹'de bulunan 5 numaralı bant, lipidlerin C = O gerilme titreşimlerine atanır ve trigliserit, kolesterol ve karbonil gruplarından kaynaklıdır (Sivakumar ve diğ., 2014; Krishnakumar ve diğ., 2012). Şekil 3.8.'de bu bandın alanı (A) ve C=O/lipit alan oranı (B) verilmektedir. Şekil 3.8. (A) ve (B)'de görüldüğü üzere 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının bant alanlarında ve alan oranlarında anlamlı derecede azalma (p<0,05*) gözlemlendi. 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar gruplarının bant alanı ve bant alan oranları karşılaştırıldığında 6 aylık grupta düşük değerlere kayma tespit edilirken, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij gruplarının bant alanı değeri karşılaştırılmasında 6 aylık grupta anlamlı seviyede artış (p<0,05*) gözlemlendi. 2-6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında C=O/lipit alan oranında ise 6 aylık grupta düşük değerlere kayma tespit edildi ancak bu düşük değere kayma istatistiksel olarak anlamlı değildi.



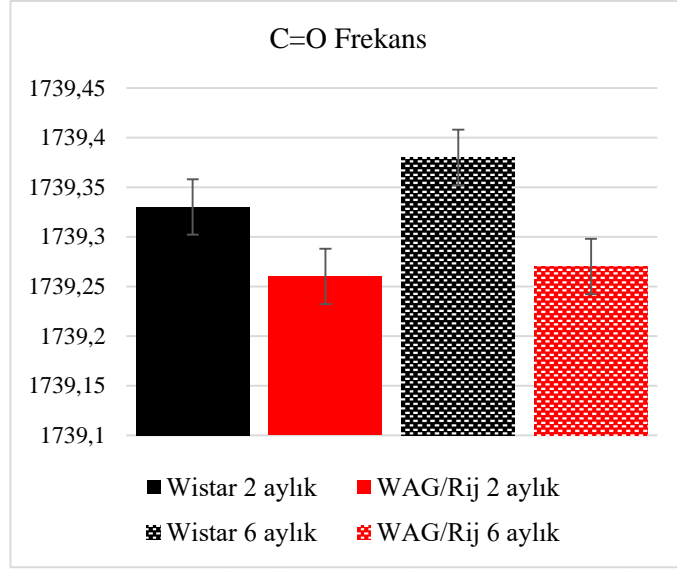
Şekil 3.7. 1800-900 cm⁻¹ bölgeleri arasında 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının FT-IR spektrumları

1740 cm^{-1} 'de bulunan 5 numaralı bant, lipitlerin C = O gerilme titreşimlerine atanır ve trigliserit, kolesterol ve karbonil gruplarından kaynaklıdır (Sivakumar ve diğ., 2014; Krishnakumar ve diğ., 2012). Şekil 3.8.'de bu bandın alanı (A) ve C=O/lipit alan oranı (B) verilmektedir. Şekil 3.8. (A) ve (B)'de görüldüğü üzere 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının bant alanlarında ve alan oranlarında anlamlı derecede azalma ($p < 0,05^*$) gözlemlendi. 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar gruplarının bant alanı ve bant alan oranları karşılaştırıldığında 6 aylık grupta düşük değerlere kayma tespit edilirken, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij gruplarının bant alanı değeri karşılaştırılmasında 6 aylık grupta anlamlı seviyede artış ($p < 0,05^*$) gözlemlendi. 2-6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında C=O/lipit alan oranında ise 6 aylık grupta düşük değerlere kayma tespit edildi ancak bu düşük değere kayma istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 3.8. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının C=O bant alanı (A) ve C=O/lipit alan oranı (B) değerleri.

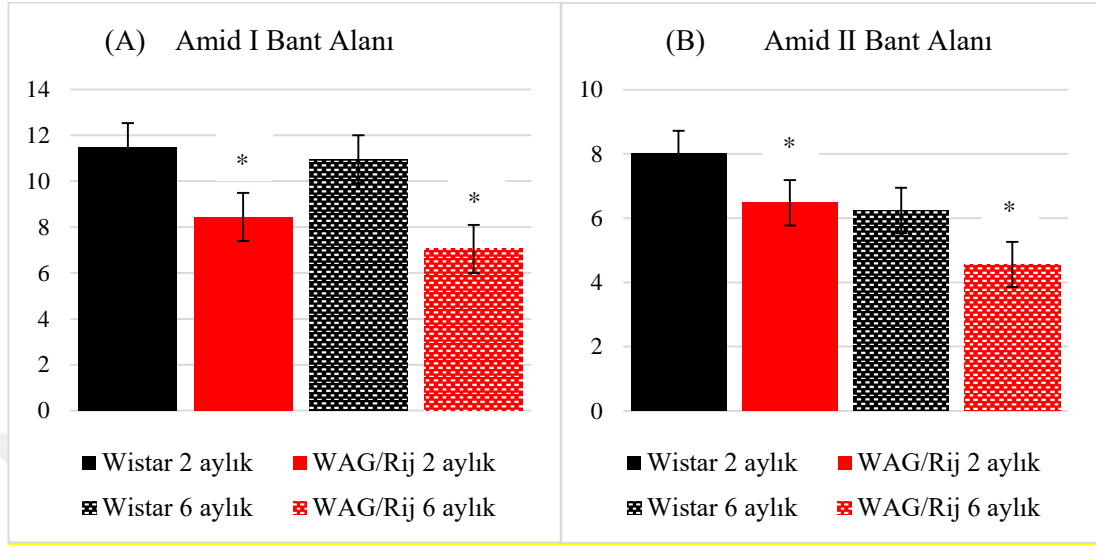
Şekil 3.9.'da ise 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının C=O frekans değerleri verildi. 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında bu bandın frekans değerlerinde WAG/Rij gruplarında düşük değerlere kayma tespit edildi. 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında ise 6 aylık grupların bant frekans değerlerinde artma gözlemlendi. Ancak tüm bu frekans değerindeki karşılaştırmalar sonucu görülen artma istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 3.9. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının C=O bant frekans değerleri.

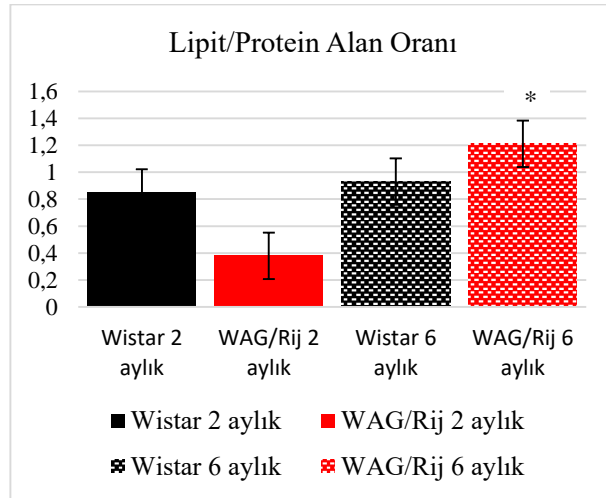
1645 cm⁻¹ (6 numaralı) ve 1540 cm⁻¹'deki (7 numaralı) bantlar, yapısal proteinlerin amid I ve amid II titreşimlerine atanır. Amid I bandı C = O proteinlerinin gerilmesine karşılık gelirken amid II bandı, N-H bükülmesine ve proteinlerin C-N germe modlarına karşılık gelir (Turker-Kaya ve diğ., 2016; Severcan ve diğ., 2014; Chwiej ve diğ., 2010; Kastyak ve diğ., 2010). Şekil 3.10. (A) ve (B)'de görüldüğü üzere amid I ve amid II bant alanları 2 aylık Wistar ve WAG/Rij grupları ile 6 aylık Wistar ve WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının her ikisinde de anlamlı seviyede (p<0,001**) düşük değerlere kayma saptandı. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında da 6 aylık gruplar anlamlı seviyede (p<0,001**) düşük değerlere kayma olduğu tespit edildi. 1645 cm⁻¹ (6 numaralı) ve 1540 cm⁻¹'deki (7 numaralı) bantlar, yapısal proteinlerin amid I ve amid II titreşimlerine atanır. Amid I bandı C = O proteinlerinin gerilmesine karşılık gelirken amid II bandı, N-H bükülmesine ve proteinlerin C-N germe modlarına karşılık gelir (Turker-Kaya ve diğ., 2016; Severcan ve diğ., 2014; Chwiej ve diğ., 2010; Kastyak ve diğ., 2010). Şekil 3.10. (A) ve (B)'de görüldüğü üzere amid I ve amid II bant alanları 2 aylık Wistar ve WAG/Rij grupları ile 6 aylık Wistar ve WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının her ikisinde de anlamlı seviyede (p<0,001**) düşük değerlere kayma saptandı. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6

aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında da 6 aylık gruplar anlamlı seviyede ($p<0,001^{**}$) düşük değerlere kayma olduğu tespit edildi.



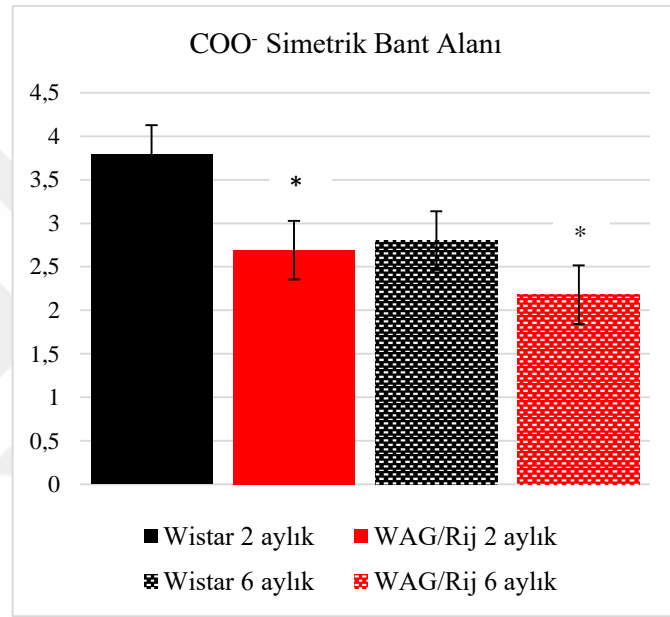
Şekil 3.10. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının amid I (A) ve amid II (B) bant alanı değerleri.

Şekil 3.11'de 2 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının lipid/protein alan oranları verilmiştir. 2 aylık Wistar ve 2 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında bant alan oranlarında WAG/Rij grubunda azalma saptanırken ($p<0,001^{**}$), 6 aylık Wistar ve 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij bant alan oranında yüksek değerlere kayma gözlemlendi ($p<0,001^{**}$). Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırılmasında da 6 aylık grubunda anlamlı olarak artma ($p<0,001^{**}$) olduğu tespit edildi.



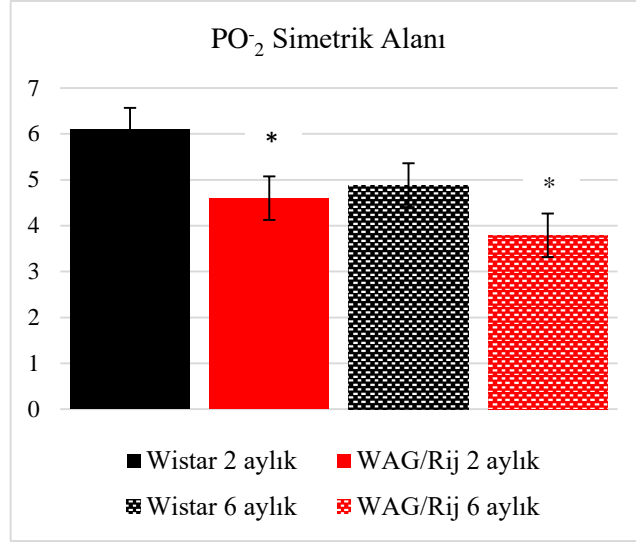
Şekil 3.11. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının lipid/protein alan oranı değerleri.

1400 cm^{-1} 'deki 8 numaralı COO^- simetrik gerilme bandı yağ asitlerinden kaynaklanmaktadır (Türker ve diğ., 2014a; Severcan ve diğ., 2010; Akkaş ve diğ., 2007). Şekil 3.12'de görüldüğü üzere 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının alan değerlerinde azalma ($p<0,05^*$) olduğu tespit edildi. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında 6 aylık gruplarda belirgin düzeyde azalma ($p<0,05^*$) olduğu saptandı.



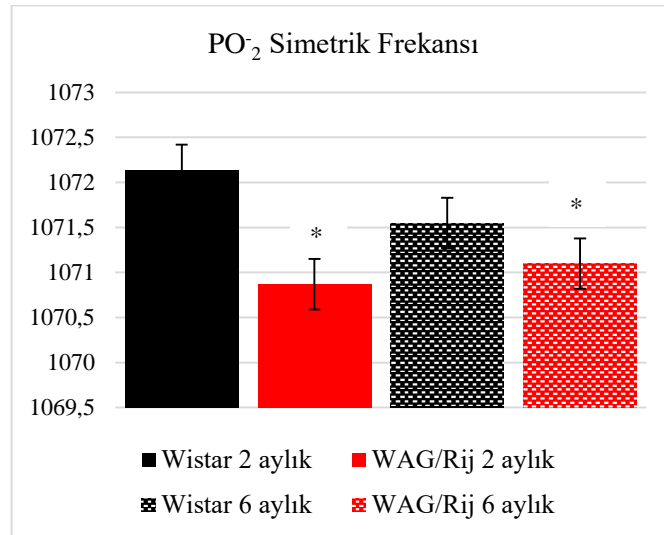
Şekil 3.12. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının COO^- simetrik bant alanı değerleri.

1236 cm^{-1} deki 10 numaralı PO_2 simetrik gerilme bandı esas olarak, hücrel nükleik asitlerin ve fosfolipitlerin fosfodiester omurgasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Sivakumara ve diğ., 2014; Çakmak ve diğ., 2006). Şekil 3.13'de görüldüğü üzere 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarının bant alan değerlerinde azalma ($p<0,05^*$) tespit edildi. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij gruplarının karşılaştırılması sonucunda da 6 aylık grupların alan değerlerinde anlamlı düzeyde düşük değerlere kayma ($p<0,05^*$) elde edildi.



