



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI TEANİN FORMLARININ FARELERDE UYKU, RAHATLAMA
VE GABAERJİK/ SEROTOENERJİK RESEPTÖRLER ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

HAVAKHANUM MAMEDOVA

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

İkinci Tez Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi. Berrak ÇAĞLAYAN

İSTANBUL-2020

TEŞEKKÜR

Bu tezde yapmış olduğum çalışmanın bütün imkanlarını sağlayan, çalışmada elde ettiğim verileri değerlendirip yazabilmeme destek olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a en derin minnettarlığımı sunarım. Bu projede aynı zamanda en az danışmanım kadar katkısı olan Prof. Dr. Kazım Şahin'e teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen, Taha KELEŞTEMUR' a, A. Burak ÇAĞLAYAN' a, M. Çağlar BEKER' e, Berrak ÇAĞLAYAN' a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu tez sürecinde her konuda bana yardımcı olan Zeyneb Nur ŞAHİN' e, Elif SERTEL'e, Zeynep BALÇIKANLI' ya, İrem TAŞKIN' a, Tansu GÖVER' e, Serdar ALTUNAY' a İlayda KAYA' a ve M. Özgen ALTINTAŞ' a çok teşekkür ederim.

Çalışma sürecimde manevi desteklerini esirgemeyen Aysun ÇAĞLAYAN' a, Nilay ATEŞ' e, teşekkür ederim. Her konuda yardımlarını esirgemeyen MEDİTAM ekibi; M. Ekrem ÖZDEMİR' e, Ali ŞENBAHÇE' ye, Caner BAL' a ve Dicle DENİZ' e teşekkür ederim.

Son olarak sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme ve nişanlım Elnur KAMBAROV'a minnettarlığımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Kafeinin Uykusuzluk Üzerine Olan Etkisi	6
4.2. Kahvenin Nörokoruyucu Etkisi	8
4.3. L-teanin Yapısı	9
4.4. L-Teaninin Sağlık Üzerine Etkileri	11
4.5. L-teanin ve Formlarının Çeşitli Hastalıklara Olan Etkisi	14
4.6. Adenozin Kafein Etkisi	16
4.7. GABAA ve GABAB Reseptörleri	17
5. MATERYAL VE METOT	19
5.1. Deney Şeması ve Deney Grupları	19
5.2. EEG Kaydı ve Farmakolojik Ajanların Verilmesi	20
5.2.2. Beyin elektriksel aktivite kaydı	22
5.3. WESTERN BLOT	23
5.3.1. Protein izolasyonu	23
5.3.2. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	23
5.3.3. Western blot	24
5.3.4. Stripleme	25
5.4. Elisa	25
5.4.2 Tahlil prosedürü	26
5.5. İstatistiksel Analiz	27

6. BULGULAR	28
6.1. Beyin Elektriksel Aktivitesi	28
6.2. Protein Analizi	30
6.3. Beyin Hormonal Düzeylerinin Ölçülmesi	34
7. TARTIŞMA.....	35
8. SONUÇ	38
9. KAYNAKLAR.....	39
10. ETİK KURUL ONAYI	56
11. ÖZGEÇMİŞ.....	57



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

BW	Beden ağırlığı
ABD	Amerika Birleşik devletleri
ICSD-2	Yeni uyku bozukluğu sınıflandırılması
DSM-4	Mental bozukluk tanısı
BDZ	Benzodiazpein
GABA	Gama-Aminobütrik asit
EEG	Elektroensefalografi
REM	Hızlı göz hareketi
ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
NMDA	N-Metil D-Aspartik Asit
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
AST	Aspartat aminotransferaz
GSH	Glutation
CTGF	Bağ dokusu büyüme faktörü
IL	İnterlökin
NF-kB	Nükleer Kappa B Faktör
HIP	Hipokamüs
5-HT	Seratonin
DA	Dopamin
AP-5	Amino-5-fosfonovalerik asit

cAMP	Siklik adenosin monofosfat
HIAA	Hidroksil indol asetikasit
MRS	Manyetik rezonans spektroskopisi
MDB	Major depresif bozukluk
GHB	GAMA hidroksibutiratin



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.3.1 L-Teaninin Kimyasal Yapısı .	10
Şekil 4.4.1 L-Teaninin Sağlık Üzerine Etkileri.	11
Şekil 5.2.1. Beyin hemisferindeki elektrod alanları.	21
Şekil 6.1.1. Kontrol grubu ile deney gruplarının zamana bağlı olarak Elektroensefalografi (EEG) beyin elektriksel aktivitesinin frekans gösterimi.	28
Şekil 6.1.2. Kontrol grubu ile deney gruplarının zamana bağlı olarak Elektroensefalografi (EEG) beyin elektriksel aktivitesinin amplitüd gösterimi. ...	29
Şekil 6.2.2. GABA _B -R1 protein seviyesinin kontrole göre yüzdesi.	31
Şekil 6.2.3. GABAB-R2 protein seviyesinin kontrole göre yüzdesi.	32
Şekil 6.2.4. 5-HT1A protein seviyesinin kontrole göre yüzdesi.	33

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1.2 Deney grupları.....	20
Tablo 5.4.1 Deneyde kullanılan reaktif çeşitleri ve miktarları	25
Tablo 6.3.1. Farklı teanın formlarının farelerin beyininde serotonin, dopamin ve melatonin düzeylerine etkisi	34



RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.2.3. Beyin elektriksel aktivite kaydı için elektrotların yerleştirilmesi.	22
---	----



1. ÖZET

FARKLI TEANİN FORMLARININ FARELERDE UYKU, RAHATLAMA VE GABAERJİK/ SEROTONERJİK RESEPTÖRLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Uyku, hafızanın konsolidasyonu ve hatırlamada beyin fonksiyonlarının uygun şekilde çalışmasına yardımcı olmaktadır ve uyku bozuklukları günlük hayatı önemli ölçüde etkilemektedir. Uykunun önemi halk arasında çok iyi bilinmesine rağmen uyku rahatsızlıkları yaşayan birçok insan hipnotik ilaçları kullanmaktan kaçınmaktadır. Son yıllarda, işlenmemiş bitki içerikli doğal ilaçlar farmakolojilere nispeten yan etkilerindeki hafiflik sebebi ile kabul gören yeni bir yaklaşımdır. Farmakolojik olarak bir amino asit çeşidi olan L-teaninin; sakinlik hissini arttırma, uyanıklığı azaltma ve stres önleyici olma gibi etkilere sahiptir. Ayrıca uyku süresini arttırmak için merkezi GABAerjik nörotransmisyonu düzenlediği belirlenmiştir. Bu çalışmada, uykusuzluk tedavisi için düşünülen L-teanin ve farklı formlarının etkisini beyin elektriksel dalgaları ve inhibitör nörotransmitterleri üzerinden gözlemlemek için kafeinle uyarılmış Balb/c fare modeli oluşturuldu. L-teanin ve farklı formlarının farelere intraperitonel olarak 0,78mg/kg'dan daha yüksek bir dozda verildiğinde kafeinin uyarıcı etkisini inhibe ettiği 120 dakika elektroensefalografi (EEG) kaydı ile gözlemlendi. Çalışmada EEG başlatıldıktan sonraki 15. dakikada kafein 30. dakikada teanin ve farklı formları verilerek kontrol grubu ile kıyaslama yapıldı. Moleküler mekanizmalardaki etkilerini araştırmak için GABA_A -R2, GABA_B -R1, GABA_B -R2, 5-HT_{1A} protein düzeylerine; hormonal mekanizmasındaki etkileri için ise dokulardaki serotonin, dopamin ve melatonin seviyeleri ölçüldü. Sonuç olarak, teanin formlarının kafeinin uyarıcı etkisini tersine çevirdiği frekans değerlerinde artışa ve genlik değerlerinde ise düşüşe neden olduğu EEG kaydı ile tespit edildi. İlgili protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. Hormonal düzeyde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında azalma belirlendi. Uygulanan teanin formlarının GABAerjik nörotransmisyonuna etki ederek kafeine özel bir inhibe edici etkisi olduğu ve genel alınınının rahatlama hissine ve beyin elektriksel aktivitesinde rahatlamaya neden olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kafein; L-teanin; Elektroensefalografi (EEG); GABA reseptörü.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT THEANINE FORMS ON SLEEP, RELAXATION AND GABAERGIC/SEROTONERGIC RECEPTORS IN MICE

Sleeping assists the brain to function properly regarding to the consolidation of memory and remembrance, and sleep disorders necessarily affect the daily life. Although the importance of the sleep is well-known colloquially, people who have sleep disorder do avoid consuming hypnotic medicines. Nowadays, natural medicines containing virgin herb in comparison to pharmaceuticals is new approach that is more accepted due to lightness in their side effects. Pharmacologically, L-theanine, a type of amino acid is known to have potential effects for increasing the calmness, decreasing wakefulness and preventing stress. Besides, it is identified to regulate the central GABAergic neurotransmission in order to increase sleep duration. In this study, caffeine-stimulated Balb/c mouse model is used to observe the possible effect of L-theanine and its other forms on the treatment of insomnia through the brain electric waves and inhibitor neurotransmissions. It is observed with 120 minutes recording of electroencephalography (EEG) that when L-theanine and its other forms are given to mice intraperitoneally in a higher dosage than 0.78mg/kg, it inhibits the stimulation effect of caffeine. In this study, the comparison is carried out with the control group by giving the caffeine the fifteenth minute and theanine and its other forms the thirtieth minute. In order to study the influence on the molecular mechanisms, GABA_A-R2, GABA_B-R1, GABA_B-R2, 5-HT1A protein levels and for the effects on hormonal mechanisms, serotonin, dopamine and melatonin levels of tissues are measured. As a result, the forms of theanine are determined by EEG record to cause reversing the stimulation effect of caffeine, increase in frequency values and decrease in amplitude values. Statistically significant increase observed in protein levels. However, a decrease is determined in hormonal level compared to control groups. It is thought that the applied theanine forms have inhibitive effect on specially to caffeine by affecting GABAergic neurotransmission and its normal uptake causes to the relaxation feeling and relief in the brain electric activity.