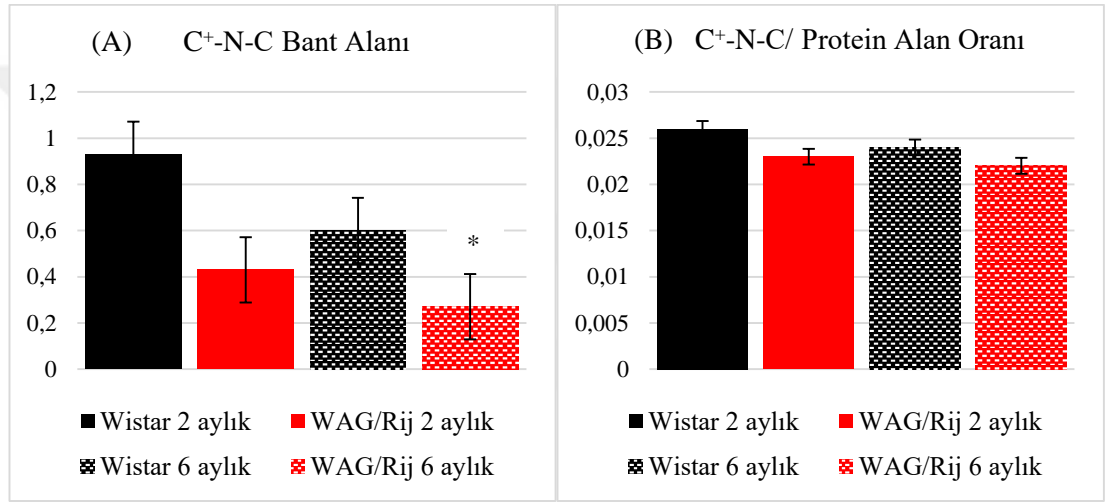
Şekil 3.13. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının PO₂ simetrik bant alanı değerleri.

Şekil 3.14'te 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının PO₂ simetrik gerilme bantı frekans değerleri verildi. Şekilden görüldüğü üzere 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında frekans değerleri WAG/Rij gruplarında azalma ($p < 0,05^*$) gözlemlendi. Ayrıca 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar karşılaştırılmasında 6 aylık grupta azalma ($p < 0,001^{**}$) görülürken, 2 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında 6 aylık grubun frekans değerinde artma ($p < 0,05^*$) saptandı.



Şekil 3.14. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının PO₂ bant frekans değerleri.

970 cm^{-1} 'deki 12 numaralı C⁺-N-C bandı esas olarak ribonükleik asit (RNA) ve DNA'dan kaynaklanmaktadır (Sivakumara ve diğ., 2014; Türker-Kaya ve diğ. 2016). Şekil 3.15. (A)' da bandın bant alan değerleri, Şekil 3.15. (B)' de ise C⁺-N-C/protein alan oran değerleri verildi. Şekil 3.15 (A) ve (B)' de görüldüğü üzere bant alanı ve alan oranları, 2 aylık Wistar ile 2 aylık WAG/Rij grupları, 6 aylık Wistar ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında WAG/Rij gruplarında azalma ($p<0,05^*$) gözlemlendi. 2 aylık Wistar ile 6 aylık Wistar grupları, 2 aylık WAG/Rij ile 6 aylık WAG/Rij grupları karşılaştırıldığında da hem bant alanı hemde bant alan oranı değerleri için 6 aylık gruplarda düşük değerlere kayma ($p<0,05^*$) tespit edildi.



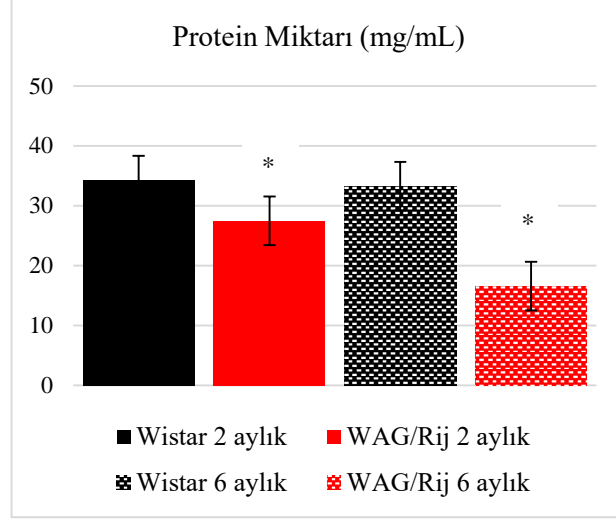
Şekil 3.15. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının C-N-C bant alanı (A) ve RNA/protein alan oranı (B) değerleri.

3.2.Biyokimyasal Testler

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

3.2.1.Bradford testi

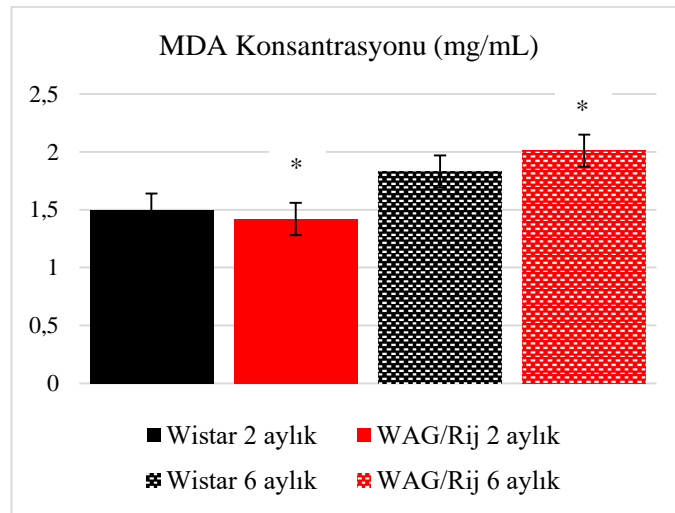
Şekil 3.16.'da görüldüğü üzere protein miktarı 2 aylık ve 6 aylık WAG/Rij grubunda 2 aylık Wistar ve 6 aylık Wistar grubuna kıyasla düşük değerlerde ($p<0,001^{**}$) tespit edildi. Sonuçlar FT-IR çalışmalarındaki amid I ve amid II bant alan değeri sonuçlarını destekler niteliktedir.



Şekil 3.16. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij sıçan gruplarının protein miktarları.

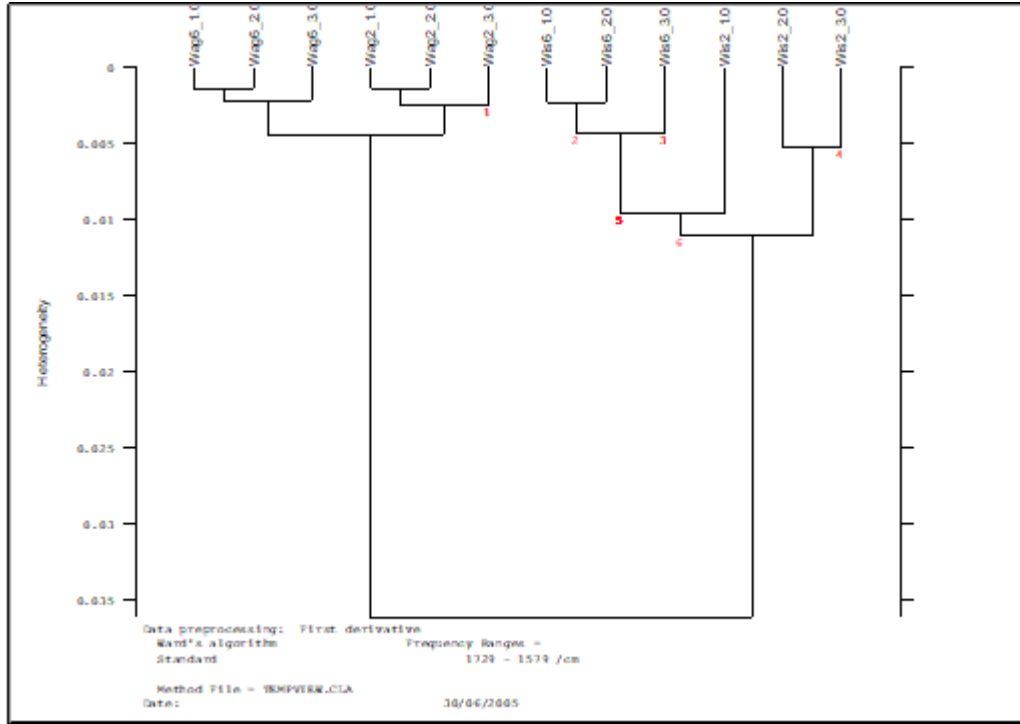
3.2.2.TBARs testi

Şekil 3.17.'de görüldüğü üzere MDA seviyesi 6 aylık WAG/Rij grubunda kontrol ve 2 aylık WAG/Rij gruplarına göre yüksek değerlerde bulundu. Sonuçlar, 2-6 aylık Wistar gruplarına göre 6 aylık WAG/Rij grubunun olefinik bant alan değerlerindeki azalmayla paralel olarak MDA seviyesinin önemli ölçüde arttığını ($p<0,001^{**}$) gösterdi. Ancak 2 aylık WAG/Rij grubunun MDA miktarı olefinik bant alanı değerlerinden farklı olarak, 2-6 aylık Wistar ve 6 aylık WAG/Rij grubuna göre düşük ($p<0,001^{**}$) değerlerde tespit edildi.



Şekil 3.17. 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij sıçan gruplarının MDA konsantrasyonları.

3.3.HCA analizi



Şekil 3.18. 1729–1579 cm^{-1} spektral aralığın da 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının HCA dendrogramı.

Şekil 3.18.'de 1729 - 1579 cm^{-1} bölgelerindeki spektral farklılıklara dayanan kümeleme analizi dendrogramını gösterildi. Her grup için kümeleme analizindeki dendrograma bakıldığında, 2-6 aylık Wistar ve 2-6 aylık WAG/Rij gruplarının birbirinden ayrıştırılması % 100 özgülük ve duyarlılık ile gerçekleştirildi.

4.TARTIŞMA

WAG/Rij ırkı sıçanlar AE'nin iyi bilinen genetik bir modelidir (Karimzadeh ve diğ., 2017; Fedosova ve diğ., 2015). Bu sıçanlarda 2-3 aylık dönem arasında SWD'ler görülmeye başlar. SWD sayısı ve süresi yaşla birlikte artar ve 6 aylık olduklarında tüm sıçanlar epileptik hale gelir (Sarkisova ve van Luijtelaar, 2011; Sitnikova, 2011). Bundan dolayı bu genetik model yaşla beraber artan epileptik aktivitenin beyinde meydana getirdiği moleküler değişiklikleri incelemek için oldukça uygun bir modeldir. Bu tez çalışmasında belirtilen konuya katkı sağlamak amacı ile 2-6 aylık WAG/Rij sıçan beyin dokuları FT-IR spektroskopisi ve biyokimyasal testler ile moleküler seviyede 2-6 aylık Wistar sıçanların beyinleri ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Çalışmada kullanılan FT-IR spektroskopisi hücrelerde ve dokularda biyokimyasal ve moleküler değişikliklerin hassas bir şekilde ölçülmesini sağlayan biyofiziksel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Sivakumar ve diğ., 2014; Diem ve diğ., 2008). Dokular ve biyolojik sıvılardan yapılan FT-IR analizleri ile hastalık patolojilerine bağlı değişiklikler hakkında önemli veriler ortaya konabilmesinden dolayı çalışmada bu teknik kullanıldı (Turker- Kaya ve diğ., 2016; Çakmak ve diğ., 2016; Turker ve diğ., 2014a,b; Severcan ve diğ., 2010; Akkaş ve diğ., 2007).

Beyin lipit bakımından en zengin organlardan biridir. (Misztak ve diğ., 2015; Brown ve Murphy 2000; Bazan ve diğ., 1994). Lipitler , hücre zarındaki proteinlerin lokalizasyonunu ve fonksiyonunu belirler ve böylece nöronlarda sinaptik verimi düzenlerler (Misztak ve diğ., 2015). Çok sayıda lipit özellikle plazma membranında bulunur, burada iç ve dış hücresel ortamları ayıran fiziksel bir bariyer oluştururlar. Plazma zarının komponenti olan membran lipitleri ayrıca hücre sinyallemede rol oynarlar. Bunu yaparken aynı zamanda sinaptik verimi de düzenlerler (Misztak ve diğ., 2015; Litman ve diğ., 2001). Lipit konsantrasyonu, organizasyonu ve metabolizmasındaki değişiklikler epilepsinin işleyişinde iyi bir patolojik sebep olabilir. Bundan dolayı lipitlerin bu denli önemli oluşu WAG/Rij epileptogenizdeki yerini araştırmamızda önemli bir faktör oldu.

Beyin, yüksek konsantrasyonlarda çoklu doymamış yağ asitlerini içermektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri oksidatif strese karşı oldukça hassastır (Akkas ve diğ., 2007; Reiter ve diğ., 1993). Beyin, özellikle miyelin kılıflarının yüksek lipit içeriği dikkate alındığında serbest radikal saldırılarına karşı oldukça savunmasızdır (Türkdogan ve diğ., 2002). Özellikle epileptik aktivite sırasında yüksek oranda serbest radikal oluşumu söz konusu olduğundan (Haznedar ve diğ., 2019; Ambrogini ve diğ., 2019; Yuen ve diğ., 2018) çalışmaya lipit peroksidasyonu tayininin dahil edilmesi önem arz etmektedir. Benzer yaklaşım Türker ve diğ., (2014a, 2014b) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Olefinik bandının (3012 cm^{-1}) absorbans/alanı oksidatif stress ile ilişkili lipit peroksidasyonunu izlemek, dolayısıyla lipitlerin açıl zincirlerinde doymamışlık ölçüsünü belirlemek amacı ile kullanılmaktadır (Türker-Kaya ve diğ. 2016; Özek ve diğ., 2014; Bozkurt ve diğ., 2012). Örneğin, lipit peroksidasyonu gerçekleştiğinde olefinik bant alanında ve olefinik/lipit oranında düşüş beklenir (Türker ve diğ., 2014a; Leskovjan ve diğ., 2010). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, 2 ve 6 aylık Wistarlara göre 2 ve 6 aylık WAG/Rij gruplarının olefinik bant alan ve olefinik/lipit alan oran değerlerindeki azalma, özellikle de 6 aylıklarda azalmanın fazla olması, epileptik aktivite ve beyin gelişimi ile birlikte lipit moleküllerinin açıl zincirlerindeki doymamışlık popülasyonunda bir düşüşe işaret etmektedir (Liyanage ve diğ., 2018; Surowka ve diğ., 2014). Ancak FT-IR spektroskopisi ile, bu düşüşün doymamış lipitlerin konsantrasyonlarındaki düşüşe mi yoksa lipit peroksidasyonuna mı bağlı olduğu tam olarak ayırt edilememektedir (Cock ve diğ., 2002 ; Türker ve diğ., 2014b). Bu konuyu netleştirmek için karaciğer ve beyin dokusu gibi çeşitli biyolojik numunelerde oksidatif hasarın ölçümü için kabul görmüş ve yaygın olarak kullanılan TBARs testi gerçekleştirildi (Dawn-Linsley ve diğ., 2005; Meagher ve Fitzgerald, 2000). Bu yöntemle, lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA seviyesi kolayca belirlenebilmektedir (Pothiwong ve diğ., 2007). TBARs testi sonuçlarımıza göre 6 aylık Wistar ve 2 aylık WAG/Rij grubu ile karşılaştırıldığında 6 aylık WAG/Rij grubunda MDA seviyesinde artma tespit edildi. Bu sonuç, FT-IR verilerinden elde edilen olefinik bandının alanındaki ve olefinik/lipit oranındaki düşüşün lipit peroksidasyonundan kaynaklandığını kanıtlar niteliktedir. WAG/Rij sıçan dokularında tespit edilen lipit peroksidasyonu literatüre göre reaktif oksijen türleri

(ROS) ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasıyla meydana gelir. Antioksidan düzeylerine kıyasla orantısız bir serbest radikal üretiminin, oksidatif yaralanma ile çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli bir katkı faktörü olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres ile artan ROS hali hazırda antioksidan kapasitesi sınırlı olan beyin dokusunda antioksidan seviyelerinde azalmaya yol açar ve artan ROS ile olan denge bozulur (Meric ve diğ., 2016; Shin ve diğ., 2011; Yis ve diğ., 2009). Bu dengenin bozulması direkt olarak epileptik aktivitenin altında yatan sebeplerden olan glutamat ve GABA gibi sinyal iletiminde rol oynayan ana nörotransmitterlerin işleyişinde bozukluklara sebebiyet verir. Yüksek nöronal aktivite boyunca, glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin salınımı gerçekleşir (Sudha ve diğ., 2001). Glutamat salınımıyla birlikte, hücre içi Ca^{+2} seviyelerini yükselten fosfolipazlar aktive edilir. Aktive edilmiş fosfolipazlar, daha fazla glutamat salınmasının yanı sıra depolarizasyonla uyarılmış Ca^{+2} birikimlerini daha fazla glutamat salınımını arttırmak için membran fosfolipitlerini parçalamaya iter ve araşidonik asit (AA) oluşturur (Türker ve diğ., 2014a; Adibhatla ve diğ., 2006). Oluşan AA, prostaglandinler, lörotinler ve ROS üretmek için metabolize edilir. AA metabolizması tarafından üretilen ROS, hücresel proteinlere kovalent olarak bağlanan ve işlevlerini değiştiren MDA gibi lipid peroksidlerini üretir. Bu nedenle, lipid peroksidasyonuna neden olan aşırı ROS üretimi, hem uzun vadede membran fonksiyon bozukluğu, nöronal yaralanma ve hücre ölümüne hem de uzun vadede nöbet aktivitesini tetikleyebilir (Patel ve diğ., 2004; Frantseva ve diğ., 2000). Diğer taraftan 2 aylık WAG/Rij grubunda ise MDA seviyesinin azalması beyin gelişimi sırasında epileptik aktiviteye karşı gösterilen savunma sisteminin etkisi olarak değerlendirilebilir. Yapılan bazı çalışmalarda olgunlaşmamış beynin olgunlaşmış beyne oranla nöbet eşiğinin düşük olmasına rağmen olgunlaşmış beynin nöbet esnasında çok daha fazla etkilendiği gözlemlenmiştir (Sanchez ve Jensen, 2001; Holmes ve diğ., 2001). Bu durum olgunlaşmış beynin temel sinyalleme yollarının çok daha gelişmiş olmasından kaynaklanmaktadır (Holmes ve diğ., 2001). Sonuç olarak gelişmiş bir beynin (6 aylık grupların) ROS'nin yıkıcı etkisinden çok daha fazla etkilendiği söylenebilir. Bu literatür bilgisi WAG/Rij 2 aylık grubunun MDA seviyesinin WAG/Rij 6 aylık grubundan çok daha düşük olmasını açıklar niteliktedir. Enzimler, iyon kanalları ve reseptörler gibi çeşitli membrana bağlı zar proteinleri, aşırı, anormal ve senkronize sinir hücresi aktivitesinin sonucu olarak tanımlanan

epileptik nöbetlerin oluşumunda rol oynarlar (Avanzini ve Franceschetti; 2003). Bunlar arasında, integral zar proteinleri, hidrofobik etkileşim ve van der Waals yolu ile zar lipitlerinin açıl zincirleri ile etkileşime girerler. Diğer taraftan, periferik zar proteinleri ağırlıklı olarak elektrostatik ve hidrojen bağı etkileşimleri ile lipit kafa gruplarına bağlanır (Türker ve diğ.,2014a). Membran bileşenleri arasındaki bu ikili ilişki lipit ve proteinlerin fiziksel özelliklerini, onların konformasyonunu ve dolayısıyla hem model hem de biyolojik zar sistemlerinde gösterildiği gibi aktivitelerini karşılıklı olarak etkileyebilir (Türker ve diğ., 2014a,b). Bu bilgi ışığında membran lipit ve proteinlerinin yapısal, konformasyonel ve konsantrasyonel farklılıklarının WAG/Rij sıçanlarda epileptogeneze katkı sağlayıp sağlamadığıyla ilgili bilgi edinmeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda zar lipitlerinin açıl zincirleri ya da kafa grupları gibi farklı bölgelerinden ve membran proteinlerden kaynaklı olan, CH₂ asimetrik, CH₂ simetrik, C=O, COO⁻ simetrik, amid I, amid II ve PO₂ simetrik gerilme bantları incelendi.

Lipitlerin açıl zincirlerinden kaynaklı olan CH₂ asimetrik / simetrik gerilme bantlarının alan değerleri doymuş yağ konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir (Liyanage ve diğ., 2018; Dogan ve diğ., 2013; Bozkurt ve diğ., 2010). CH₂ asimetrik bant alan değerleri için 2-6 aylık WAG/Rij gruplarında ve 6 aylık Wistar grubunda azalma tespit edildi. 6 aylık WAG/Rij grubundaki azalma nispeten epilepsinin etkisi ile 6 aylık Wistar grubundan fazlaydı. Normal şartlar altında biyolojik sistemde lipit peroksidasyonu gerçekleştiğinde çalışmamızda tespit edildiği gibi doymamış yağlarda azalma olurken doymuş yağlarda artma beklenir. Fakat sonuçlarımıza göre doymuş yağların miktarındaki düşme daha kısa zincirli açıl zincirlerinin varlığını göstermektedir. Bu durumu hem dopaminerjik nöronlar ve hücre dışı boşluklarda lipitlerin bozulmasından hem de antioksidasyon yollarının yaşa bağlı epilepsi ile birlikte bozulmasının ve serbest radikallerin aşırı artan yıkıcı etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Oksidatif stresin, çeşitli lipit ve protein ilişkili beyin bölgesindeki etkileri yapılan önceki araştırmalar ile de desteklenmektedir (Surowka ve diğ., 2014; Ruiperez ve diğ., 2010). CH₂ asimetrik bandına ek olarak ayrıca CH₂ simetrik bant alan değerleri de hesaplandı ancak bu değerler istatistik olarak anlamlı değildi. Bu durum CH₂ simetrik bandının tüm gruplar için değerlerinin arasında oldukça fazla fark olmasından (standart sapma değerlerinin yüksek olmasından)

kaynaklanmaktadır. Daha da önemlisi CH₂ simetrik bandının CH₃ simetrik bandı (Şekil 3.2.) ile çakışma oranı oldukça yüksek olduğundan CH₃ simetrik bandının kamuflej etkisi oldukça fazladır. Bundan dolayı CH₂ asimetrik bandında görülen istatistiksel anlamlılık CH₂ simetrik bandında görülmemiş olabilir.

Lipit organizasyonu ve bileşimi; hücre zarı yüzeyinde gerçekleşen transport, enzim aktivitesi, kimyasal sekresyon, reseptör bağlanması ve uyarımı dahil olmak üzere bir dizi etkinlik için önemli bir parametre olan zar akışkanlık parametresini baskın olarak belirler (Türker-Kaya ve diğ., 2018; Türker ve diğ., 2014b; Marsh ve diğ., 1990). CH₂ asimetrik/simetrik bant genişliği değerleri doğrudan zar akışkanlığı hakkında bilgi vermektedir (Severcan ve diğ., 2005; Toyran ve diğ., 2003). Bant genişliğindeki azalma zar akışkanlığındaki bir azalmayı ifade etmektedir (Çakmak ve diğ., 2016). Her iki bant içinde 2 aylık Wistar grubuna göre 6 aylık Wistar grubunun bant genişliği değerlerinde artma gözlemlenirken, 2 aylık WAG/Rij grubuna göre 6 aylık WAG/Rij grubunda azalma, zar içerisinde daha kısa zincirli lipitlerin varlığından kaynaklanıyor olabilir (Türker-Kaya ve diğ., 2016). Bu durum olefinik ve CH₂ asimetrik bant alanlarındaki azalmayla yani kısa zincirli doymuş ve doymamış yağların tespit edilmesi ile de tutarlıdır. Lipit peroksidasyonu sonucunda azalan lipit miktarı bant genişliğindeki azalmayı kanıtlar niteliktedir. Membran akışkanlığındaki farklılık, KBB'deki glikoz taşıyıcılarının işlev bozukluğuna da sebep olabilir. Sonuç olarak, serebral kan akımı metabolik talebi telafi edemez ve böylelikle beyinde enerji iletim bozukluğu meydana gelir. KBB' de meydana gelen beyin enerji seviyeleri ve fonksiyonu ile ilgili patolojilerin bozulmuş olan KBB yapısı ile birlikte nöbetleri teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Janigro, 1999). Ayrıca yapılan bir çalışmada beyin gelişimi sırasında beynin lipit içeriğinin oluşumunda KBB'nin büyük rol oynadığı gösterilmiştir. KBB'nin beyin gelişimi esnasında serebral kan akımıyla birlikte beyin lipit içeriğine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Betsholtz, 2015). Bu durum KBB'nin yapısındaki herhangi bir bozukluğun lipit bantlarının alan değerlerindeki azalmayı gösteren sonuçlarımızın kanıtı niteliğindedir. Ayrıca membran akışkanlığındaki değişikliklerin, Na⁺, K⁺ ve Cl⁻ dahil olmak üzere farklı iyonik kanalların kinetiğini ve fonksiyonunu etkilediğine ve böylece zarın uyarılabilirliğini değiştirdiğine dair kanıtlarda mevcuttur (Shivanoor ve diğ., 2016; Sirvent ve diğ., 2008; Awayda ve diğ., 2004).

CH₂ asimetrik bandının frekans değerinde ise 2 aylık Wistar grubuna göre; 2 aylık WAG/Rij ve 6 aylık Wistar grubunda azalma gözlenirken, 6 aylık WAG/Rij grubunda önemli ölçüde artma tespit edildi. Frekans değerlerindeki bu kayma, lipitlerin düzeni ve açıl zincir esnekliğindeki değişikliklerin saptanmasında belirteç olarak kullanılmaktadır (Liyanage ve diğ., 2018; Çakmak ve diğ., 2016). 6 aylık Wistar grubunun önemli ölçüde düşük değerlere kayması, lipit moleküllerinin trans konformasyonlarındaki bir artışı gösterir ve bu da lipit düzeninde bir artışa işaret eder (Türker ve diğ., 2014a; Sara ve diğ., 2007; Severcan ve diğ., 2005). Ayrıca 6 aylık WAG/Rij grubunda frekans değerinde gözlenen artma açıl zincirlerindeki gauche konformasyonlarındaki önemli bir artışı göstermektedir (Türker ve diğ., 2014; Bozkurt ve diğ., 2012; Çakmak ve diğ., 2011) Bu da lipit düzensizliğini işaret eder (Türker-Kaya ve diğ., 2016; Akkaş ve diğ., 2007, Çakmak ve diğ., 2006). Bu durumun olası nedeni ise epilepsi aktivitesi ile birikim gösteren serbest radikallerden kaynaklanabilir. Serbest radikaller, membran lipitlerinin doymuş/doymamış yağ asiti oranını değiştirerek, membranların lipit kompozisyonunu değiştirirler. Bu, lipit düzeninde azalmaya ya da artmaya sebep olur (Şimşek-Özek ve diğ., 2010 ; Türker ve diğ., 2014a). Muhtemelen lipit düzenindeki ve dinamiklerdeki böyle bir değişiklik, ayrıca iyon kanallarının uzun süreli aktivasyonunda ana rol oynayabilir ve beyindeki bu sinyalleme, nörodejeneratif hastalıklara ve özellikle epilepsiye neden olabilir (Shivanoor ve diğ., 2016). Ancak bant alan değerlerinde olduğu gibi CH₂ simetrik frekans değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlılık yoktu. Bu durumun CH₂ simetrik bant alan değerlerinde olduğu gibi frekans değerlerinde de elde edilen sonuçlarda aynı grup içerisinde çok farklı sonuçların olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Kolesterol, membran akışkanlığından sorumlu olan nöral membranların ana bileşenlerinden biridir. Nöral membranlardaki kolesterol düzeyi azalırken toksik metabolik ürünlerinin yaşla birlikte arttığına dair kanıtlar vardır (Surowka ve diğ., 2014; Yehuda ve diğ., 2002). Bu etkiler nöral membranların işlevselliğini etkileyebilir. Gerçekten de, membran kolesterol ile ilgili olan bu patolojik süreçler membran akışkanlığında değişikliklere sebep olabilir (Surowka ve diğ., 2014; Yehuda ve diğ., 2002). C=O gerilme bandı kolesterol, trigliserit, ve membran lipitlerinin karbonil gruplarından kaynaklıdır (Çakmak ve diğ., 2003; Nara ve diğ.,

2002). Bu bandın alanı için 6 aylık WAG/Rij grubundaki artmanın sebeplerinden bir tanesi lipit peroksidasyonu olabilir. Lipit peroksidasyonu ile ilgili daha önceki çalışmalarda, lipit peroksidasyonu gerçekleştiğinde karbonil grupları içeren lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşumundan dolayı C=O gruplarında bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Manda ve diğ., 2007; Lamba ve diğ., 1994). Bu bilgiler ışığında verilerimize göre olefinik bandının alanındaki düşüşle ve yapılan TBARs testi ile kanıtlanmış olan lipit peroksidasyonu sonucunda karbonil gruplarının arttığı sonucuna varılmaktadır. Bununla birlikte artan trigliserit, kolesterol ve karbonil grupları membran lipitlerinin kompozisyonel değişikliklerinede sebep olmuş olabilir (Sivakumara ve diğ., 2014). Ayrıca C=O/lipit alan oran değerleri de hesaplandı. 2 aylık Wistar grubu ile karşılaştırıldığında da 6 aylık Wistar, 2 aylık WAG/Rij grubu ile karşılaştırıldığında ise 6 aylık WAG/Rij grubunda azalma tespit edildi. 6 aylık WAG/Rij grubundaki azalmanın nispeten diğer gruplardan daha fazla olması karbonil gruplarındaki artmaya rağmen lipit peroksidasyonu sonucunda azalan lipit içeriğinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Yağ asitlerinden kaynaklı olan COO⁻ simetrik bandının bant alan değerleri ne göre 2 aylık Wistar grubuna göre 6 aylık Wistar grubunda, 2 aylık WAG/Rij ve 6 aylık Wistar grubuna göre ise 6 aylık WAG/Rij grubunda azalma yağ asitlerinin parçalanmasının ve epileptik aktivite sırasında ROS'un neden olduğu hasarın bir sonucu olabilir.