Key words: Caffeine, L-theanine, Electroencephalography (EEG), GABA receptor

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Düzensiz uyku döngüsünün oluşturduğu uyku bozukluğuna “insomniya” adı verilmektedir. İnsomniya, uykuya başlama veya uykuyu sürdürme zorluğu olarak tanımlanmaktadır. Uyku bozukluğu; sinirlilik, ruhsal değişim, baş ağrısı, migren, öğrenme güçlüğü gibi önemli fonksiyonel sorunlara ve buna bağlı rahatsızlıklara yol açmaktadır. Uyku bozuklukları günlük hayatı önemli ölçüde etkilemektedir ve yaşam kalitesini düşürmektedir (1). Uykunun miktarı ve kalitesi, fiziksel sağlık ve güvenli yaşamı yakından ilgilendirmektedir. Uyku, bilgiyi öğrenmede ve hatırlamada beyin fonksiyonlarının uygun şekilde çalışmasına yardımcı olmaktadır (2). Aynı zamanda hormonal dengeyi koruyarak normal büyüme ve gelişmeyi desteklemektedir (3). Yapılan çalışmalara göre, uyku yetersizliği gündüzleri genellikle uykulu hissetme, motivasyon ve enerji eksikliği, konsantrasyon eksikliği, hafıza zorluğu, duygu-durum bozukluğu, baş ağrısı ve mide-bağırsak sorunları gibi fiziksel problemlere neden olmaktadır (2). Uykusuzluk dünya çapında artan bir sağlık sorunudur. Genel popülasyonun yaklaşık %30'unun yaşamları boyunca uykusuzluk semptomları yaşadığı bilinmektedir (4). 2011 yılında yayınlanan bir raporda yetişkin bireylerin yaklaşık %12–20'sinin uykusuzluk problemi yaşadığı belirtilmiştir. ABD'de yaşayan bireylerin %15'inden fazlası kronik uyku problemi yaşamakta ve bu durum hastaların %50'sinin gündüz rutinlerini ciddi şekilde etkilemektedir (3).

Psikofizyolojik insomniyanın en temel özelliği, uyarılmışlık durumunda artış ve uykuyu engelleyen öğrenilmiş düşünceler ile karakterize olmasıdır. Bu özellikler, kronik insomniya hastalarının büyük bir kısmında bulunmaktadır. Hastalar genellikle anksiyöz ve gergin ruh haline sahiptir. Hastaların bu özellikleri göstermesinden dolayı insomniya; “Öğrenilmiş ve koşullandırılmış insomniya” veya “Primer insomniya” gibi adlar ile de anılmaktadır.

Hastalığın diğer isimlendirmeleri ise; işlevsel olarak otonom insomni, kronik insomni, kronik somatize gerginlik, psikopatoloji olmadan içsel uyarılmışlık şeklindedir. Uluslararası Uyku Bozuklukları Sınıflandırmasında (ICSD-2) yer alan psikofizyolojik insomni, DSM-IV’K de tanımlanan birincil insomni olarak değerlendirilmektedir. Uyku bozukluğu yaşayan hastaların büyük bir kısmı kronik

insomniya hastalığına sahiptir. Başlangıçta akut stres bozukluğu ile ortaya çıkan insomniya, çoğu birey için geçici bir durum iken, bu hastalarda oluşan uyuyamama ile ilgili gerginlik ve kaygı giderek kısır bir döngüye dönüşerek sorunun devam etmesine neden olmaktadır (5).



4. GENEL BİLGİLER

Uzun süreli uyku eksikliği, kalp hastalığı, yüksek tansiyon, felç ve obezite gibi çeşitli sağlık problemleriyle ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, uykusuzluk iş kazalarına da neden olmaktadır. İyi bir gece uykusunun önemi çok iyi bilinmesine rağmen, uyku rahatsızlıklarından mağdur birçok insan semptomatik rahatlama tercih ederken, hipnotik ilaçları (ör: Benzodiazepin) kullanmaktan kaçınmaktadır (6).

Uykusuzluk tedavisi iki ana kategoride sınıflandırılabilir. Bunlar; farmakolojik olan ve farmakolojik olmayan tedavilerdir. Bir farmakolojik tedavi örneği olan *benzodiazepin* (BDZ) türevi ilaçlar, uykuyu tetikleyen ve en yaygın kullanılan sedatif hipnotiklerdendir (7). Bununla birlikte, böyle bir ilacın sürekli kullanımı, kişide performans düşüklüğüne, hafıza gerilemesine, ilaca dirençliliğine ve buna bağlı olarak bağımlılık gibi olumsuz yan etkilere neden olmaktadır (8).

Son zamanlarda, bitkisel (doğal ilaçlar denilmektedir) farmakolojik olmayan tedaviler incelenmiş ve bu bitkisel tedavi yöntemleri farmakolojik tedavilere nazaran hafif yan etkileri olan yeni bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir. Bu bitkisel ilaçların ayrıca, uykuyu arttırmak için merkezi GABAerjik nörotransmisyonu da düzenlediği tespit edilmiştir (9).

L-Teanin olarak da bilinen *Glutamil-etilamin* ve *gamma-aminobutyric acid* (GABA), uyku bozukluklarını iyileştirmek için bilinen ajanlardandır (10). GABA amino asit yapılıdır ve memeli beyrinde temel inhibitör olarak bilinen bir nörotransmitterdir. Bu nedenle GABA_A (GABA type) reseptörleri, doğal anksiyolitik bileşikler veya sakinleştiriciler için birincil hedef olmuştur (11,12). GABA aracılı inhibitör nörotransmisyonun, çeşitli hastalıklar ve kafein alımına bağlı uyku bozuklukları için yararlı olduğuna dair bilinen birçok bilgi bulunmaktadır (13). Teaninin konvülsif ve kafein uygulamasının neden olduğu aktivite üzerinde inhibe edici etkileri belirlenmiştir (14). Yapılan çalışmalar sonucunda teaninin, kafeine spesifik bir inhibe edici etkisi olduğu ve genel alınımının rahatlama hissine neden olduğu belirlenmiştir (15).

4.1. Kafeinin Uykusuzluk Üzerine Olan Etkisi

Kafein, en yaygın kullanılan uyarıcılardan biridir ve toplum arasında çay ve kahvede bulunduğu bilinmektedir (16,17). Bu sebeple kafein en çok tüketilen psikoaktif maddedir. Kafein çay ve kahve haricinde kola, çikolata, enerji içeceği gibi yiyecek ve içeceklerde de bulunmakta ve genel itibari ile uyku halini azaltmak için de kullanılmaktadır. Kafeinin, uyku gecikmesi, toplam uyku süresinde azalma, uyku verimliliğini düşürme ve algılanan uyku kalitesini kötüleştirmek gibi etkileri olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada kafein alımından belli bir süre sonra alınan Elektroensefalografik (EEG) kaydı sonucunda beyin elektriksel aktivitesinde uyanıklık ve uyarılmanın arttırdığı tespit edilmiştir (18). Kafein alımında doz-zamanlama-tepki ilişkileri kurulmuş ve yaşlı bireylerin, genç ve yetişkinlere kıyasla kafeine karşı daha duyarlı olduğu görülmüştür. Genç insanlar arasında da belirgin bireysel farklılıklar gözlemlenmiştir ve genetik çalışmalar sonucunda bu farklılıkların nedeni; adenosin nörotransmisyonunda yer alan genlerin fonksiyonel polimorfizmleri olarak belirlenmiştir. Bu farklılık ise kafein tarafından uyku bozukluğuna sebep olan metabolizmaya etki etmektedir (18). Kafeinin beyindeki adenosin A_1 ve A_{2A} reseptörlerini antagonize ederek uyanıklığı arttırdığı bilinmektedir (19). İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarla uyku ve uyarılma düzeninde adenosinin rolü belirlenmiştir (20). Kafeinin biyolojik etkilerinin çoğu, tüketim sırasında ulaşılan seviyelerde, adenosin reseptörlerini, özellikle A_1 ve A_{2A} reseptörlerini ve daha az derecede A_{2B} ve A_3 reseptörlerini antagonize etmesinden kaynaklanmaktadır. A_1 ve A_{2A} adenosin reseptörleri, beyin hipokampus ve korteks bölgelerinde bulunan, uyku, uyarılma ve bilişel fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan çeşitli mekanizmalara etki etmektedir. Bu nedenle, bir adenosin alıcı antagonisti olarak kafeinin fizyolojik ve zihinsel durumları modüle edebilmesi olağan görülmektedir. Bu, kafeinin gerçekten uyanıklıkla ilişkili uyku eğilimi oluşumunu hafiflettiğini gösteren bulgular ile desteklenmiş, sıçanlarda kafeinin hızlı olmayan göz hareketi ve uyku sürekliliğini bloke ettiği görülmüştür (19). Dahası, uyku ve uyanıklık sırasında REM dışı uyku homeostazının EEG belirteçlerini güçlü bir şekilde hafifletmekte olduğu belirlenmiştir. Adenosin sistemini kafein tüketimi ile tetiklemek, uyku eksikliğine, bilişsel performans ve uyku üzerindeki zararlı değişimlere karşı etkin bir araçtır (20)

Çoğunlukla kahve ve çay ile birlikte oral olarak alınan kafeinin % 99'u bağırsak sisteminde emilir ve kan dolaşımına katılır. Bu oran tüketimden 30-60 dakika sonra en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Kafein, tüm vücuda yayılarak kan-beyin ve plasenta bariyeri dahil olmak üzere tüm biyolojik membranlardan geçebilmektedir (21).