Hücre zarındaki lipit miktarındaki ve kompozisyonundaki değişiklikler zarın akışkanlığını olumsuz yönde etkileyebilir. Biyolojik hücre zarları, hücrenin çevresi ile arasındaki bariyeri oluşturan karmaşık yapılardır. Zarin protein ve lipit bileşenleri, yapıları ve fonksiyonları için hayati önem taşıyan çift tabakalı dinamik bir yapı oluşturmak üzere kendilerini organize ederler (Bogdanov ve diğ., 2014). Zar içinde lipitler, zar proteinlerinin yerleştirilmesinde, katlanmasında, aktivitesinde büyük rol oynar. Protein ve lipit bileşimi arasındaki etkileşimi çözmek için lipit-protein etkileşimlerinin karmaşıklığını anlamak önemlidir (Duneau ve diğ., 2017). Değişen lipit kompozisyonu bu nedenle, zar proteinlerinde yapısal değişikliklere sebep olabilir (Litman ve diğ., 2001). Bu yapısal değişikliklerin bir sonucu olarak protein fonksiyonları bozulabilmektedir (Misztak ve diğ., 2015; Baghai ve diğ., 2010). Mevcut araştırmalara göre nöronlar için toplam protein seviyesindeki azalma, nöronal

protein açısından zengin bileşenlerin hem hasarına hem de bozunmasına atfedilmektedir (Surowka ve diğ., 2014; Nihar, 2012). Protein kaybı, esas olarak proteinlerdeki hidrojen ve sülfid bantlarının parçalanmasıyla gerçekleşir. Bu tür kopmalar, proteinlerin açılmasına ve iç yapının düzensizleşmesine neden olabilir (Shivanoor ve diğ., 2016; Toyran ve diğ., 2005). Protein hasarı hücreyel canlılık üzerinde kritik etkiye sahiptir. Bunun sebebi çoğu protein hasarı tamir edilemez ve protein yapısı ve işlevi üzerinde negatif sonuçlara neden olur (Höhn ve diğ., 2013). WAG/Rij sıçanlarının somatosensoryel korteksindeki piramidal nöronların hiperpolarizasyonla aktive olan akımlarının doğal özellikleri, bu alanda diğeri iki sıçan suşununkilerden (Wistar ve ACI) farklı bulunmuş ve fizyolojik özelliklerin bu modifikasyonu nöronlara, azaltılmış bir protein ifadesi eşlik ettiği belirlenmiştir (Luijtelaar ve Sitnikova, 2006; Strauss ve diğ., 2004). Elde ettiğimiz sonuçlara göre 2-6 aylık WAG/Rij gruplarındaki amid I ve amid II bant alanlarında anlamlı şekildeki düşüş, yukarıda belirtilen literatür bilgileri ile uyumaktadır. Ayrıca amid I ve amid II bantlarındaki bu azalmayı biyokimyasal olarak da desteklemek amacı ile çalışmamıza Bradford testi dahil edildi. Bradford sonuçlarımızda 2-6 aylık WAG/Rij grubunda protein miktarı FT-IR sonuçlarımızı destekler nitelikte düşük değerlerde elde edildi. Bu alanlardaki azalmanın, protein sentezinin ve protein yapısının epilepsiye bağlı olarak değişmesinin sonucu olabileceği önceki araştırmalarda da belirtilmiştir (Sivakumara ve diğ., 2014; Türker ve diğ., 2014a). Proteinlerdeki anormallikler ile lipid peroksidasyonunun artması arasında ortak bir mekanizma olduğu ve oksidatif strese yol açabilecek iyi bir korelasyon olduğu düşünülmektedir. Serbest radikal etkilerine maruz kalan proteinler, değişmiş birincil, ikincil ve üçüncül yapı sergileyebileceği gibi kendiliğinden de parçalanmaya uğrayabilir (Höhn ve diğ., 2013; Waldbaum ve diğ., 2009; Akkas ve diğ., 2007). Bu durum proteoliz, doku hasarı ve nörotoksisiteye karşı daha fazla duyarlılığa yol açabilir. Protein içeriğindeki azalma, ayrıca literatürde, epileptik nöbetler üzerine rapor edilen dopamin D1, D2 reseptörleri (Tchekalarova ve diğ., 2005) ve siRNA aracılı GABA reseptörü gibi bazı spesifik proteinlerin az sentezlenmesinden de kaynaklanabilir (Naseer ve diğ., 2010). GABA_A reseptörleri, GABA tarafından açılabilen ve çeşitli anti-epileptik ilaçların etki bölgesi olan klorür kanallarıdır (Urak ve diğ., 2006). GABA_A reseptörlerinin inhibe edici etkilerinde herhangi bir artış, anti-konvülsif etkilere neden olurken, bu reseptörlerin işlevinde bir azalma konvülsiyonlara neden

olabilmektedir (Urak ve diğ., 2006; Sieghart ve Sperk., 2002). Dopamin sisteminin özellikleri için ise, WAG/Rij ve diğ er genetik epileptik sıçanlarda değişikliklere işaret eden çok sayıda veri vardır (Bazyan ve diğ., 2017; Fedosova ve diğ., 2015; Sarkisova ve van Luijtelaar., 2011). Dopamin ve metabolitlerinin azalmış konsantrasyonu WAG/Rij sıçanlarında beyin yapısında ortaya çıkan ilk nörokimyasal anormalliktir (Fedosova ve diğ., 2015). 6 aylıktan itibaren absans epilepsisinin etkisinin artması ile birlikte dopamin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarında azalma meydana geldiği düşünölmektedir (Bazyan ve diğ., 2017). Ayrıca amid I ve amid II bant alanındaki azalma, nöronlardaki iyon kanallarının α ve β proteinleri de dahil olmak üzere zar proteinlerinde bir düşüş olduğunu gösteriyor olabilir (Shivanoor ve diğ., 2016).

Membran yapısındaki bahsettiğimiz değişikliklerle birlikte lipit/protein oranındaki artma fizyolojik fonksiyon ve patolojik bozuklukların düzenlenmesinde temel olduğu bilinmektedir (Awayda ve diğ., 2004). Lipit ve/veya protein asimetrisinin hücre fonksiyonlarındaki önemi nedeniyle buradaki varyasyonları saptamak için spesifik olarak lipit/protein alan oranı hesapladı (CH_2 asimetrik + CH_2 simetrik / amid I + amid II) (Çakmak ve diğ., 2011). Benzer yaklaşım daha önceki çalışmalarda da yapılmıştır (Türker ve diğ., 2014; Çakmak ve diğ., 2011; Doğan ve diğ., 2007). 6 aylık WAG/Rij grubunda, 2 aylık WAG/Rij ve 6 aylık Wistar grubuna göre lipit/protein oranında önemli ölçüde artma tespit edildi. Lipit/protein oranındaki bu artış sistemdeki lipit miktarının artmasından, protein miktarının azalmasından ya da her iki olayın aynı anda gerçekleşmesinden de kaynaklanabilir. Biz bulgularımızda genel olarak lipit bantlarında WAG/Rij gruplarının lipit moleküllerinde azalma tespit ettik. Fakat bu azalmanın oranı proteinin azalma oranından daha az seviyede olduğu için lipit/protein oranında artma bulundu. Bunun nedeni, üretilen serbest radikallerin, proteinlerin, arginin, lizin, treonin veya prolin kalıntılarında yan zincir amino gruplarına karşılık gelen serbest radikal kaynaklı karbonillere dönüştürölmesi yoluyla yapısal modifikasyonlara neden olabilmesi olabilir (Shivanoor ve diğ., 2016; Aksenov ve diğ., 2001). Bu tip olaylar, membran pertürbasyonunu hesaba katabilir ve epileptik aktivite sırasında kalıcı bir zar bütönlüğü kaybı ile ilişkili olan canlılık kaybını kanıtlayabilir (Türker ve diğ., 2014a).

Ana lipit bileşenlerinden biri olan fosfolipitler, beyin zarındaki yanıtlara aracılık eden bir elçi görevindedir (Misztak ve diğ., 2015; Baghai ve diğ., 2010). Buna göre fosfolipit profilindeki değişiklikler beyindeki farklı patolojik süreçlere yol açabilir (Misztak ve diğ., 2015; Baghai ve diğ., 2010; Litman ve diğ., 2001). 1300-900 cm^{-1} arasındaki dalga boylarındaki absorpsiyon bantları, fosfat grubu taşıyan bileşiklerin yanı sıra, karbonhidratların farklı halka titreşimleriyle ilişkilidir (Kneipp ve diğ., 2000). C=O gerilme ve PO_2 simetrik bantlarının frekans değerlerindeki farklılıklar ise fosfolipitlerin paketlenme derecesi hakkında bilgi vermektedir (Türker ve diğ., 2014b). C=O gerilme ve PO_2 simetrik gerilme bantlarının frekans değerlerinde 2 aylık Wistar ve 6 aylık WAG/Rij grubu ile karşılaştırıldığında 6 aylık Wistar grubunda düşük değerlere kayma saptanırken, 6 aylık Wistar ile karşılaştırıldığında 6 aylık WAG/Rij grubunda azalma, 2 aylık WAG/Rij grubuyla karşılaştırıldığında ise frekans değerinde artma olduğu tespit edildi. C=O gerilme ve PO_2 simetrik bantlarının frekanslarındaki düşük değerlere kaymalar, membran lipitlerinin hidrofilik kısmı ve polar kafa grubunun yanında bulunan gliserol omurgasının hidrasyon durumunda bir artış olduğunu göstermektedir (Türker ve diğ., 2014a). Hidrojen bağı, su molekülleri ile fosfolipitlerin hem karbonil hem de fosfat gruplarının oksijen molekülleri arasında olabilir (Akkas ve diğ., 2007). 6 aylık WAG/Rij grubunun frekans değerinde gözlenen artma ise beyin gelişimine epilepsinin negatif etkisi ile lipitlerin karbonil ve fosfat gruplarının hidrojen bağlarında zayıflama meydana geldiğini göstermektedir (Çakmak ve diğ., 2016). Bu durum, fosfolipit moleküllerinin paketlenmesinde bir fark yaratabilir (Türker ve diğ., 2014a). Öte yandan, membran lipitlerinin farklı şekilde paketlenmesi, hücre reseptörleri olarak görev yapabilen ve hücreler arası iletişim görevi görebilen glikolipitlerin ve glikoproteinlerin fonksiyonlarını etkileyebilir ve tüm bu değişiklikler, epileptik nöbetlerin oluşmasında temel bir rol oynayabilir (Kneipp ve diğ., 2000; Diem ve diğ., 2008; Liquier ve diğ., 1996). Ancak PO_2 simetrik bandının frekans değerindeki artma ve azalmalar istatistiksel olarak anlamlı iken C=O bandı için bu parametredeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun sebebi C=O bandının özelliklerinden olabilir. Bir başka deyişle Şekil 3.7.'de görüldüğü üzere C=O bandı (1740 cm^{-1}) CH_2 asimetrik bandı gibi dik ve simetrik bir absorpsiyon yerine should (omuz) adı verilen bir görünüştür. Bunun sebebi C=O bandının kendisinden bir sonraki gelen oldukça yüksek ve baskın absorpsiyon

gösteren amid I (1640 cm^{-1}) modunun komponentleri (alt bantlarını) tarafından kapatılmasıdır. Olası durumdan dolayı C=O bandının parametrelerindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı sonuç göstermeyebilir. Ayrıca PO_2 simetrik bandının bant alan değerleride hesaplandı. Yapılan bazı çalışmalarda sıçanların farklı beyin bölgelerinde 3 aylıktan itibaren sürekli olarak ağırlık artışı olduğu gözlenmiştir. Bu ağırlık artışının glia hücresi, miyelin, kolesterol, fosfolipit ve glikolipit gibi yapılardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Duvernoy ve diğ., 2005; Johnston ve diğ., 2004). Bu durum göz önüne alındığında elde ettiğimiz sonuçlarda 2 aylık WAG/Rij ve 6 aylık Wistar grupları ile karşılaştırıldığında 6 aylık WAG/Rij grubunda bant alan değerinin azalması epileptik aktivite sonucu fosfolipit sentezinin inhibisyonu yoluyla beyin fosfolipitlerinin konsantrasyonunun azaldığını göstermektedir.

RNA ve DNA'ya bağlı olan C⁺-N-C gerilme bandının bant alan değerleri nükleik asitlerin nispi konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir (Sivakumara ve diğ., 2014; Naumann ve diğ., 1991). C⁺-N-C bandının bant alan değerlerinde özellikle 6 aylık WAG/Rij grubundaki azalma serbest radikallerin dokularda ve hücrelerdeki DNA, nükleotit ve yapısal koenzimlerin bozulmasındaki etkisini düşündürmektedir (Türkdogan ve diğ., 2002). Ek olarak bu azalma, WAG/Rij grubunda özellikle 6 aylık grupta nükleik asitlerin nispi konsantrasyonunda azalma meydana geldiği anlamına gelir (Kubota ve diğ., 2004). Epilepsinin mRNA ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Peters ve diğ., 2015; Jansen ve diğ., 2014). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise epilepsinin, kan örneklerinde incelen 165 genin 69 unda gen ekspresyonunda artmaya sebep olurken 96 genin gen ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu saptanmıştır (Rawat ve diğ., 2019). Ayrıca C=O/lipit oranındaki düşüşün de, nükleik asitlerin nispi içeriğindeki bir azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir (Sivakumara ve diğ., 2014). RNA/protein oranı, protein sentezi ile ilişkili olabilen hücrelerde transkripsiyon durumu hakkında bilgi vermektedir. RNA/protein oranında 6 aylık Wistar grubunda ve 6 aylık WAG/Rij grubunda düşük değerlere kayma gözlemlenmiştir. 6 aylık WAG/Rij grubundaki azalma epilepsinin katkısından olacak ki daha fazlaydı. Bu düşük değerlere kayma düşük seviyede transkripsiyona bağlıdır (Türker-Kaya ve diğ., 2016). Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlardaki protein bantlarındaki azalmalar bu bant alan oranındaki düşüşlerin en büyük sebeplerindendir.

Son olarak HCA metodunu kullanarak elde ettiğimiz FT-IR spektrumlarının örneklerdeki spektral farklılıklarına göre ayrılıp ayrılmadığını test ettik. Her grup için kümeleme analizindeki dendrograma bakıldığında, 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarının birbirinden ayrıştırılması % 100 özgüllük ve duyarlılık ile gerçekleştirildi. Bu, 2-6 aylık WAG/Rij grubunun beyin dokusunda Wistar grubu ile karşılaştırıldığında moleküler anlamda FT-IR spektroskopisi ile analiz edilebilen farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Bu dendogram moleküler farklılıkların, WAG/Rij sıçanlarda oluşan epileptogenez ve absans epileptik aktivitelerine yol açtığını göstermektedir. Ayrıca dendogramda 2 ve 6 aylık WAG/Rij sıçanlarının birbirinden ayrılması FT-IR sonuçlarımızla uyumlu olarak yaş faktörünün beyin gelişimi ve epilepsi ile olan ilişkisindeki etkisini göstermektedir.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Epilepsi her yaşta insanda görülebilen ve dünya çapında yaklaşık 65 milyon insanı etkileyen nörolojik bir hastalıktır. Ancak epilepsinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Yaş epilepsi hastalığında oldukça önemli bir olgudur. Olgunlaşmış beyin erişkin beyninden nöbetlere, nöbet özelliklerine ve AEİ'lere karşı verilen yanıtlara duyarlılığı bakımından birbirinden ayrılmaktadır. Her ne kadar olgunlaşmamış beyin olgunlaşmış beyne göre epileptik nöbetlere daha yatkın olsada gelişmiş ve olgunlaşmış beyin epileptik aktivitelerin meydana getirdiği moleküler, fizyolojik ve patolojik süreçlere çok daha hassastır. Bunun sebebinin beyindeki elektriksel aktivitede görevli olan yapıların gelişmiş olması ve buradaki değişimlerin etkilerinin çok daha büyük sonuçlar doğurmasından kaynaklandığını ileri sürmekteyiz. Bu açıdan epilepsinin yaş bağımlılığının altında yatan moleküler mekanizmaların bilinmesi, yeni AEİ'lerin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayacaktır. Bu amaç ile 2-6 aylık Wistar ve WAG/Rij gruplarında moleküler anlamda bilgi edinebilmek için FT-IR spektroskopisi ve elde edilen spektral sonuçları desteklemek amacı ile de Bradford ve TBARs testlerini gerçekleştirdik. FT-IR çalışmamızın sonucunda, proteinler, lipitler, nükleik asitler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere biyomoleküller hakkında bilgiler elde edildi. Ayrıca spektral verilerimizi desteklemek amacı ile gerçekleştirdiğimiz Bradford testi ile protein miktar tayini yaparken, TBARs testi ile de MDA miktar tayini gerçekleştirildi.

Bulgularımız, özellikle yaşa bağlı olarak epileptogenezi olan 6 aylık WAG/Rij grubu beyin dokularının moleküler içeriğinde bazı değişimlerin gerçekleştiğini göstermektedir. Lipit, protein içeriğinde ve zar akışkanlığındaki azalma ve özellikle lipit/protein oranındaki artmanın gerçekleşmesi bunun en büyük kanıtıdır. Bu durum lipitlerin yaş ile ilişkili bir şekilde bozulduğunu ve buna bağlı olarak proteinlerde de tahribatın gerçekleştiğini göstermektedir.

Bu sonuçlar ışığında, epilepsinin yaşa göre değişimindeki en büyük etkenlerden biri olan oksidatif hasarın getirisi olan lipit peroksidasyonunun epilepsinin moleküler

mekanizmasında kilit bir nokta olduğunu düşünmekteyiz. Lipit peroksidasyonu sonucu bozulan membrandaki lipit protein dengesinin, KBB ve GABAerjik sistem gibi nöbet mekanizmasında büyük rolü olan olaylarda altta yatan en büyük moleküler etki olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle, oksidatif hasarı azaltmak için gerekli antioksidan sistemlerinin geliştirilmenin epilepsi tedavisi bakımından gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, lipit düzeni, akışkanlığı, paketlenmesi ve protein miktarlarındaki saptadığımız farklılıkların AEİ'lerin hedefi olarak ileri sürülebilir.



KAYNAKLAR

Aamodt S. M., Constantine-Paton M., The Role of Neural Activity in Synaptic Development and its Implications for Adult Brain Function, *Advances in Neurology*, 1999, **79**, 133–44.

Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R., Begley D. J., Structure and Function of the Blood-Brain Barrier, *Neurobiology of Disease*, 2010, **37**(1), 13-25.

Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J., Lipids and Lipidomics in Brain Injury and Diseases, *The AAPS Journal*, 2006, **8**(2), 314- 321.

Ahishali B., Kaya M., Orhan N., Arican N., Ekizoglu O., Elmas I., Kucuk M., Kemikler G., Kalaycı R., Gurses C., Effects of Levetiracetam on Blood-Brain Barrier Disturbances Following Hyperthermia Induced Seizures in Rats with Cortical Dysplasia, *Life Science*, 2010, **87**(19-22), 609-619.

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, **836**, 207–215.

Aksenov M. Y., Aksenova M. V., Butterfield D. A., Geddes J. W., Markesbery W.R., Protein Oxidation in the Brain in Alzheimer's Disease, *Neuroscience*, 2001, **103**(2), 373–383.

Ambrogini P., Torquato P., Bartolini D., Molecular Basis of Disease Excitotoxicity , Neuroinflammation and Oxidant Stress as Molecular Bases of Epileptogenesis and Epilepsy-Derived Neurodegeneration: The Role of Vitamin E, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2019, **1865**(6), 1098-1112.

Arhan E., Serdaroglu A., Ozturk B., Ozturk H. S., Ozelik A., Kurt N., Effects of Epilepsy and Antiepileptic Drugs on Nitric Oxide, Lipid Peroxidation and Xanthine Oxidase System in Children with Idiopathic Epilepsy, *Seizure European Journal of Epilepsy*, 2011, **20**(2), 138-142.

Arida R. M., Scorza C. A., Schmidt B., de Albuquerque M., Cavalheiro E. A., Scorza F. A., Physical Activity in Sudden Unexpected Death in Epilepsy: Much More than a Simple Sport, *Neuroscience Bulletin*, **24**(6), 374–380.

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

Awayda M. S., Shao W., Guo F., Zeidel M., Hill W. G., ENaC-Membrane Interactions: Regulation of Channel Activity by Membrane Order, *The Journal of General Physiology*, 2004, **123**(6), 27-709.

Baghai T. C., Varallo-Bedarida G, Born C., Häfner S., Schüle C., Eser D., Rupprecht R., Bondy B., von Schacky C., Major Depressive Disorder is Associated With Cardiovascular Risk Factors and Low Omega-3 Index, *The Journal of Clinical Psychiatry*, 2010, **72**(9), 1242–7.

Ballabh P., Braun A., Nedergaard M., The Blood-Brain Barrier: an Overview: Structure, Regulation and Clinical Implications, *Neurobiology Disease*, 2004, **16**(1), 1-3.

Baysal-Kirac L., Tuzun E., Altindag E., Ekizoglu E., Kinay D., Bilgic B., Tekturk P., Baykan B., Are There Any Specific EEG Findings in Autoimmune Epilepsies?, *Clinical EEG and Neuroscience*, 2015, **47**(3), 224–234.

Bazan N. G., Rodriguez de Turco E. B., Review: Pharmacological Manipulation of Docosaehaenoic-Phospholipit Biosynthesis in Photoreceptor Cells: Implications in Retinal Degeneration, *Journal of Ocular Pharmacology*, 1994, **10**(3), 591–604.

Bazyan A. S., van Luijtelaar G., Neurochemical and Behavioral Features in Genetic Absence Epilepsy and in Acutely Induced Absence Seizures, *Neurology*, 2013, **48**.

Berg A. T., Shinnar S., Levy S. R., Testa F. M., Newly Diagnosed Epilepsy in Children: Presentation at Diagnosis, *Epilepsia*, 1999, **40**(4), 445-52.

Berkovic S. F., Scheffer I. E., Genetics of the Epilepsies, *Epilepsia*, 2001, **42**(5), 16-23.

Betsholtz C., Lipid Transport and Human Brain Development, *Nature Genetics*, 2015, **47**(7), 699-701.

Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H., Lipids and Topological Rules Governing Membrane Protein Assembly, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, **1843**(8), 1475-1488.

Bombardi C., Venzi M., Crunelli V., Di Giovanni G., Developmental Changes of GABA Immunoreactivity in Cortico-Thalamic Networks of an Absence Seizure Model, *Neuropharmacology*, 2018, **136**, 56-67.

Borst J. W., Visser N. V., Kouptsova O., Visser A. J., Oxidation of Unsaturated Phospholipids in Membrane Bilayer Mixtures is Accompanied by Membrane Fluidity Changes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1487** (1), 61-73.

Bozkurt O., Bayari S. H., Severcan M., Krafft C., Popp J., Severcan F., Structural Alterations in Rat Liver Proteins Due to Streptozotocin-Induced Diabetes and the Recovery Effect of Selenium: Fourier Transform Infrared Microspectroscopy and Neural Network Study, *Journal of Biomedical Optics*, 2012, **17**(7), 076023.

Bozkurt O., Bilgin M. D., Severcan F., The Effect of Diabetes Mellitus on Rat Skeletal Extensor Digitorum Longus Muscle Tissue: An FTIR Study, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007, **21**(3), 151-160.

Bozkurt O., Severcan M., Severcan F., Diabetes Induces Compositional, Structural and Functional Alterations on Rat Skeletal Soleus Muscle Revealed by FTIR Spectroscopy: a Comparative Study with EDL Muscle, *The Analyst*, 2010, **135** (12), 3110–3119.

Brown H. A., Murphy R. C., Working Towards an Exegesis for Lipids in Biology, *Nature Chemical Biology*, 2000, **5**(9), 602–6.

Casey B. J., Giedd J. N., Thomas K. M., Structural and Functional Brain Development and Its Relation to Cognitive Development, *Biological Psychology*, 2000, **54**(1-3), 241-257.

Cengiz M., Yüksel A., Seven M., The Effects of Carbamazepine and Valproic acid on the Erythrocyte Glutathione, Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase and Serum Lipid Peroxidation in Epileptic children, *Pharmacological Research*, 2000, **41**(4), 423-425.

Ceru S., Rabzelj S., Kopitar-Jerala N., Turk V., Zerovnik E., Protein Aggregation as a Possible Cause for Pathology in a Subset of Familial Unverricht- Lundborg Disease, *Medical Hypotheses*, 2005, **64**(5), 955–959.

Chahboune H., Mishra A. M., DeSalvo M. N., Staib L. H., Purcaro M., Scheinost D., Papademetris X., Fyson S.J., Lorincz M.L., Crunelli V., Hyder F., Blumenfeld H., DTI Abnormalities in Anterior Corpus Callosum of Rats with Spike–Wave Epilepsy, *Neuroimage*, 2009, **47**(2), 459–66.

Chang S. J., Yu B. C., Mitochondrial Matters of the Brain: Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Status in Epilepsy, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2010, **42**, 457-7.

Chapman A. G., Glutamate Receptors in Epilepsy, *Progress in Brain Research*, 1998, **116**, 371–83.

Chwiej J., Dulinska J., Janeczko K., Dumas P., Eichert D., Dudala J., Setkowicz Z., Synchrotron FTIR Micro-Spectroscopy Study of the Rat Hippocampal Formation After Pilocarpine-Evoked Seizures, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2010, **40**(2), 140-147.

Cock H. R., Tong X., Hargreaves I. P., Heales S. J. R., Clark J. B., Patsalos P., Thom M., Groves M., Schapira A. H., Shorvon S. D., Walker M. C., Mitochondrial Dysfunction Associated with Neuronal Death Following Status Epilepticus in Rat, *Epilepsy Research*, 2002, **48** (3), 157–168.

Coenen A. M., Van Luijtelaar E. L., Genetic Animal Models for Absence Epilepsy: A Review of the WAG/Rij Strain of Rats, *Behavior Genetics*, 2003, **33**(6), 635–55.

Coenen A. M., van Luijtelaar E. L., The WAG/Rij Rat Model for Absence Epilepsy, Age and Sex factors, *Epilepsy Research*, 1987, **1**(5), 291-301.

Cornford E. M., Gee M. N., Swartz B. E., Mandelkern M. A., Bland W. H., Landaw E. M., Delgado-Escueta A. V., Dynamic [18F] Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography and Hypometabolic Zones in Seizures: Reduced Capillary Influx, *Annals of Neurology*, 1998, **43**(6), 801-808.

Cornford E. M., Hyman S., Cornford M. E., Landaw E. M., Delgado-Escueta A. V., Interictal Seizure Resections Show Two Configurations of Endothelial GLUT1 Glucose Transporter in the Human Blood-Brain Barrier, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1998, **18**(1), 26-42.

Cornford E. M., Nguyen E. V., Landaw E. M., Acute Upregulation of Blood-Brain Barrier Glucose Transporter Activity in Seizures, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2000, **279**(3), H1346-354 .

Cornford E. M., Oldendorf W. H., Epilepsy and the Blood-Brain Barrier, *Advances in Neurology*, 1986, **44**, 787-812.

Crill W. E., Persistent Sodium Current in Mammalian Central Neurons, *Annual Review of Physiology*, 1996, **58**, 349–362.