Kafeinin insandaki etkisini net bir şekilde belirleyebilmek için bireysel farklılıkların göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Metabolik hız ve kafeinin etkileri bireyler arasında önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Kafeinin yarı ömrü, endojen ve eksojen faktörlere bağlı olarak ortalama 2 ile 10 saat arasında değişmektedir. Örneğin, nikotin kullanıcılarında kafeinin metabolik hızı %30-50 oranında artarken, hamile kadınlarda ve oral kontraseptif kullananlarda bu oran azalma gözlenmektedir (22). Ayrıca, adenosin A_{2A} reseptör genindeki genetik çeşitlilikler, adenosin ve adenosin reseptörlerinin REM dışı uyku homeostazında oynadıkları rol ve uykudaki genotip bağımlı farklılıklar nedeniyle kafeine duyarlılıkta bireyler arası büyük farklılıklar göstermektedir (23). Bununla birlikte, erkekler ve kadınlar arasında kafein metabolizmasında sistematik bir farklılık gözlenmemektedir.

İyi bir uyku kalitesi yakalamak için gereken şey, vücudu / zihni uyaran ve uyku alışkanlıklarını engelleyen maddelerden uzak durmaktır. Özellikle, biyolojik saatin gündüz vakti sinyali gibi güçlü bir uyanma sinyali göndermesi, uyku kalitesinde zararlı etkilere neden olan bir uyarı şeklidir. Başka bir deyişle, yüksek zihinsel uyanıklık ve fiziksel aktivasyonun uyku kalitesini engellediği zamanlarda kafeini kullanmak, uyumada yaşanan çeşitli sorunların başlıca nedenidir. (24).

İnsomniya teşhisi konulmuş kişilerin 3 mg/kg ve üzeri kafein alımı sonrası uykusuzluk tepkisi sağlıklı bireylerden daha yüksektir. Yapılan bir çalışmada kafeinin 25 saatlik uyku eksikliği sonrasında gündüz iyileşme üzerine etkileri incelenmiştir (25). Genç 20-30 yaş ve orta 45-60 yaş arası gönüllüler, 1 ay arayla 200 mg kafein ve plasebo gruplarına katılmışlardır. Gündüz toparlanma uykusundan üç saat önce, katılımcılar ilk 100 mg kafein veya plasebo kapsülü alırken, ikinci grup 100 mg doz 1 saat öncesinde almıştır. Kafeinin, her iki yaş grubunda da gündüz uykusu üzerindeki etkisi, uyku süresi, yavaş dalga uykusu ve REM uykusundaki düşüşe bağlı olarak gözlemlenmiştir. Dahası, kafein gündüz uykusu sırasında REM dışı EEG

senkronizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, gece çalışması ve jetlag ile başa çıkmak için kafeinin kullanılmasının, sonraki uykuda zararlı etkilere neden olabileceğine dair ilave kanıtlar sunulmuştur (26). Kafein kullanımının uyku düzeni üzerindeki etkileri farmakolojik etkiler ile de ilişkilendirilmiştir. Kafeinin baskın etkisinin spesifik adenozerjik reseptörleri bloke etmek olduğu yaygın olarak kabul edilmekle birlikte, diğer mekanizmalar, aday antifatigat maddelerinin zihinsel yorgunluk üzerine de rol oynadığı bilmektedir (27). Dikkat ve uyanıklığı arttırmak için kullanılan kafein, dallı zincirli amino asitleri etkileyerek uykuyu etkileyebilmektedir. Dallenmiş zincirli amino asitler, proteinlerin sentezi için kullanılır ve zihinsel yorgunluğun bir biyolojik işareti olarak kabul edilmektedir. Sekiz gün boyunca günde iki kez rastgele 100 mg kafein veya plasebo alan 17 sağlıklı katılımcıda bu amino asitlerin seviyelerini incelenmiştir. Yorgunluk, zihinsel performans *Uchida-Kraepelin* psiko-tanı testi ve gelişmiş iz yapma testi ile incelenmiştir (28). Kafein grubunun görev performansının plasebo grubunda gözlenen performanstan daha iyi olduğu belirlenmiştir. Ancak, subjektif yorgunluk algısı, motivasyon ve uyku durumu her iki grup arasında farklılık göstermemektedir. Bu sonuçlar, kafein uygulamasının yorgunluk hissini azaltmada performans geliştirdiğini öne sürmüştür (29). Bu çalışmanın önemli bir gözlemi, kafein grubundaki plazmasında bulunan dallı zincirli amino asit seviyelerinin, yorgunluğa neden olan zihinsel görevlerden sonra ve iyileşme döneminden sonra plasebo grubunda gözlenenden düşük olmasıdır. Bu sonuçlar, kafeinin, beyni aktive ederek, yorgunluğa hemen etki yaptığını göstermektedir (30).

4.2. Kahvenin Nörokoruyucu Etkisi

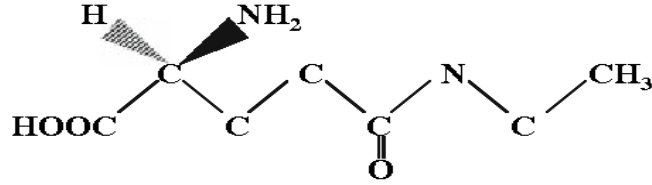
ATP ve ADP olarak bilinen nükleotitler, ektonükleotidazlar tarafından katalize edilen hidrolizle etkisiz hale getirilen beyin dahil olmak üzere hemen hemen bütün dokularda bulunan hücre dışı sinyal maddeleridir. Bu nükleotid *tri* ve *di* fosfatları hidrolize etmektedir (31). Adenozinin nöral hücrelerdeki etkileri, temel olarak ya inhibe edici A₁ reseptörleri veya uyarıcı A_{2A} reseptörleri üzerindeki etkisi ile çalışmaktadır. A₁ reseptörleri beyinde daha fazla miktarda bulunur ve aktivasyonları glutamat salınımını inhibe etmektedir. Gerilime duyarlı kalsiyum kanallarında ve

NMDA reseptörlerinde ve potasyum akımlarında, kalsiyum akışında azalmaya, membran hiperpolarizasyonuna sebep olmaktadır (32). A_{2A} reseptörleri aktivasyonu, glutamat gibi farklı nörotransmitterlerin salınımını indüklemektedir. Bu gibi reseptörlerin kafein tarafından bloke edilmesi, kemirgenlerde farklı nörodejeneratif hayvan modellerinde güçlü bir nöroprotektif etkiye neden olmaktadır (33,34). Adenozin ektonükleotidaz yolu ile oluşturulduğu A_{2A} reseptörlerinin tercih edilen aktivasyonuna işaret eden kanıtlar bulunmaktadır (35). Kafein esasen A₁ reseptörlerinden ziyade A_{2A} reseptörlerinin blokajı sonucu nöroprotektif etkiyi indüklemektedir (36). Bu nedenle, uzun süreli kafein tedavisi, yaşlanma sırasında A_{2A} reseptörleri ile ilişkili beyin hasarına etki etmektedir. Kafeinin insan beyinde yaşa bağlı bir biyolojik süreçte Parkinson gibi nörodejeneratif hastalık riskini önemli ölçüde düşürmektedir (37,38). Kemirgenlerde kafein alımı, nörodejeneratif hastalıkların oluşumunu, yaşlanmaya bağlı hafıza kaybını önleyebilmektedir (39). Şimdiye kadar, kemirgenlerde uzun süreli kafein tüketimi üzerine yapılan çalışmalarda, beyin hasarından sonra hücre hasar mekanizmalarının geri döndürülmesine veya önlenmesine odaklanılmıştır. Bununla birlikte, yaşlanma sırasında hücre ölümü üzerindeki etkisi de araştırılmaktadır (40).

4.3. L-teanin Yapısı

Protein yapısına dahil olmayan bir amino asit olan L-teanin ilk kez 1949 yılında yeşil çay yapraklarından izole edilmiştir ve besin takviyesi olarak kullanılmaya başlanmıştır (41,42). L-teanin *Camellia sinensis* türü çay yapraklarında bulunmaktadır ve kuru ağırlığının %1-2'sini, toplam serbest amino asitlerin ise yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (43). Teanin miktarlarının oolong, beyaz, yeşil ve siyah çayda sırasıyla 6,09, 6,26, 6,56 ve 5,13 mg/g olarak bulunduğu belirtilmiştir (44,45). Demleme süresinin artması ile bir kupa 200 ml çayda yaklaşık 25 mg teanin bulunduğu bildirilmiştir (42). Çaydaki teanin miktarı güneşten etkilenmektedir. Az güneş olan iklimlerde teanin konsantrasyonları daha yüksek olmaktadır. Teaninin kimyasal formülü C₇H₁₄N₂O₃, molekül ağırlığı ise 174,2 g/mol'dur. Doğada bilinen diğer amino asitlerde olduğu gibi, teanin kiral özelliktedir ve L ve D olmak üzere iki enantiomeri bulunmaktadır. D-teanin toplam teaninin %1,85'i kadardır (46). Mikroskopik

incelemeler sonucu L-teanin maddesinin kristal yapıda ve renksiz olduğu görülmüştür (47). Teanin maddesi kloroform, metanol ve etanolda çözülmesinin yanı sıra sulu ortamlarda da yüksek çözünürlüğe sahip olmaktadır (48).



Şekil 4.3.1 L-Teaninin Kimyasal Yapısı (48).