Crunelli V., Leresche N., Childhood Absence Epilepsy: Genes, Channels, Neurons and Networks, *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, **3**(5), 371-382.

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

Çakmak G., Togan İ., Uguz C., Severcan F., FT-IR Spectroscopic Analysis of Rainbow trout Liver Exposed to Nonylphenol, *Applied Spectroscopy*, 2003, **57**(7), 835–41.

Çakmak G., Severcan M., Zorlu F., Severcan F., Structural and Functional Damages of Whole Body Ionizing Radiation on Rat Brain Homogenate Membranes and Protective Effect of Amifostine, *International Journal of Radiation Biology*, 2016, **92**(12), 837-848.

Dawn-Linsley M., Ekinçi F. J., Ortiz D., Rogers E., Shea T. B., Monitoring Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARs) as an Assay Form Oxidative Damage in Neuronal Cultures and Central Nervous System, *Journal of Neuroscience Methods*, 2005, **141**(2), 219-222.

De Bittencourt P. R., Adamolekun B., Bharucha N., Carpio A., Cossío O. H., Danesi M. A., Dumas M., Meinardi H., Ordinario A., Senanayake N., Shakir R., Sotelo J., Epilepsy in the Tropics:I. Epidemiology, Socioeconomic Risk Factors, and Etiology, *Epilepsia*, 1996, **37**(11), 1121-1127.

De Freitas R. M., do Nascimento K. G., Ferreira P. M., Jordán J., Neurochemical Changes on Oxidative Stress in Rat Hippocampus During Acute Phase of Pilocarpine- Induced Seizures, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2009b , **94**(3), 341-5.

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

Misztak P., Depciuch J., Sowa-Kućma M., Szewczyk B., Nowak G., Pankiewicz P., Parlińska-Wojtan M., Olfactory Bulbectomy-Induced Changes in Phospholipids and Protein Profiles in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of Rats, A Preliminary Study Using a FTIR Spectroscopy, *Pharmacological Reports*, 2015, **68**(3), 521-528.

Diem M., Griffiths P. R., Chalmers J. M., *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, John Wiley and Sons Chichester, United Kingdom, 2008.

Duneau J., Khao J., Sturgis J.N., Lipid Perturbation By Membrane Proteins and the Lipophobic Effect, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2017, **1859**(1), 126-134.

Duvernoy H. M., Cattin F., Risold P. Y., *The Human Hippocampus*, 3rd ed., Functions and Connections, Berlin, 2013.

Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F., The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, 1999, **51**(1), 7-61.

Dogan A., Ergen K., Budak F., Severcan F., Evaluation of Disseminated Candidiasis on an Experimental Animal Model: A Fourier Transform Infrared Study, *Applied Spectroscopy*, 2007, **61**(2), 199-203.

Dogan A., Lasch P., Neuschl C., Millrose K. M., Alberts R., Schughart K., Naumann D., Brockmann G. A., ATR-FTIR Spectroscopy Reveals Genomic Loci Regulating the Tissue Response in High Fat Diet Fed BXD Recombinant Inbred Mouse Strains, *BMC Genomics*, 2013, **14** (1) 1-17.

Fagni L., Lafon-Cazal M., Lerner-Natoli M., Rondouin G., Bockaert J., Role of Nitric Oxide and Free Radicals in the Glutamate-Mediated Neurotoxicity, *Journal de pharmacie de Belgique*, 1995, **50**(2-3), 204-212.

Farooqui A. A., Horrocks L. A., Phospholipase A2-Generated Lipid Mediators in the Brain: The Good, the Bad, and the Ugly, *The Neuroscientist*, 2006, **12**(3), 245-60.

Fedosova E. A., Folomkina A. A., Kulikov M. A., Kudrin V. S., Narkevich V. B., Bazyan A. S., Mechanisms of the Development and Integration of Nerve Processes: Age-Related Dynamics of the Development of Absence Epilepsy, Changes in the Concentration of Monoamines and Their Metabolites in the Brain Structures of WAG/Rij and Wistar Rats, and the Dynamics of the Disruption of Learning and Memory, *Journal of Neurochemistry*, 2017, **11**(4), 315-324.

Fedosova E. A., Sarkisova K. Y., Kudrin V. S., Narkevich V. B., Bazyan A. S., Behavioral and Neurochemical Characteristics of Two Months Old WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy, *International Journal of Clinical and Experimental Medical Sciences*, 2015, **3**(2), 32-44.

Frantseva M.V., Velazquez J.L., Hwang P.A., Carlen P.L., Free Radical Production Correlates With Cell Death in an in Vitro Model of Epilepsy, *The European Journal of Neuroscience*, 2000, **12**, 1431-1439.

Freitas R. M., Investigation of Oxidative Stress Involvement in Hippocampus in Epilepsy Model Induced by Pilocarpine, *Neuroscience Letters*, 2009a, **462**(3), 225–229.

Freitas R. M., Vasconcelos S. M., Souza F. C., Viana G. S., Fonteles M. M., Oxidative Stress in the Hippocampus After Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Wistar Rats, *The FEBS Journal*, 2005, **272**(6), 1307–1312.

Friedman A., Blood-Brain Barrier Dysfunction, Status Epilepticus, Seizures, and Epilepsy: A Puzzle of a Chicken and Egg?, *Epilepsia*, 2011, **52**(8), 19-20.

Friedman A., Heinemann U., Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis, Editors: Noebels J.L., Avoli M., Rogawski M. A., Olsen R. W., Delgado-Escueta A. V., *Source Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies 4th edition*, United States of America, 2012

Garip S., Bozoglu F., Severcan F., Differentiation of Mesophilic and Thermophilic Bacteria with FTIR Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 2007, **61**(2), 186-192.

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

Giedd J. N., Raznahan, A., Mills K. L., Lenroot R. K., Review: Magnetic Resonance Imaging of Male/Female Differences in Human Adolescent Brain Anatomy, *Biology of Sex Differences*, 2012, **3**(1), 19.

Gottesmann C., The Transition From Slow-Wave Sleep to Paradoxical Sleep: Evolving Facts and Concepts of the Neurophysiological Processes Underlying the Intermediate Stage of Sleep, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1996, **20**(3), 367–87.

Grune T., Shringarpure R., Sitte N., Davies K., Age-Related Changes in Protein Oxidation and Proteolysis in Mammalian Cells, *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 2011, **56**(11), B459-B467.

Gültürk S., İmir G., Tuncer E., Kan-Beyin Bariyeri, *Erciyes Tıp Dergisi*, 2007, **29**(2), 147-154.

Haartsen R., Jones E. J. H., Johnson M. H., Human Brain Development Over the Early Years, *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, **10**, 149-154.

Halliwell B., Gutteridge M. C., Oxygen is poisonous: an that introduction to oxygen toxicity and free radicals, Editors: Hal-liwell B., Gutteridge M.C., *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed., Oxford: Clarendon Press, England, 1–20, 1991.

Haris P. I., Severcan F., FTIR Spectroscopic Characterization of Protein Structure in Aqueous and Non-Aqueous Media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1999, **7**(1-4), 207–221.

Hartmann K., Bruehl C., Golovko T., Draguhn A., Fast Homeostatic Plasticity of Inhibition via Activity-Dependent Vesicular Filling, *Plos One*, 2008, **3**(8), 1-10.

- Hauser W. A., Epidemiology of Epilepsy in Children, *Neurosurgery Clinics of North America*, 1995, **6**(3), 419–429.
- Hauser W. A., Seizure Disorders: The Changes With Age, *Epilepsia*, 1992, **33**(4), 6-14.
- Haznedar P., Doğan Ö., Albayrak P., Öz G., Teber S., Deda G., Eminoglu T., Effects of Levetiracetam and Valproic Acid Treatment on Liver Function Tests, Plasma Free Carnitine and Lipid Peroxidation in Childhood Epilepsies, *Epilepsy Research*, 2019, **153**, 7–13.
- Hedley-Whyte E. T., Lorenzo A. V., Hsu D. W., Protein Transport Across Cerebral Vessels During Metrazole-Induced Convulsions, *American Journal of Physiology*, 1977, **233**(3), C74-85.
- Hendry S. H., Hsiao S. V., *Fundamental Neuroscience*, 3rd ed., Academic Press, nited States of America, 2008.
- Hirose S., Mutant GABA(A) Receptor Subunits in Genetic (Idiopathic) Epilepsy, *Progress in Brain Research*, **213**, 55-85.
- Hirose S., Okada M., Kaneko S., Mitsudome A., Are Some Idiopathic Epilepsies Disorders of Ion Channels?: A Working Hypothesis, *Epilepsy Research*, 2000, **41**, 191-204.
- Hirsch E., Baram T. Z., Snead O. C., Ontogenic Study of Lithium-Pilocarpineinduced Status Epilepticus in Rats, *Brain Research*, 1992, **583**(1-2), 120–126.
- Holmes G. L., Gaiarsa J. L., Chevassus-Au-Louis N., Ben-Ari Y., Consequences of Neonatal Seizures in the Rat: Morphological and Behavioral Effects, *Annals of Neurology*, 1998, **44**(6), 845–857.
- Höhn A., König J., Grune T., Protein Oxidation in Aging and the Removal of Oxidized Proteins, *Journal of Proteomics*, 2013, **92**, 132-159.
- Höhn A., König J., Grune T., Protein Oxidation in Aging and the Removal of Oxidized Proteins, *Journal of Proteomics*, 2013, **92**, 132-159.
- Jackson M., Mantsch H. H., The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, **30**(2), 95–120.
- Jana N. R., Protein Homeostasis and Aging: Role of Ubiquitin Protein Ligases, *Neurochemistry International*, 2012, **60**(5), 443–447.
- Janigro D., Blood-Brain Barrier, Ion Homeostasis and Epilepsy: Possible Implications Towards the Understanding of Keto- genic Diet Mechanisms, *Epilepsy Research*, 1999, **37**(3), 223-232.

Jansen R., Batista S., Brooks A. I., Sex Differences in the Human Peripheral Blood Transcriptome, *BMC Genomics*, 2014, **15**, 33.

Johnson A. K., Gross P.M., Sensory Circumventricular Organs and Brain Homeostatic Pathways, *FASEB Journal*, 1993, **7**(8), 678-686.

Johnston D., Amaral D. G., Hippocampus, Editors: Shepherd G. M., *The Synaptic Organization of the Brain*, 3rd ed., Oxford University Press, New York, 2004.

Karayannis T., Au E., Patel J.C., Kruglikov I., Markx S., Delorme R., Heron D., Salomon D., Glessner J., Restituto S., Gordon A., Rodriguez-Murillo L., Roy N. C., Gogos J. A., Rudy B., Rice M. E., Karayiorgou M., Hakonarson H., Keren B., Huguet G., Bourgeron T., Hoeffler C., Tsien R. W., Peles E., Fishell G., Cntnap4 Differentially Contributes to GABAergic and Dopaminergic Synaptic Transmission, *Nature*, 2014, **511**,(7508), 236–240.

Karimzadeh F., Modarres Mousavi S. M., Alipour F., Hosseini Ravandi H., Kovac S., Gorji A., Developmental Changes in Notch1 and NLE1 Expression in a Genetic Model of Absence Epilepsy, *Brain Structure and Function*, 2017, **222**(6), 2773-2785.

Kastyak M. Z., Szczerbowska-Boruchowska M., Adamek D., Tomik B., Lankosz M., Gough K. M., Pigmented Creatine Deposits in Amyotrophic Lateral Sclerosis Central Nervous System Tissues Identified by Synchrotron Fourier Transform Infrared microspectroscopy and X-ray Fluorescence Spectromicroscopy, *Neuroscience*, 2010, **166**(4), 1119–1128.

Kikuchi Y., Kakeya T., Nakajima O., Sakai A., Ikeda K., Yamaguchi N., Yamazaki T., Tanamoto K., Matsuda H., Sawada J., Takatori K., Hypoxia Induces Expression of a GPI-Anchorless Splice Variant of the Prion Protein, *The FEBS Journal*, 2008, **275**(11), 2965–2976.

Kim S. Y., Buckwalter M., Soreq H., Vezzani A., Kaufer D., Blood-Brain Barrier Dysfunction-Induced Inflammatory Signaling in Brain Pathology and Epileptogenesis, *Epilepsia*, 2012, **53**(6), 37-44.

Klein J. P., Khera D. S., Nersesyan H., Kimchi E. Y., Waxman S. G., Blumenfeld H., Dysregulation of Sodium Channel Expression in Cortical Neurons in a Rodent model of Absence Epilepsy, *Brain Research*, 2004, **1000**(1-2), 102–9.

Kneipp J., Lasch P., Baldauf F., Beekes M., Naumann D., Detection of Pathological Molecular Alterations in Scrapie-Infected Hamster Brain by Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1501**(2-3), 189-199.

Kretschmann, H. J., Kammradt G., Krauthausen I., Sauer B., Wingert F., Brain Growth in Man, *Bibliotheca Anatomica*, 1986,**28** (28), 1–26.

Krishnakumar N., Prabu S. M., Sulfikkarali N. K., Quercetin Protects Against Cadmium-Induced Biochemical and Structural Changes in Rat Liver Revealed by FT-IR Spectroscopy, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2012, **2**(3), 179–185.

Kubota T., Fujisaki K., Itoh Y., Yano T., Sendo T., Oishi R., Apoptotic Injury in Cultured Human Hepatocytes Induced by HMG-CoA Reductase Inhibitors, *Biochemical Pharmacology*, 2004, **67**(12), 2175–2186.

Kucuk Baloglu F., Garip S., Heise S., Brockmann G., Severcan F., FTIR Imaging of Structural Changes in Visceral and Subcutaneous Adiposity and Brown to White Adipocyte Transdifferentiation, *The Analyst*, 2015, **140** (7) 2205–2214.

Kumar S, Reena S, Chaudhary S., Sweety, Jain D. C., Vibrational Studies of Different Human Body Disorders Using FTIR Spectroscopy, *Open Journal of Applied Sciences* , 2014, **4**(3), 103–129.

Lamba O .P., Borchman D., Garner W. H., Spectral Characterization of Lipid Peroxidation in Rabbit Lens Membranes Induced by Hydrogen Peroxide in the Presence of Fe^{2+}/Fe^{3+} Cations: A Sitespecific Catalyzed Oxidation, *Free Radical Biology & Medicine*, 1994, **10**, 591-601.

Leskovjan A., Kretlow A., Miller L., Fourier Transform Infrared Imaging Shows Reduced Unsaturated Lipid Content in Hippocampus of a Mouse Model of Alzheimer Disease, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**(7), 2711–2716.

Litman B. J., Niu S. L., Polozova A., The Role of Docosahexaenoic Acid Containing Phospholipids in Modulating G Protein-Coupled Signaling Pathways: Visual Transduction, *Journal of Molecular Neuroscience*, 2001, **16**(2–3), 237–42.

Liu K., Jackson M., Sowa M. G., Ju H., Dixon I. M. C., Mantsch H. H., Modification of the Extracellular Matrix Following Myocardial Infarction Monitored by FTIR Spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, **1315**(2), 73–77.

Liu Z., Gatt A., Mikati M., Holmes G. L., Long-Term Behavioral Deficits Following Pilocarpine Seizures in Immature Rats, *Epilepsy Research*, 1994,**19**(3), 191–204.

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

López-García F., Villalaín J., Gómez-Fernández J. C., Diacylglycerol, Phosphatidylserine and Ca^{2+} : a Phase Behavior Study, *Biochimica et Biophysica Acta* ,1994, **1190**(2), 264-272.

Lotharius J., Dugan L. L., O'Malley K. L., Distinct Mechanisms Underlie Neurotoxin-mediated Cell Death in Cultured Dopaminergic Neurons, *Journal of Neuroscience* , 1999, **19**(4), 1284–93.

Löscher W., Fit for Purpose Application of Currently Existing Animal Models in the Discovery of Novel Epilepsy Therapies, *Epilepsy Research*, 2016, **126**, 157-184.

Luhmann H. J., Mittmann T., van Luijckelaar G., Heinemann U., Impairment of Intracortical GABAergic Inhibition in a Rat Model of Absence Epilepsy, *Epilepsy Research*, 1995, **22**(1), 43-51.

Manda K., Ueno M., Moritake T., Anzai K., A-Lipoic Acid Attenuates X-Irradiation-Induced Oxidative Stress in Mice, *Cell Biology and Toxicology*, 2007, **23**, 129–137.

Marchi N., Granata T., Ghosh C., Janigro D., Blood-Brain Barrier Dysfunction and Epilepsy: Pathophysiologic Role and Therapeutic Approaches, *Epilepsia*, 2012, **53**(11), 1877-1886.

Marsh D., Lipid-Protein Interactions in Membranes, *FEBS Letters*, 1990, **268**(2), 371-5.

Meagher E. A., Fitzgerald G. A., Indices of Lipid Peroxidation In Vivo: Strengths and Limitations, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2000, **28**(12), 1745-1750.

Medina M. T., Duron R. M., Martinez L., Osorio J. R., Estrada A. L., Zúniga C., Cartagena D., Collins J. S., Holden K. R., Prevalence, Incidence and Etiology of Epilepsies in Rural Honduras: the Salama Study, *Epilepsia*, 2005, **46**(1), 124-131.

Meeren, H. K., van Cappellen van Walsum A. M., van Luijtelaar E. L., Coenen A. M., Auditory Evoked Potentials From Auditory Cortex, Medial Geniculate Nucleus, and Inferior Colliculus During Sleep–Wake States and Spike-Wave Discharges in the WAG/Rij Rat, *Brain Research*, 2001, **898**(2), 321–331.

Melin A. M., Perromat A., Deleris G., Pharmacological Application of Fourier Transform IR Spectroscopy: In Vivo Toxicity of Carbontetrachloride on Rat Liver, *Biopolymers*, 2000, **57**(3), 160–168.

Mello L. E., Cavalheiro E. A., Tan A. M., Kupfer W. R., Pretorius J. K., Babb T. L., Finch D. M., Circuit Mechanisms of Seizures in the Pilocarpine Model of Chronic Epilepsy: Cell Loss and Mossy Fiber Sprouting, *Epilepsia*, 1993, **34**(6), 985–995.

Mengler L., Khmelinskii A., Diedenhofen M., Po C., Staring M., Lelieveldt B. P., Hoehn M., Brain Maturation of the Adolescent Rat Cortex and Striatum: Changes in volume and Myelination, *NeuroImage*, 2013, **84**, 35-44.

Menon B., Ramalingam K., Vinoth R., Oxidative Stress in Patients With Epilepsy is Independent of Antiepileptic Drugs, *Seizure European Journal of Epilepsy*, 2012, **21**(10), 780-784.

Mihaly A., Bozok B., Immunohistochemical Localization of Extra Vasated Serum Albumin in the Hippocampus of Human Subjects With Partial and Generalized Epilepsies and Epileptiform Convulsions, *Acta Neuropathologica*, 1984, **65**(1), 25-34.

Mills K. L., Goddings A., Herting M. M., Meuwese R., Blakemoore S. J., Crone E. A., Dahl R. E., Güroğlu B., Raznahan A., Sowell E. R., Tamnes C. K., NeuroImage Structural Brain Development Between Childhood and Adulthood: Convergence Across four Longitudinal Samples, *NeuroImage*, 2016, **141**, 273-281.

Meric A., Zahid M., Canseven A.G., Effects of Cell Phone Radiation on Lipid Peroxidation, Glutathione and Nitric Oxide Levels in Mouse Brain During Epileptic Seizure, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2016, **75**, 111-115.

- Morin-Brureau M., De Bock F., Lerner-Natoli M., Organotypic Brain Slices: A model to study the Neurovascular Unit Micro-Environment in Epilepsies, *Fluids and Barriers of the CNS*, 2013, **10**(1), 11.
- Naumann D., Helm D., Labischinski H., Microbiological Characterizations by FT-IR Spectroscopy. *Nature*, 1991, **351**, 81–2.
- Nara M., Okazaki M., Kagi H., Infrared Study of Human Serum Very-Low-Density and Low-Density Lipoproteins. Implication of Esterified Lipid C=O Stretching Bands for Characterizing Lipoproteins, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2002, **117**(1-2), 1-6.
- Naseer M. I., Lee H., Ullah N., Ullah I., Park M., Kim M., Ethanol and PTZ Effects on siRNA-Mediated GABAB1 Receptor: Down Regulation of Intracellular Signaling Pathway in Prenatal Rat Cortical and Hippocampal Neurons, *Synapse*, 2010, **64**(3), 181–190.
- Niso G., Carrasco S., Gudín M., Maestú F., Del-Pozo F., Pereda E., What Graph Theory Actually Tells us About Resting State Interictal MEG Epileptic Activity, *NeuroImage: Clinical*, 2015, **23**(8), 503-515.
- Noebels J., Pathway-Driven Discovery of Epilepsy Genes, *Nature Neuroscience*, 2015, **18**(3), 344-350.
- Oliver C. N., Starke-Reed P. E., Stadtman E. R., Lin G. J., Correy J. M., Floyd R. A., Oxidative Damage to Brain Proteins, Loss of Glutamine Synthetase Activity and Production of Free Radicals During Ischemia/ Reperfusion Induced Injury to Gerbil Brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, **87**(5), 144–7.
- Panayiotopoulos C. P., Obeid T., Waheed G., Differentiation of Typical Absence Seizures in Epileptic Syndromes. A video EEG Study of 224 Seizures in 20 Patients, *Brain*, 1989, **112**(4), 1039-56.
- Panayiotopoulos C. P., Typical Absence Seizures and Their Treatment, *Archives of Disease in Childhood*, 1999, **81**(4), 351–355.
- Patel M., Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress: Cause and Consequence of Epileptic Seizures, *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, **37**(12), 1951- 1962.
- Peters M.J., Joehanes R., Pilling L. C., The Transcriptional Landscape of Age in Human Peripheral Blood, *Nature Communications*, 2015, **6**, 8570.
- Petibois C., Deleris G., Chemical Mapping of Tumor Progression by FTIR Imaging: Towards Molecular Histopathology, *Trends in Biotechnology*, 2006, **24**(10), 455-462.
- Placencia M., Shorvon S. D., Paredes V., Bimos C., Sander J. W., Suarez J., Cascante S. M., Epileptic Seizures in an Andean Region of Ecuador: Incidence and Prevalence and Regional Variation, *Brain*, 1992, **115**(3), 771-782.

Poeggler B., Reiter R. J., Tan D. X., Chen L.D., Manchester L. C., Melatonin, Hydroxyl Radical-Mediated Oxidative Damage, and Aging: A Hypothesis, *Neuroendocrinology Letters*, 1993, **15**, 103.

Pothiwong W., Laorpaksa A., Pirarat N., Sirisawadi S., Intarapanya J., Jianmongkol S., Autoxidation of Brain Homogenates From Various Animals as Measured by Thiobarbituric Acid assay, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2007, **56**(3), 336-338.

Rawat C., Kushwaha S., Srivastava A. K., Kukreti R., Genomics Peripheral Blood Gene Expression Signatures Associated with Epilepsy and its Etiologic Classification, *Genomics*, 2019, 0-1.

Ruipérez V., Darios F., Davletov B., Alpha-Synuclein, Lipids and Parkinson's Disease, *Progress in Lipid Research*, 2010, **49**(4), 420-428.

Rwiza H. T., Kilonzo G. P., Haule J., Matuja W. B., Mteza I., Mbena P., Kilima P. M., Mwaluko G., Mwang'ombola R., Mwajjande F., Prevalence and Incidence of Epilepsy in Ulanga, a Rural Tanzanian District: A Community-Based Study, *Epilepsia*, 1992, **33**(6), 1051-1056.

Saija A., Princi P., Pisani A., Lanza M., Scalese M., Aramnejad E., Ceserani R., Costa G., Protective Effect of Glutathione on Kainic Acid-Induced Neuropathological Changes in the Rat Brain, *General Pharmacology*, 1994, **25**(1), 97-102.

Sanchez R. M., Jensen F. E., Maturation Aspects of Epilepsy Mechanisms and Consequences for the Immature Brain, *Epilepsia*, 2001, **42**(5), 577-585.

Sarkisova K., van Luijtelaar G., The WAG/Rij Strain: A Genetic Animal Model of Absence Epilepsy with Comorbidity of Depression, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2011, **35**(4), 854-76.

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

Schlaepfer E. T., Bewernick B. H., Kayser S., Hurlemann R., Coenen V. A., Deep Brain Stimulation of the Human Reward System for Major Depression—Rationale, Outcomes and Outlook *Neuropsychopharmacology*, 2014, **39**(6), 1303-1314.

Schultz C. P., Liu K. Z., Kerr P. D., Mantsch H. H., In Situ Infrared Histopathology of Keratinization in Human Oral/Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma, *Oncology Research*, 1998, **10**(5), 277-286.

Severcan F., Bozkurt O., Gurbanov R., Gorgulu G., FT-IR Spectroscopy in Diagnosis of Diabetes in Rat Animal Model, *Journal of Biophotonics*, 2010, **3**(8-9), 621-31.

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

Severcan F., Toyran N., Kaptan N., Turan B., Fourier Transform Infrared Study of the Effect of Diabetes on Rat Liver and Heart Tissues in the C-H Region, *Talanta*, 2000, **53**(1), 55-59.

Shangguan Y., Xu X., Ganbat B., Li Y., Wang W., Yang Y., Lu X., Du C., Tian X., Wang X., CNTNAP4 Impacts Epilepsy Through GABA_A Receptors Regulation: Evidence From Temporal Lobe Epilepsy Patients and Mouse Models, *Cerebral Cortex*, 2018, **28**(10), 3491-3504.

Sheen S. H., Kim J. E., Ryu H. J., Yang Y., Choi K. C., Kang T. C., Decrease in Dystrophin Expression Prior to Disruption of Brain-Blood Barrier Within the Rat Piriform Cortex Following Status Epilepticus, *Brain Research*, 2011, **1369**, 173-183.

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-Induced Oxidative Damage in Rat Neural Tissues by Turmeric-Diet: Fourier Transform-Infrared and Biochemical Investigation, *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 2016, **77**, 56-68.

Sieghart W., Sperk G., Subunit Composition, Distribution and Function of GABA(A) Receptor Subtypes, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, **2**(8), 795–816.

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

Sirvent P., Mercier J., Lacampagne A., New Insights Into Mechanisms of Statin Associated Myotoxicity, *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, **8**(3), 333–338.

Sitnikova E., Hramov A. E., Grubov V., Koronovsky A. A., Time-Frequency Characteristics and Dynamics of Sleep Spindles in WAG/Rij Rats With Absence Epilepsy, *Brain Research*, 2014, **1543**, 290-299.

Sitnikova E., Hramov A. E., Koronovsky A. A., van Luijckelaar G., Sleep Spindles and Spike-Wave Discharges in EEG: Their Generic Features, Similarities and Distinctions Disclosed With Fourier Transform and Continuous Wavelet Analysis, *Journal Neuroscience Methods*, 2009, **180**(2), 304-316.

Sitnikova E., Neonatal Sensory Deprivation Promotes Development of Absence Seizures in Adult Rats with Genetic Predisposition to Epilepsy, *Brain Research*, 2011, **1377**, 109-18.

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

Sohal R. S., Sohal B. H., Orr W. C., Mitochondrial Superoxide and Hydrogen Peroxide Generation, Protein Oxidative Damage, and Longevity in Different Species of Flies, *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, **19**(4), 499–504.

Stafstrom C. E., Chronopoulos A., Thurber S., Thompson J. L., Holmes G. L., Agedependent Cognitive and Behavioral Deficits Following Kainic Acid-Induced Seizures, *Epilepsia*, 1993, **34**(3), 420–432.

Staniszewska E., Malek K., Baranska M., Rapid Approach to Analyze Biochemical Variation in Rat Organs by ATR-FTIR Spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **118**, 981-6.

Steinlein O. K., Genetic Mechanisms that Underlie Epilepsy, *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, **5**(5), 400-408.

Strauss U., Kole M. H., Brauer A. U., Pahnke J., Bajorat R., Rolfs A., Nitsch R., Deisz R. A., An Impaired Neocortical Ih is Associated with Enhanced Excitability and Absence Epilepsy, *European Journal of Neuroscience*, 2004, **19**(11), 3048-58.

Sudha K., Rao A. V., Rao A., Oxidative Stress and Antioxidants in Epilepsy, *Clinica Chimica Acta*, 2001, **303**(1-2), 19-24.

Surowka A. D., Adamek D., Radwanska E., Szczerbowska-Boruchowska M., Variability of Protein and Lipid Composition of Human Substantia Nigra in Aging: Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Study, *Neurochemistry International*, 2014, **76**, 12-22

Swann J. W., Pierson M. G., Smith K. L., Lee C. L., Developmental Neuroplasticity: Roles in Early Life Seizures and Chronic Epilepsy, *Advances in Neurology*, 1999, **79**, 203–16.