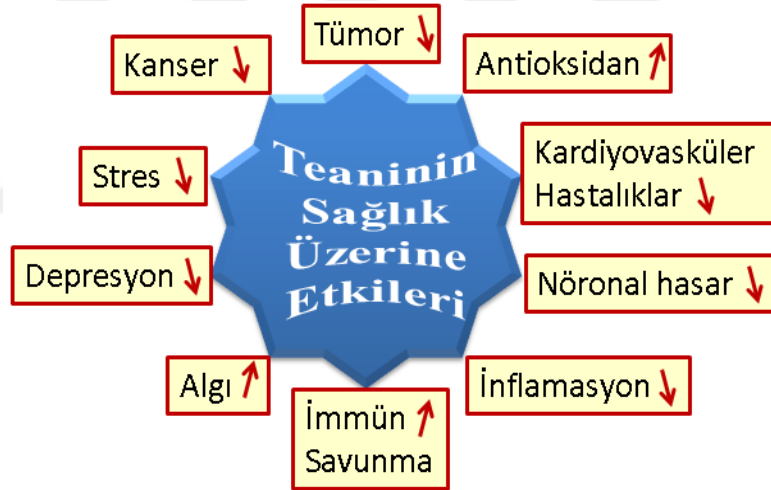
L-teanin γ -etilamino-L-glutamik asit, γ - glutamiletilamid, 2-amino-4 bütirik asit olarak da isimlendirilmektedir (49). Nörotransmitter olan glutamat ve γ - aminobütirik asit teanin ile yapısal olarak benzerlik göstermektedir. L- teanin glutamatın karboksilik ucunun başka bir amin grubu ile ve peşi sıra gelen etil grubunun modifiye edilmesi sonucu oluşmaktadır (50). Teanin amino asidi çayın tadına önemli katkıda bulunmaktadır. Teanin etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, teaninin T1R1+T1R3 reseptör hücreleri üzerinde etkili olduğu ve onların ekspresyonunu aktive ettiği gözlemlenmiştir (51). Teanin ekstraksiyonu endüstriyel ve kimyasal sentez şeklinde elde edilmektedir (52). Özellikle çay bitkisinin köklerinde L-teanin sentezi yüksek olmaktadır; çünkü teanin sentetaz (TS1 ve TS2) gen transkripsiyonları bitkinin diğer kısımlarıyla kıyas yapıldığında kotiledonlarda daha az bulunmaktadır (53).

L-teanin çay bitkilerinde etilaminden ve L-glutamik asitten L-teanin sentetaz enzimi tarafından sentezlenmektedir. Etilamin L-alanin dekarboksilaz enzimi ve L-alaninden oluşmaktadır (54). Teanin sentezlendikten sonra ksilem yoluyla sürgünlere yerleşir, orada ya konsantre olur ya da teanin hidrolaz ile glutamik asit ve etilamine ayrılır (55). Aynı zamanda magnezyumun varlığı, teanin senetizi için büyük önem taşımaktadır (56).

4.4. L-Teaninin Sağlık Üzerine Etkileri

Teaninin glutamin ve glutamat ile yapı olarak benzerlik taşısa da metabolik olarak farklılık göstermektedir. Yapılan bir çalışmada teanin içeren kapsüllerin etkisi ile yeşil çay alımından bir süre sonra kanda glutamat seviyesinde yükselme gözlemlenmiştir (57). Bir diğer çalışmada ise, glutamin verilen hipertansif sıçan grubunda herhangi bir değişim olmadığı halde, teanin verilen grupta hipotansif etki görülmüştür. Bu durum teaninin glutaminden farklı etkilere neden olduğunu göstermiştir (58).

L-teaninin antitümör, rahatlatıcı, antiinflamatuvar, kafeinin olumsuz etkilerini azaltıcı, öğrenme kabiliyetini geliştirici, vasküler hastalıklara karşı koruyucu gibi bir çok biyoaktif etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (59).



Şekil 4.4.1 L-Teaninin Sağlık Üzerine Etkileri (49).

L-teanin kan-beyin bariyerini kolayca geçen maddelerden biri sayılmakta ve bu yüzden de beyin fonksiyonlarında çeşitli düzenleyici rolleri olduğu söylenmektedir (60). Yapılan bir çalışmada 50 mg teanin dozunun, α frekans değerini önemli ölçüde arttırarak zihni rahatlattığı görülmüştür (61). L-teanin aynı zamanda beyinde L-glutamik asidin bağlandığı glutamat reseptörlerinin inhibe ederek kortikal nöron aktivitesini engellemekte ve buna bağlı olarak da stresi azalttığı düşünülmektedir (58).

L-teaninin beyinde melatonin düzeyini, GABA düzeyini ve dopamini arttırdığı hayvan nörokimyası araştırmaları sonucunda belirlenmiştir. Aynı zamanda 2-amino-3-hidroksi-5metil-izoksazol-propionik asit ve N-metil D-aspartat reseptörleri için mikromolar düzeyde afinite gösterdiği bildirilmektedir (62). Teaninin günlük 200mg/kg alımı sıçanlarda nöropatolojik değişiklikler olan nöronal ve hafıza fonksiyon kaybını engelleyerek koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. (63). Bunun dışında N-metil -D-aspartat reseptörüne rekabetli, hipokampusde beyin türevli nörotrofik faktörünü (BDNF) uyardığı ve böylece antidepresan etkiye neden olduğu görülmüştür (64).

Kafein ve L-teanin birlikte alındığı zaman bilişsel performansın gelişimi, kelime tanıma, görsel bilgi işleme ve dikkat eksikliğinde azalma gibi faydalı etkileri olduğu bildirilmektedir (65). Aynı zamanda teaninin uyku üzerinde büyük ölçüde etkiye neden olduğu söylenmektedir. Yapılan bir klinik çalışmada 400 mg teaninin 6 hafta süresince verildiğinde güvenli olduğu ve daha yüksek uyku performansı sağladığı tespit edilmiştir (66).

Bunun yanı sıra L-teaninin devamlı tüketiminin kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı ve vasküler fonksiyonda iyileşmeye sebep olduğu görülmüştür. Sağlık alanında L-teaninin koruyucu etki olarak nitrik oksit üretimini azalttığı, serum kolesterolü düzenlediği ileri sürülmüştür. Teaninin serum kolesterol düzeyini azaltarak koroner kalp hastalığı riskini azaltabileceği söylenmiştir (67). Kan basıncı ile ilgili yapılan çalışmada ise, 250 mg kafein ile birlikte 200 mg teanin alımı sonrasında, teaninin stresi ve kan basıncını azalttığı, kafeinin etkilerini ise inhibe ettiği görülmüştür (68).

Yapılan bir başka çalışmada L-teaninin antioksidan etkisi olduğu belirlenmiştir (69). L-teaninin ve kafeinin düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonu üzerine etkilerine bakılmış ve L-teaninin yeşil çayda bulunan polifenolden daha az ama kafeinden daha çok antioksidan etkisi tespit edilmiştir (69).

Yedi gün boyunca günde bir kez oral yolla verilen karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan farelere teanın verildiğinde, karaciğer hasarının göstergesi olan aspartat aminotranferaz (AST) azalttığı görülmüştür(70).

L-teaninin farede hepatosit hücre apoptozunu inhibe ettiği ve AST'nin etanol ile indüklenen artışını hafiflettiği belirtilmektedir (71). Aynı zamanda bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) kapasitesini de azaltmaktadır (72).

Teanin IL-10 sitokinlerin düzeyini arttırmakta ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe etmektedir. Ayrıca anti nekrotik ve anti inflamatuvar özelliklerini, oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne yol açan NFkB yolağını da inaktive ederek göstermektedir (72). Teanin sitokinlerin salınımını düzenlemekle birlikte mevalonat yollarında görev yapan Ras-ilişkili olan protein ve hidroksimetil glutaril koenzim-A redüktaz ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Mevalonat yolağı hücrenin farklılaşması, büyümesi ve proliferasyonunda görev yapmaktadır. Tümör nekroz faktörü, interferon- γ ve interlökinlerin ekspresyonlarını inaktive etmektedir (73). Teaninin aynı zamanda anti kanserojen etkilerinin olduğu da söylenmektedir. Yapılan tetrazolyum mikro kültürü çalışmasında insan kanser hücresi ile sağlıklı kontrol hücresi indüklenme yeteneği kıyaslanmış ve karaciğer, meme, prostat ve kolon gibi kanser hücre hattında hücre ölümünü indüklediği görülmüştür (74).

Teanin aynı zamanda kanser hücrelerinde anti tümör etki göstermektedir. Bununla beraber glutamat taşınımını inhibe ederek hücre içi GSH düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (75). Yapılan bir çalışmada teaninin farelerde M5076 yumurtalık kanser hücre hattında adriamisin konsantrasyonunu arttırdığı ve tümör gelişimini engellediği ortaya koyulmuştur (76).

Teanin immün sistemin güçlenmesinde görevli olan etilaminin elemanlarından gama-delta T-hücrelerini aktive ettiği de belirtilmiştir (77). Elde edilen sonuçlara göre (200 mg/kg) L-sistin ve (80 mg/kg) L-teanin beraber verilmesi antijene spesifik immünoglobulin-G üretimini, T-yardımcı hücresi aracılı cevaplarını ve GSH düzeyini arttırdığı görülmüştür (78). Aşılamadan önce L-sistin ve L-teaninin birlikte

uygulanmasının, düşük hemoglobin konsantrasyonuna sahip yaşlı insanlarda IgG ve IgM antikorlarının güçlendirilmesi yoluyla bağışıklık sisteminin etkisini arttırmaktadır (79). Yapılan bir çalışmada sıçanlara teanin maddesi verilmiş ve sonrasında beyindeki serum kortikosteron seviyesinin azaldığı, beyindeki dopamin ve 5-hidroksitriptamin düzeyinin düştüğü görülmüştür. Sıçanlarda teanin Th2/Th1 sitokin dengesinin değiştirerek bunlarla ilişkili sıçanların bağışıklığında gelişme gösterdiği tespit edilmiştir (80). L-teaninin aynı zamanda beyindeki dopamin, melatonin ve serotonin hormon seviyeleri üzerine etki ettiği ileri sürülmektedir (81).

Yapılan bir çalışmada yeşil çay bileşenlerinin anti obeziteye olan etkisi araştırılmış, kafein ve L-teanin farelerde kilo artışına neden olduğu gösterilmiştir (82).

4.5. L-teanin ve Formlarının Çeşitli Hastalıklara Olan Etkisi

Yeşil çay bitkilerinde en çok bulunan serbest amino asit olan L-teanin, kan-beyin bariyerini geçebilmekte ve memelilerde 30 ile 120 dakika arasında en yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir (83,84). Birçok araştırma grubu L-teaninin anksiyete, panik, depresyon ve obsesif-kompulsif bozukluk gibi psikiyatrik sorunlara karşı nöroprotektif etkilere neden olduğunu görülmüştür (85). İnsan üzerinde yapılan çalışmalarda, L-teanin maddesinin akut stres problemini azalttığı gözlemlenmiştir (86). L-teanin uygulamasının, hipokampüste (HIP) beyin kaynaklı nörotropik faktör ekspresyonunu arttırdığı ve 5-HT, DA ve aminobutirik asit gibi beyin nöro-transmitterlerinin aktivitesini modüle ettiği görülmüştür (87,88).

L-teaninin sıçanların striatumuna doğrudan enjeksiyonundan sonra striatal dopamin salınımında doza bağlı bir artış gözlemlenmiştir. Dopamin üzerindeki L-teaninin NMDA reseptörü antagonisti AP-5 tarafından inhibe edildiği görülmüştür. Aynı zamanda noradrenalin konsantrasyonlarının, beyindeki dopamin nöronları üzerinde geçici etkilere işaret eden L-teanin uygulamasından etkilenmediği bulunmuştur. Bununla birlikte, sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada, L-teaninin, noradrenalinle uyarılmış adenozin 3,5-mono-fosfat (cAMP) oluşumunu inhibe ettiği de bilinmektedir (89). Bununla birlikte, aynı çalışmada ikinci haberci yollar üzerinde genel bir etki oluşturduğu da söylenmiştir (90). Teaninin triptofanı arttırdığı

fakat beyindeki hem serotonin hem de serotonin metaboliti olan 5-hidroksi indol asetik asit (5-HIAA) düzeyini değiştirdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, spesifik beyin b6lgelerinde yapılan bir çalışmada, intra-gastrik L-teaninin striatum, hipokampus ve hipotalamusta serotonin düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığı g6r6lm6řt6r (91).

L-teanin (N-etil-L-glutamin) amino asidi tarihte rahatlatıcı bir madde olarak tanınmıştır (91,92). 6nceki alışmalar, L-teaninin kan-beyin bariyerini geçebildiğini ve L-teaninin diyet uygulamasında (4000 mg/kg,13 hafta) verildiğinde sıçanlarda olumsuz bir etki yapmadığını g6stermiştir (92).

Hayvanlarda yapılan bazı çalışmalar sonucunda L-teaninin psikiyatrik sorunlar anksiyete, psikososyal ve depresyon benzeri davranışları iyileştirdiği g6zlemlenmiştir (93). Ayrıca, bazı alışmalar L-teaninin insanlarda şizofrenik belirtiler 6zerindeki etkileri de tespit edilmiştir (94,95). Daha 6nce yapılan araştırmalarda, L-teaninin, serotonin, dopamin ve -aminob6tirik asit (GABA) gibi beyin n6rotransmitterlerinin aktivitesini mod6le ettiği g6sterilmiş olsa da bu etkilerin altında yatan molek6ler nedenler yeterince anlaşılmamıştır (96). Bazı amino asitler, n6rotransmitterlerin kendileri gibi davranmakta veya n6rotransmitterlerin 6nc6s6 olmaktadır (97). Yapılan başka bir çalışmada, psikiyatrik bozukluğu olan hastaların beyin omurilik sıvısındaki amino asit profillerinin değiştiği 6ne s6r6lm6řt6r (98). Bir “*postmortem*” çalışmasında maj6r depresyonu olan hastaların 6n korteksinde glutamat d6zeylerinde artış g6zlenmiştir. Manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) alışmaları da maj6r depresif bozukluğu (MDB) olan hastaların hipokamp6ste y6ksek glutamat d6zeyi g6sterdiği tespit edilmiştir (99). L-teaninin amino asit taşıyıcılarını inhibe etmesiyle amino asit profillerini değiştirebilmekte ve bu durum aminoasitlerin n6roverici işlevini etkileyebilmektedir (100). 6nceki MRS bulguları sonucu L-teanin n6ronlarda glutamat salınımını inhibe ederek seviyelerini d6ř6rd6ę6 de g6r6lm6řt6r (101).

4.6. Adenozin Kafein Etkisi

Son 20 yılda nörofizyoloji ve nörokimyadaki temel araştırmaların nedeniyle, adenozinin memeli beynindeki fizyolojik rolü hakkındaki bilgiler oldukça artmış bulunmaktadır (102,103). Pürin adenozinin etkilerini artıran veya antagonize eden veya metabolizmasına müdahale eden ilaçlar bir süredir klinik kullanımda olmaktadır (104). Psikiyatrik bozukluklarda, serebral hipoperfüzyona bağlı uyku bozuklukları ve dikkat eksikliği düzeltmek için kafein uygulaması yapılmaktadır (105).

GABA gibi adenozin de, memeli beyinde önemli bir inhibe edici nöromodülatördür. Nöronun elektriksel aktivitesini, kısmen doğrudan bir postsinaptik etki ile, kısmen dolaylı olarak, dopamin, asetilkolin ve glutamat gibi çok çeşitli nörotransmitterlerin salınımını inhibe ederek engellemektedir (106). Bu etkilerin yaygın olarak iki membran reseptörü adenozin A_1 ve A_2 tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. A_1 reseptörlerinin aktivasyonu, hücre içi cAMP seviyesini azaltırken A_2 reseptörlerin aktivasyonu cAMP seviyesini arttırmaktadır (107). Adenozin hücre dışı konsantrasyonları, nöronal aktivasyona bağlı olarak artmaktadır (108). Sonuç olarak, iki ana adenozin kaynağı olan A_1 ve A_2 nörotransmitterler, nörotidazlar ile hücre dışı metabolize olmaktadır (109). Bu transmitterler biyojenik aminlere benzer şekilde metabolize edilemez, ancak iki yönlü difüzyon işlemi ile hücreye geri taşınır (110). Yeniden alım sonrasında adenozin, adenozin trifosfatın oluşumu için yeniden kullanılmaktadır ve ürik aside deaminasyonla metabolize edilmektedir (111). Adenozin tüm nöronların elektriksel aktivitesini baskılamasına rağmen, her bir beyin bölgesindeki adenozinerjik nöromodülatör sistemin tek tek bileşenlerinden ayrı olarak bulunmaktadır. Yüksek nükleotidaz ve reseptör yoğunlukları, büyük ölçüde adenozinerjik nöromodülasyona izin verirken, kinazlar ve deaminazlar bunu sınırlamaktadır (112).

4.7. GABAA ve GABAB Reseptörleri

Sinaptik iletim, nörotransmitterin presinaptik terminallerden salınması ile postsinaptik zarda bulunan reseptörleri aktive ederek oluşmaktadır. Bununla birlikte, nörotransmitter reseptörlerinin presinaptik terminallerde de eksprese edilebileceği uzun süredir bilinmektedir (113). Aslında, postsinaptik zarlarda eksprese edilen hemen hemen her reseptör sınıfı presinaptik terminallerde de bulunmaktadır (114). Örneğin, serebellumdaki paralel fiber *botonlarının* GABA_A, GABA_B, metabotropik glutamat, kanabinoid tip 1, adenosin ve muhtemelen NMDA reseptörlerini ifade ettiği gösterilmektedir (115,116). Presinaptik reseptörlerin her birinin etkileri ayrı ayrı tanımlanmış olsa bile, reseptörlerin birbirleriyle etkileşimi bilinmemektedir (113).

GABA reseptörleri olan GABA_A ve GABA_B bilinen en yaygın presinaptik reseptörler arasında yer almaktadır (117). Bu reseptörler genellikle GABA'nın komşu inhibe edici sinapslardan yayılmasıyla veya hücre dışı ortamda bulunan GABA'sı ile aktive edilmektedir (118,119).

Presinaptik GABA_A reseptörleri genellikle aksonlardaki yüksek klorür konsantrasyonları nedeniyle presinaptik terminalleri depolarize ederek ve vezikül salınımını arttırmaktadır (120,121). Presinaptik GABA_B reseptörleri ise voltaj kaynaklı kalsiyum kanallarını inhibe ederek vezikül salınımını azaltmaktadır (122).

GABA_B reseptörü, bir metabotropik G protein-bağlı reseptördür. GABA_B reseptörlerinin aktivasyonu, hiperpolarizasyon sıklığının azalmasına neden olarak inhibe edici etki göstermektedir (123). Yapılan hayvan çalışmalarında, GABA_B reseptörü agonistleri hem beyinde hem de omurilikteki analjezik etkilere neden olduğu saptanmıştır ve buna bağlı olarak GABA_B reseptörü agonisti baklofen kullanılmaktadır. GABA_B reseptörü agonisti baklofen, kronik ağrıyı tedavi etmek için klinik olarak kullanımdadır (124). Plasebo kontrollü FM klinik denemesinde, bir GABA_B reseptör agonisti olan gama-hidroksibutiratın (GHB) sodyum tuzunun ağrı, uyku bozukluğu ve yorgunluk gibi şikayetleri belirgin bir şekilde azalttığı görülmüştür (125,126). Bu çalışma, GABA_B reseptörü sinyallerinin artırılmasının FM için, potansiyel terapötik bir yaklaşıma katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bununla