Tchekalarova J., Sotiriu E., Georgiev V., Angelatou F., Up-Regulation of Adenosine A1 Receptor Binding in Pentylentetrazol Kindling in Mice: Effects of Angiotensin IV *Brain Research*, 2005, **1032**(1-2), 94–103.

Tecott L. H., The Genes and Brains of Mice and Men, *American Journal of Psychiatry*, 2003, **160**(4), 646–56.

Tejada S., Sureda A., Roca C., Gamundi A., Esteban S., Antioxidant Response and Oxidative Damage in Brain Cortex After High Dose of Pilocarpine, *Brain Research Bulletin*, 2007, **71**(4), 372–375.

Tomson T., Nashef L., Ryvlin P., Sudden Unexpected Death in Epilepsy: Current Knowledge and Future Directions, *The Lancet Neurology*, 7:1021–1031.

- 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.
- Toyran N., Zorlu F., Severcan F., Effect of Stereo Tactic Radio Surgery on Lipids and Proteins of Normal and Hypo Fused Rat Brain Homogenates, A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study, *International Journal of Radiation Biology*, 2005, **81**, 911–918.
- Treiman D. M., GABAergic Mechanisms in Epilepsy, *Epilepsia*, 2001, **42**(3), 8–12.
- Turkdogan D., Toplan S., Karakoc Y., Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Childhood Epilepsy, *Journal of Child Neurology*, 2002, **17**(9), 673–676.
- Türker S., İlbay G., Severcan, M., Severcan F., Investigation of Compositional, Structural, and Dynamical Changes of Pentylenetetrazol-Induced Seizures on a Rat Brain by FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 2014a, **86**, 1395–1403.
- Türker S., Severcan M., İlbay G., Severcan F., Epileptic Seizures Induce Structural and Functional Alterations on Brain Tissue Membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014b, **1838**, 3088–3096.
- Türker-Kaya S., Komsuoğlu-Çelikyurt İ., Çelikyurt U., Kıma A., Inhibition of PDE4 by Low Doses of Rolipram Induces Changes in Lipid and Protein Components of Mice Heart, *General Physiology and Biophysics*, 2018, **37**(1), 1–12.
- Türker-Kaya S., Mutlu ., Çelikyurt, İ; Akar, F; Ulak, G, Tianeptine, olanzapine and fluoxetine show similar restoring effects on stress induced molecular changes in mice brain: An FT-IR study, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, **161**, 178–185.
- Urak L., Feucht M., Fathi N., Hornik K., Fuchs K., A GABRB3 Promoter Haplotype Associated With Childhood Absence Epilepsy Impairs Transcriptional Activity, *Human Molecular Genetics*. 2006, **15**(16), 2533–2541.
- Waldbaum S., Patel M., Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress: a Contributing Link to Acquired Epilepsy, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2010, **42**, 449–55.
- Waldbaum S., Patel M., Mitochondria, Oxidative Stress, and Temporal Lobe Epilepsy, *Epilepsy Research*, 2009, **88**(1), 23–45.
- van Luijtelaaar G., Hramov A., Sitnikova E., Koronovskii A., Spike-Wave Discharges in WAG/Rij Rats are Preceded By Delta and Theta Precursor Activity in Cortex and Thalamus, *Clinical Neurophysiology*, 2011, **122**(4), 687–695.
- van Luijtelaaar G., Sitnikova E., Global and Focal Aspects of Absence Epilepsy: The Contribution of Genetic Models, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2006, **30**(7), 983–1003.

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

van Vliet E. A., Otte W. M., Wadman W. J., Aronica E., Kooij G., de Vries H. E., Dijkhuijzen R. M., Gorter J.A., Blood-Brain Barrier Leakage After Status Epilepticus in Rapamycin-Treated Rats II: Potential mechanisms, *Epilepsia*, 2016, **57**(1), 70-78.

Waalder P. E., Blom B. H., Skeidsvoll H., Mykletum A., Prevalence, Classification and Severity of Epilepsy in Children in Western Norway. *Epilepsia*, 2000, **41**(7), 802-810.

Weissberg I., Wood L., Kamintsky L., Vazquez O., Milikovsky D. Z., Alexander A., Oppenheim H., Ardizzone C., Becker A., Frigerio F., Vezzani A., Buckwalter M. S., Huguenard J. R., Friedman A., Kaufer D., Albumin Induces Excitatory Synaptogenesis Through Astrocytic TGF-B/ALK5 Signaling in a Model of Acquired Epilepsy Following Blood-Brain Barrier Dysfunction, *Neurobiology of Disease*, 2015, **78**, 115-125.

Westergaard E., Hertz M. M., Bolwig T. G., Increased Permeability to Horseradish Peroxidase Across Cerebral Vessels, Evoked by Electrically Induced Seizures in the Rat, *Acta Neuropathologica*, 1978, **41**(1), 73-80.

Wong R. K., Bianchi R., Taylor G. W., Merlin L. R., Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Epilepsy, *Advances in Neurology*, 1999, **79**, 685-98.

Wyman A. J., Mayes B. N., Hernandez-Nino J., Rozario N., Beverly S. K., Asimos A. W., The First-Time Seizure Emergency Department Electroencephalogram Study, *Annals of Emergency Medicine*, 2016, **69**(2), 184-191.

Yalçın Ö., Genes and Molecular Mechanisms Involved in the Epileptogenesis of Idiopathic Absence Epilepsies, *Seizure*, 2012, **21**(2), 79-86.

Yano K., Ohoshima S., Shimmizu Y., Moriguchi T., Katayama H., Evaluation of Glycogen Level in Human Lung Carcinoma Tissues by an Infrared Spectroscopic Method, *Cancer Letters*, 1996, **110**(1-2), 29-34.

Yasuda K., Adachi H., Fujiwara Y., Ishii N., Protein Carbonyl accumulation in Aging Dauer Formation-Defective (daf) Mutants of *Caenorhabditis elegans*, *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 1999, **54**(2), B47-B51.

Yehuda S., Rabinovitz S., Carasso R. L., Mostofsky D. I., The Role of Polyunsaturated Fatty Acids in Restoring the Aging Neuronal Membrane, *Neurobiology of Aging*, 2002, **23**(5), 843-853.

Yıldız E. P., Bektaş G., Çalışkan M., Çocukluk Çağı Absans Epilepsi, *Çocuk Dergisi*, 2018, **8**(1), 10-12.

Yis U., Seckin E., Kurul S.H., Kuralay F., Dirik E., Effects of Epilepsy and Valproic Acid on Oxidant Status in Children With Idiopathic Epilepsy, *Epilepsy Research*, 2009, **84**(2), 232-237.

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

Zipursky A., Holmes G. L., Ben-ari Y., The Developing Nervous System : A Series of Review Articles The Neurobiology and Consequences of Epilepsy in the Developing Brain, *Pediatric Research*, 2001, **49**(3), 320-325.





EKLER

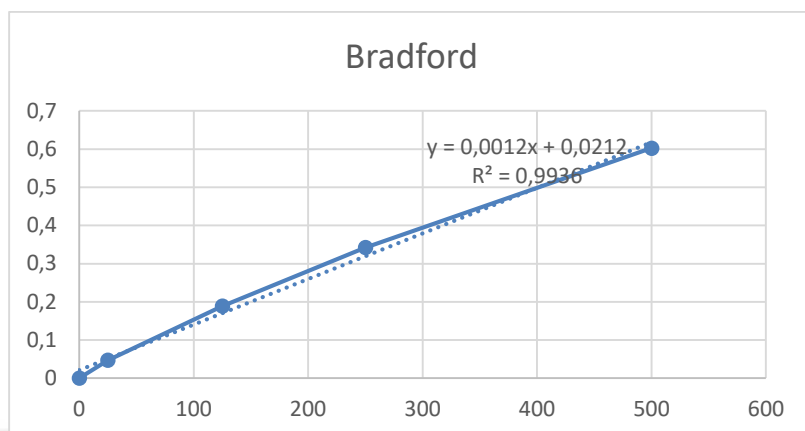
Ek-A

Sıçan beyin örneklerinde 2-6 aylık kontrol Wistar ve epilepsili WAG/Rij gruplarının spektral parametre değerleri. Değerler her örnek için ortalama \pm standart sapma şeklinde belirtilmiştir. İstatistiksel anlamlılık derecesi ($p < 0.05^*$) ve ($p < 0.001^{**}$) şeklinde belirtilmiştir.

	Wistar 2 (n=7)	Wistar 6 (n=7)	WAG/Rij 2 (n=7)	WAG/Rij 6 (n=6)
Frekans				
CH ₂ asimetric	2924.19 \pm 0.44	2924.27 \pm 0.52	2923.99 \pm 1.4	2924.1 \pm 0.67*
CH ₂ simetric	2851.90 \pm 0.26	2851.83 \pm 0.37	2851.85 \pm 0.28	2851.91 \pm 0.51
C=O	1739.33 \pm 0.87	1739.38 \pm 1.32	1739.26 \pm 1.58	1739.27 \pm 1.01
PO ₂ simetric	1072.14 \pm 2.01	1071.55 \pm 2.44	1070.87 \pm 2.65**	1071.1 \pm 2.27*
Bant alanları				
Olefinik	3.40 \pm 0.017	2.65 \pm 0.14	2.05 \pm 0.081**	1.87 \pm 0.007**
CH ₂ asimetric	5.94 \pm 0.26	5.57 \pm 0.54	4.57 \pm 0.54**	3.53 \pm 0.24**
CH ₂ simetric	10,3 \pm 0.42	9,81 \pm 0,28	8,21 \pm 1,47	6,85 \pm 1,64
C=O	3.46 \pm 0.37	3.29 \pm 0.3	2.59 \pm 0.36*	2.94 \pm 0.005*
Amid I	11.48 \pm 0.36	10.96 \pm 0.16	8.45 \pm 1.04*	7.05 \pm 0.85**
Amid II	8.01 \pm 0.05	6.24 \pm 0.09	6.48 \pm 0.59*	4.56 \pm 0.86*
COO ⁻ simetric	3.79 \pm 0.06	2.8 \pm 0.1	2.69 \pm 0.30*	2.18 \pm 0.14*
PO ₂ simetric	6.09 \pm 0.46	4.88 \pm 0.54	4.60 \pm 0.38*	3.79 \pm 0.21*
C ⁺ -N-C	0.93 \pm 0.13	0.6 \pm 0.03	0.43 \pm 0.017*	0.27 \pm 0.01**
Bant alan oranları				
Olefinik/lipit	0.11 \pm 0.014	0.092 \pm 0,0008	0.085 \pm 0.003 *	0.081 \pm 0.006*
C=O/lipit	0.25 \pm 0.014	0.20 \pm 0.009	0.18 \pm 0.011 *	0.17 \pm 0.015*
RNA/protein	0.026 \pm 0.001	0.024 \pm 0.002	0.023 \pm 0.0008*	0.022 \pm 0.002*
Lipit/protein	0.85 \pm 0.098	0.93 \pm 0.079	0.38 \pm 0.032**	1.21 \pm 0.18**
Bant genişliği				
CH ₂ asimetric	22.02 \pm 1.2	23.16 \pm 0.09	22.26 \pm 1.49	22.1 \pm 1.59**
CH ₂ simetric	8,81 \pm 1,01	11,71 \pm 0,11	10,08 \pm 1,28	9,86 \pm 1,48**
Bradford Test				
	34.28 \pm 1.75	33.26 \pm 1.48	27.47 \pm 1.19**	16.58 \pm 2.12**
TBARs Test				
	1.5 \pm 0.23	1.83 \pm 0.15	1.42 \pm 0.06**	2.01 \pm 0.14**

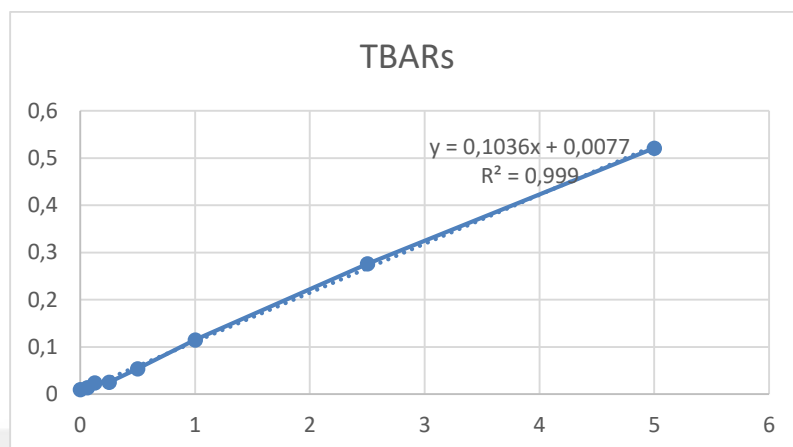
Ek-B

Bradford standart eğri.



Ek-C

TBARs standart eğri



Ek-D

Hayvan deneyleri etik kurul belgesi



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2016/39	ARAŞTIRMANIN ADI	Wistar ve Wag/Rij Sıçanlarda Beyin Dokusundaki Yaşa Bağlı Değişikliklerin FT-IR Spektroskopisi ile Araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Yrd.Doç.Dr.Sevgi Türker Kaya
BAŞVURU BİLGİLERİ	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Doç.Dr.Gül İLBAY,Doktora Öğrencisi Melis Zengin

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	*
-----------------------	-------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararna varılmıştır.	
	KARAR NO: KOU HADYEK 1/1-2017	KARAR TARİHİ: 19.01.2017

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

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

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

Dağcı K., Türker-Kaya S., İlbay G., 6 Aylık Wistar ve WAG/Rij (Absans Epilepsili) Sıçanların Beyin Dokularının FT-IR Spektroskopisi ile Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, *24. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Manisa, Eylül 2018.

Türker-Kaya S., **Dağcı K.**, İlbay G., Investigation of Age Related Effects of Absence Seizures on Brain Tissue: an FT-IR Study, *International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, Münih, Almanya, Nisan 2017.

Dağcı K., Kına A., Türker-Kaya S., Levetricetam Has Potential to Interact with Membrane Lipids, *International Conference On Biological Sciences*, Konya, Ekim 2016.

Kına A., Türker-Kaya S., İlbay G., **Dağcı K.**, Investigation of the chemotherapeutic agents carboplatin and phosphatidylcholine lipid Interaction with Sphingomyelin, *4th National Congress of Pharmaceutical Chemistry*, Kusadasi, Mart 2016.

ÖZGEÇMİŞ

10 Şubat 1995 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2013 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı lisans eğitimini 2017 yılında tamamladı. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde başladığı yüksek lisans eğitimine halen devam etmektedir.