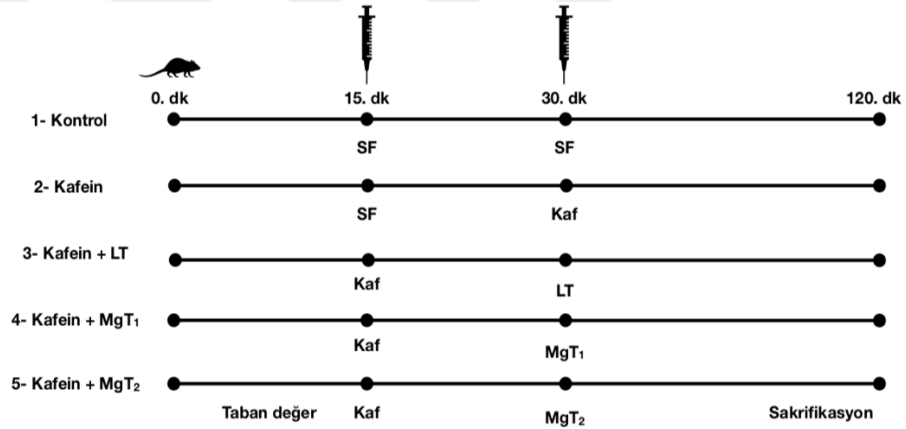
birlikte, GHB ve baklofen sistemik GABA_B reseptörü agonistlerinin yatıştırma (sedasyon), kas güçsüzlüğü ve bradikardi gibi istenmeyen yan etkileride bilinmektedir (127,128). GABA_B reseptörü agonistlerinin yol açtığı yan etkilerden korunmak için olası bir yaklaşım, yerine pozitif allosterik bir modülatör (PAM) kullanımını içerir. PAM'ler, endojen agonistlerin ortosterik ligand bağlama bölgesinden farklı bir bölgeye bağlanarak etkisini arttırdığı için, reseptörü doğrudan aktive etmemekte ve bu nedenle istenmeyen yan etkilerin daha az sıklıkla görülmektedir ve agonist benzeri aktivite sergilemektedir (129,130). GABA_B reseptörleri, yavaş metabotropik inhibisyon üreten dimerik G protein-bağlantılı reseptör ailesindendir. Aşırı uyarılma ve nöbetlerin oluşmasını önlemek için bu reseptörler gerekmektedir. İşlevsel olarak yavaş GABA_B aracılı inhibisyon δ tipi GABA_A reseptörlerinden kaynaklanan tonik iletkenlik inhibisyonuna oldukça benzemektedir. GABA_B reseptörleri presinaptik terminalleri üzerinde dışa dönük olarak yerleşmektedir (131,132). Glutamat veya GABA nöronları GABA_B reseptörlerini aktive etmek için K⁺ kanallarını açar ve voltaj kapılı Ca²⁺ kanallarını kapatır, böylece nörotransmitterin terminallerden serbest kalmasını sağlamaktadır (133). Hücresele seviyede GABA_B reseptörlerinin aktivasyonu inhibe edici olmaktadır, ancak ağ seviyesinde bu reseptörlerin aktif hale getirilmesi uyarıcı etkileri oluşturmaktadır. GABA salımını azaltmak için GABA_B reseptörleri, GABAerjik nöronun başka bir GABAerjik terminali veya bir glutamaterjik uyarıcı terminalini inhibe edip etmediğine bağlı olarak ağ seviyesinde uyarıcı veya inhibe edici etkileri olabilmektedir (134).

Bu çalışmada, kafeinin beyine yaptığı uyarımı ve teaninin inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Korteks beyin dalgaları uyarıcı etkiye sahip minimum kafein konsantrasyonunu belirlemek için ölçülmüştür. En az etkili kafein konsantrasyonu ile uyarılma üzerindeki teaninin inhibe edici etkisinin konsantrasyonu incelenmiştir.

5. MATERİYAL VE METOT

5.1. Deney Şeması ve Deney Grupları

Bu tezde bulunan bütün deneyler İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2019/57 onayı alınarak yapıldı. Deney kapsamında kullanılan Balb/c farelere İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi'ndeki barınma odalarında 12 saat aydınlık/karanlık olacak şekilde biyolojik saatleri dikkate alınarak bakıldı. Yapılan deneylerde, deney hayvanı olarak ortalama ağırlıkları 22-30 gram olan 8 haftalık Balb/c dişi fareler kullanıldı.



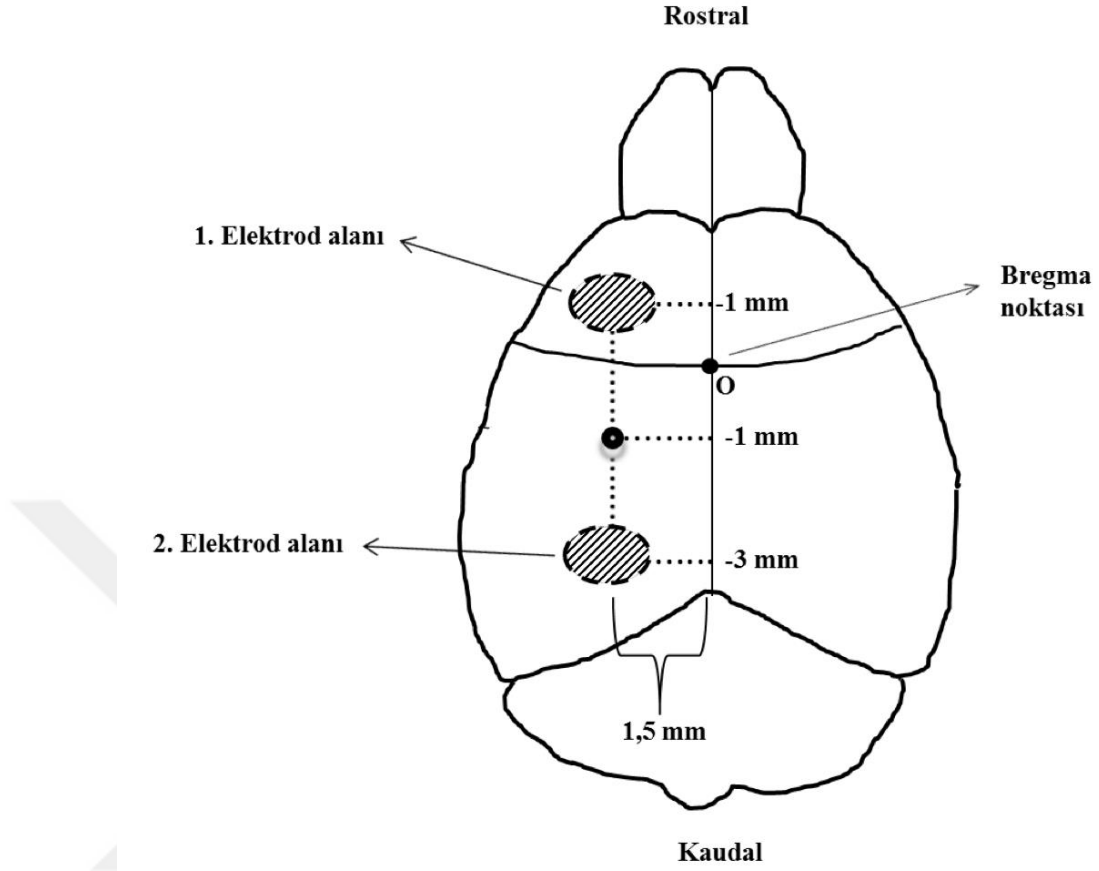
Şekil 5.1.1. Deney Şeması

Tablo 5.1.2 Deney grupları

Grup Adı	Türü/Cinsiyeti	Yaşı	Sayısı
1 Salin	BALB/c Dişi	8 Haftalık	8
2. Kafein	BALB/c Dişi	8 Haftalık	8
3. KL-teanin (20mg teanin)	BALB/c Dişi	8 Haftalık	8
4. KMg-teanin #1(20mg teanin)	BALB/c Dişi	8 Haftalık	8
5. KMg-teanin #2(20mg teanin)	BALB/c Dişi	8 Haftalık	8

5.2. EEG Kaydı ve Farmakolojik Ajanların Verilmesi

Sekiz haftalık Balb/c farelere 1,75 g/kg olacak şekilde %0,9 izotonik serum fizyolojik (SF) içerisinde çözölen üretan (U2500-250G, Sigma, China) anestezi ajanı intraperitoneal olarak verildi. Anestezi altına alınan fareler stereotaktik çerçeveye (World Precision Instruments, Berlin, Almanya) yerleştirildi. Deney boyunca farelerin vücut sıcaklığı ısıtıcı battaniye sistemi (507221F, Harvard Apparatus, ABD) ile düzenli olarak ölçöldü.



Şekil 5.2.1. Beyin hemisferindeki elektrod alanları.

Farelerin sol korteksi yüksek hızlı tur aleti (Marathon-3, Güney Kore) kullanılarak kaldırıldı. Sonrasında bregma noktası merkez kabul edilerek iki adet Ag-AgCl elektrodu korteks üzerine yerleştirildi. AP: 1 mm, L: 1,5 mm bölgesine ilk elektrot (FE136 Animal Bio Amp: MLA1212 Micro-Hook Electrodes, AD Instruments, Avustralya), AP: -3 mm, L: -1,5 mm bölgesine ise ikinci elektrot yerleştirildi.

Deney için kullanılan L-teanin ve kafein maddeleri %0,9 izotonik sodyum klorür (Salin) içerisinde çözündürüldü. Her ilaç çözeltisinin konsantrasyonu 1,0 ml/kg sabit olacak şekilde ayarlanarak enjekte edildi. İlaçlar günlük olarak hazırlandı ve 75µl miktarında intraperitoneal olarak verildi.

5.2.2. Beyin elektriksel aktivite kaydı

Deney süresi boyunca deney gruplarının gerçek zamanlı bölgesel EEG kaydı (PowerLab 16/30, AD Instruments, Castle Hill, Avustralya) (Şekil:) alındı. Elektrotlardan gelen biyolojik sinyaller, BioAmp amplifikatörleri (AD Instruments, Castle Hill, Avustralya) kullanılarak amplifiye edildi ve bant geçirimi 0,03-60 Hz ve genliği 10 mV olacak şekilde sınırlandırıldı. EEG kaydından alınan ölçümlerde frekans ve genlik analizi çevrim dışı olarak analiz edildi (Labchart PowerLab Software, AD Instruments, Castle Hill, Avustralya). Kayıt tamamlandıktan sonra fareler sakrifiye edildi ve beyinleri alındı.



Resim 5.2.3. Beyin elektriksel aktivite kaydı için elektrotların yerleştirilmesi.

5.3. WESTERN BLOT

5.3.1. Protein izolasyonu

Deneye başlamadan önce lizis tampon çözeltisi -20°C'den çıkartıldı ve soğuk buz üzerinde eritildi. İzole edilecek dokular kırık buz üzerinde tutuldu. 2 ml mikrosantrifüj tüpü tüplerde izole edilen dokuların net ağırlıklarını bulmak amacıyla 2ml boş mikrosantrifüj tüpüne darası alınarak dokuların net ağırlıkları mg olarak hesaplandı. Ağırlığı belirlenen dokunun 3-5 katı miktarda Proteaz fosfataz inhibitörü içeren lizis tamponu eklendi ve vorteks (541-1000-00-1, Heldolph Instruments, Germany) yapıldı. Homojenizatör ayarlanarak tüpler 10 saniye homojenize edildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı ve sonrasında her bir örnek kırık buza alındı. Buzda 20 dakika inkübasyon sonrasında 14000 rpm de +4°C'ye ayarlı santrifüjde 15 dakika santrifüj (621BR24358, Bio-Rad, Germany) yapıldı. 1,5 ml'lik veya 0,5 ml etiketlenmiş mikrosantrifüj tüplere mikropipet yardımıyla proteinleri içeren supernatant aktarıldı. Bu tüpler protein stok tüpleri olacak şekilde hazırlandı ve her örnek için bu stoktan 10-50 µl alındı.

5.3.2. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Protein konsantrasyonları Qubit® Protein çalışma kiti (Q33211; Invitrogen, ABD) kullanılarak Qubit Fluorometer 2.0 (Q32866; Invitrogen, ABD) cihazı ile ölçüldü. Örnekler, konsantrasyon ölçümlerine göre eşitlenip 20 µg/10 µl olacak şekilde hesaplandı. Beta-merkaptoetanol içeren 2X Laemmli tamponu (161-0737; Bio-Rad, ABD) ile karıştırıldı 95 °C'de 5 dakika bekletildi, sonrasında ise hemen kırık buzun üzerine alındı.

5.3.3. Western blot

Her kuyucukta 20 µg ve 10 µl protein olacak şekilde örnekler hazırlandı. Laemmli buffer 2X'i aktiveştirmek için total hacime göre %5 β-merkaptoetanol eklendi. Örnekler vortex ve spin-down (AC100-240V, Inovia Technology, Germany) edilerek ACddH₂O+ 2X aktif Laemmli tampon çözelti ile karıştırılarak, kuyucuklara yüklenmek üzere hazırlandı. Örnekler kuyucuklu blok ısıtıcı'ya (AS-MK200-1145E, Losheng instrument, China) yerleştirilerek 5 dakika inkübasyonu sağlandı. İnkübasyon sonrasında örnekler spin-down edilerek buz üzerine alındı ve jel'in kuyucukları içe bakılacak şekilde WB kasedine takıldı ve tanka oturtulduktan sonra Yürütme tamponu(161-0772, Bio-Rad, Germany) eklendi. İlk olarak 5 dakika 50 voltta, sonrasında 90 dakika 100 voltta ve en sonda 150 voltta bantlar istenilen noktaya gelinceye kadar yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra iBlot (Invitrogen, ABD) cihazı ve iBlot Gel Transfer Stacks PVDF, Regular (IB401001, Invitrogen, ABD) transfer kiti kullanılarak jellerdeki proteinlerin polivinilden diflorit (PVDF) (170-4272; Bio-Rad, ABD) membranlara transferi yapıldı. PVDF membranlar ilgilenilen proteinlerin bulunduğu bölgeye bağlı olarak uygun boyutlarda kesildikten sonra tris tamponlu salin-Triton-X-100(TBS-T) ile hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) 1 saat bloklamaya alındı. Bloklama sonrasında sonra kullanılacak primer antikorlar GABA_A-R2, GABA_B-R1, GABA_B-R2, 5-HT1A, 1:1000 ve 1:5000 oranında bloklama solusyonu ile seyreltilerek +4 °C'de gece boyunca (16 saat) shaker üzerinde sallantıda bırakıldı.

İnkübasyon sonunda membran yıkamaya alındı. Üzerlerine TBS-T (TBS + %0.1 Tween-20) eklenerek 3 kez 5 dakika aralıklarla yıkama yapıldı. Yıkama yapıldıktan sonra (1:1000; 1:5000; 1:500) oranında bloklama solusyonu içerisinde seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor anti rabbit (7074, Cell Signaling Technology, ABD) veya anti Mouse (7076, Cell Signaling Technology, ABD) oda sıcaklığında ışığa maruz kalmayacak şekilde 60 dakika inkubasyona bırakıldı. Bantlar Western görüntüleme solusyonları (Clarity™ Western ECL substrate,170-5060, BIO-RAD, ABD; WesternBright™Sirius, Westernblotting detection kit, K-12043-D10 Advansta, ABD) kullanılarak ChemiDoc MP görüntüleme cihazında görüntülendi.

5.3.4. Stripleme

Membranlar strip solüsyonu (%73,7 ddHO, %20 Sodyum Sülfat (10%), %0.007 Beta- merkapttoethanol) ile muamele edilerek 50°C sıcaklıkta 20 dakika boyunca inkubasyona bırakıldı. Daha sonra TBS-T ile 3 kere beşer dakika boyunca yıkanarak, bloklama aşamasından itibaren takip edilen protokol farklı bir antikor (Beta-aktin, 4970, CST) kullanılarak tekrar edildi. Örneğin; Bcl-xL antikoruna bakıldı.

5.4. Elisa

Tablo 5.4.1 Deneyde kullanılan reaktif çeşitleri ve miktarları

Reaktifler	Miktar	Reaktifler	Miktar
Önceden kaplanmış, kullanıma hazır 96 oyuklu <i>well plate</i>	1	96 kuyuluk Kapaticı Plate	4
Standart	2	Standart	1×20mL
Reaktif A	1×120µL	Sulandırıcı A (Assay Diluent)	1×12mL
Reaktif B	1×120µL	Sulandırıcı B (Assay Diluent)	1×12mL
TMB substrat	1×9mL	Durdurma solüsyonu	1×6mL
Yıkama solüsyonu (konsantrasyon)	1×20mL	Kullanım talimatı	1

İlk aşama olarak dokuların temizlenmesi için soğuk PBS ile yıkama yapıldı. Hazır hale gelen dokular homojenizatörde lizis tamponu ile küçük parçalar haline getirildi. Elde edilen çözelti Ultrasonik hücre transmitteri yardımı ile berraklaştırıldı ve

daha sonra 5 dakika 10000 rpm'de santrifüj yapıldı ve kullanılması için -20 °C'de saklandı.

Hücreleri parçalamak için dokular 3 defa soğuk PBS'den geçirildi ve tripsinle ayrılıp 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj yapıldı. 107 hücre/ml konsantrasyonu ile taze lizis tampon içinde bırakılarak çözelti tekrardan ultrasona tabi tutuldu. Daha sonra 2-8° C'de 10 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüj yapılarak tahlil için hazır hale getirildi.

5.4.2 Tahlil prosedürü

Seyreltilmiş standartlar boş ve numuneler olacak şekilde kuyucuklar hazırlandı ve Plate sealer (kaplama Ambalajı) ile kapatıldı. 1 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra her kuyuya 100µL Reaktif A çalışma çözeltisi eklenerek, kuyucuklar kapatıcı ile kapatılıp 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Her kuyucuk 350µL 1 × Yıkama Solusyonu ile 3 kez yıkandı ve 1- 2 dakika bekletildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 100µL reaktif B çalışma çözeltisi eklenerek, kapatıcı ile kapatılarak ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Yıkama işlemi 4. adımda yapıldığı gibi toplam 5 kez tekrarlandı. Daha sonra her kuyucuğa 90µL Substrat çözeltisi eklenerek yeni bir kaplama ambalajı ile örtülmüş 37 °C'de 10-20 dakika ışıktan korunarak inkübe edildi. Sonrasına her kuyucuğa 50µL Durdurma solüsyonu eklendi ve çözeltinin sıvıyı sarıya çevirmesine bakıldı. Numunelerin antikor kaplı 96 kuyucuklu plakalarla inkübasyonundan sonra, proteinler için enzime bağlı antikorlar eklendi. Rengin yoğunluğu, 450 nm'de bir mikrolaka okuyucuda (Chromate Manager 4300, Palm City, ABD) ölçüldü.

Serotonin, Dopamin ve Melatonin hormon seviyelerini belirlemek için USCN Life Science'dan (Katalog No: E94912Hu ve SEA868Hu. E94912Hu) enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) kitleri kullanıldı (135). Standartlar veya örnekler daha sonra biyotin konjuge antikorlu uygun mikrolaka kuyularına eklendi. Daha sonra, Horseradish Peroxidase (HRP) 'ye konjuge Avidin, her bir mikrolaka kuyusuna eklenerek inkübe edildi. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra, sadece SIRT, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyucuklar renkte bir değişiklik gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisinin

eklenmesi ile sonlandırılarak renk değişikliği, $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Numunelerdeki SERT konsantrasyonu, daha sonra, O.D. numunelerin standart eğriye göre incelendi.

5.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen datalar SPSS istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farklar One Way ANOVA ve Tukey's post-hoc test kullanılarak, en düşük anlamlı farklılık testiyle analiz edilmiştir.

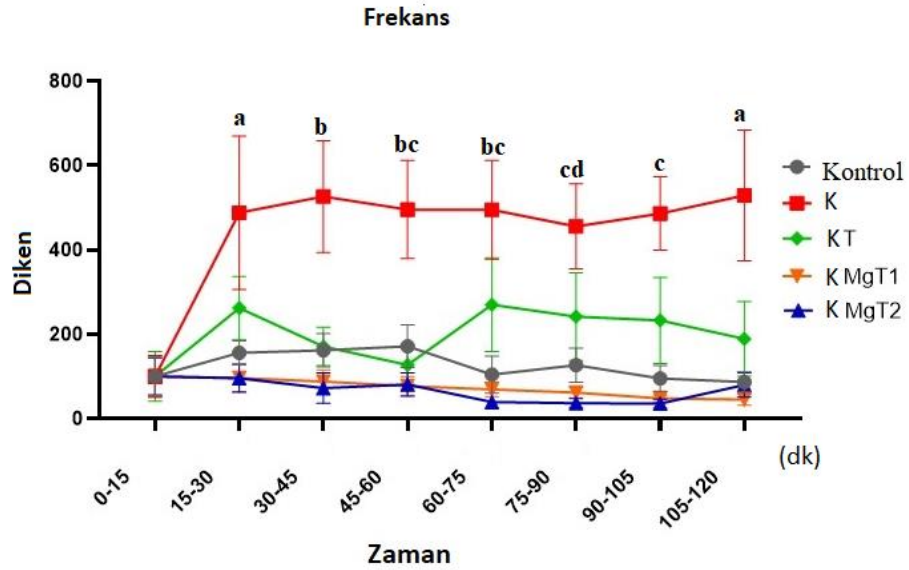
Western blot sonunda elde edilen görüntüleme sonuçları ImageJ programı kullanılarak analizi yapıldı. Bant boyutlarının piksel bazlı optik yoğunluk değerlerinden zemin değeri çıkartılarak endojen kontrol olarak kullanılan beta aktin proteinine göre optimize edildi.

Bütün değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiş, * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1.Beyin Elektriksel Aktivitesi

120 dakika operasyonun başarısını kontrol etmek için beyin bölgesine (bregmadan 1mm anterior/1,5mm lateral ve posterior 3mm/1.5mm lateral) iki Ag-AgCl küre elektrotu referans bölgelerine yerleştirilerek kayıt alındı. Kayıdın başlangıcından sonuna kadar belli aralıklar taban değer ve diğer maddelerin verilmesi için seçilerek takip edildi.



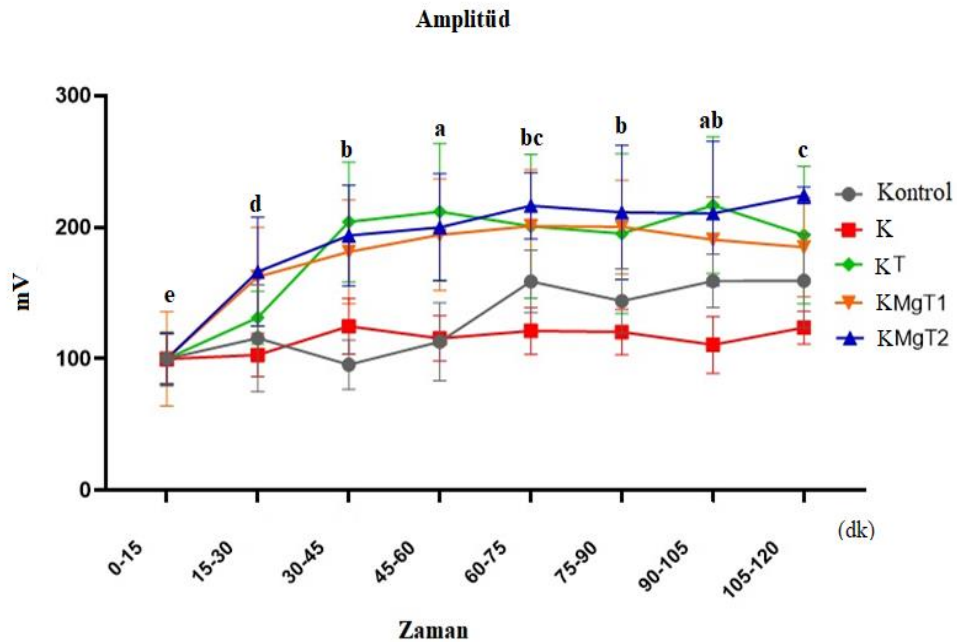
Şekil 6.1.1. Kontrol grubu ile deney gruplarının zamana bağlı olarak Elektroensefalografi (EEG) beyin elektriksel aktivitesinin frekans gösterimi.

120 dakika kayıt süresince beyine 15. dakikada Kafein 30. dakikada kafein etkisini inhibe edici L-teanin ve farklı formları verilerek Elektroensefalografi (EEG)

yöntemi ile beyinin uyarım aktivitesi analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. ^d $p<0,01$ / ^a $p<0,05$ kontrol grubu ile tedavi grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Yapılan çalışmada, 120 dakika kayıt süresinin 15. dakikasında verilen kafein maddesinin kontrol ile kıyaslandığında beyin aktivitesine yüksek oranda uyarıcı etki ettiği gözlemlendi. Alınan EGG kaydı sonucunda kafein uygulanan deney gruplarında frekans değerlerinde artışı tespit edildi. Çalışmanın 30. dakikasında verilen teanin maddesi ve farklı formları kafein sonucuna etki ederek uyarımı tersine çevirip frekans değerinde düşüş sağladı.

Kafein grubu kontrol grubuna kıyasla beyin aktivitesine yüksek oranda uyarıcı etki ettiği gözlemlenmiştir ve frekans değerinde artış görülmüştür. Kafein sonrası 30.dakikada verilen teanin ve farklı formlarının kafeninin uyarımına olan etkisini tersine çevirerek frekans değerinde düşüş sağlandı.



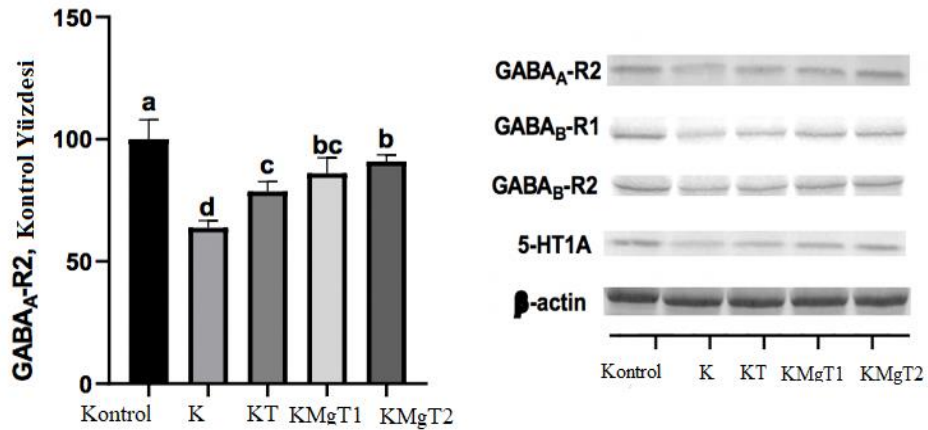
Şekil 6.1.2. Kontrol grubu ile deney gruplarının zamana bağlı olarak Elektroensefalografi (EEG) beyin elektriksel aktivitesinin amplitüd gösterimi.

120 dakika kayıt süresince beyine 15. dakikada Kafein 30. dakikada kafein etkisini inhibe edici teanin ve farklı formları verilerek (EEG) yöntemi ile beyin aktivitesi analiz edildi. Verilen ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. ^d $p < 0.01$ / ^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile tedavi grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Belirlenen 120 dakika kayıt süresinin 15. dakikasında verilen kafein beyin aktivitesinin uyarılmasını sağlayarak frekans değerinin aksine genlikte azalma gözlemlendi. 30. dakikada verilen teanin ve farklı formları kafein etkisini inhibe ederek zamana bağlı genlikte yükselişe sebep oldu.

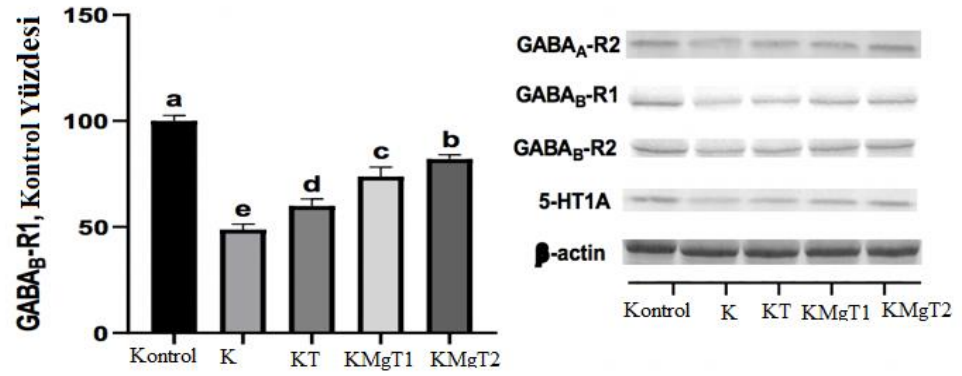
6.2. Protein Analizi

EEG kaydı sonrasında protein seviyesindeki değişikliklerin değerlendirilebilmesi amacıyla hayvanlar sakrifiye edildikten sonra beyinleri hızlıca izole edildi ve kuru buz üzerinde donduruldu. Daha sonra dondurulan beyinlerin korteks bölgelerinden protein izolasyonları yapıldı.



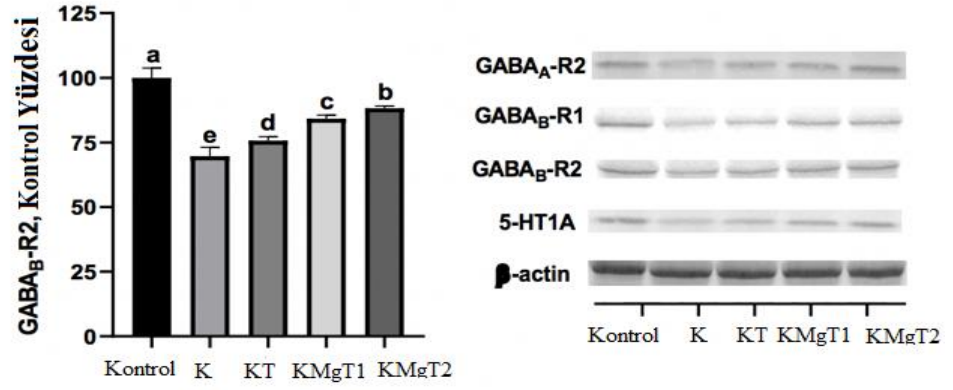
Şekil 6.2.1. GABA_A-R2 protein seviyesinin kontrole göre yüzdesi.

Kontrol grubuyla kıyaslandığında kafein grubunda nöronal sinaptik iletimi sağlayan GABA_A-R2 protein seviyesi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşmüştür ($p<0,05$, **Şekil 6.2.1**). Kafein sonrasında verilen L-teanin grubunda ise kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlemlenmiştir. L-teaninin formları olan #1Mg-teanin ve #2Mg-teanin verilen grublarda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür.



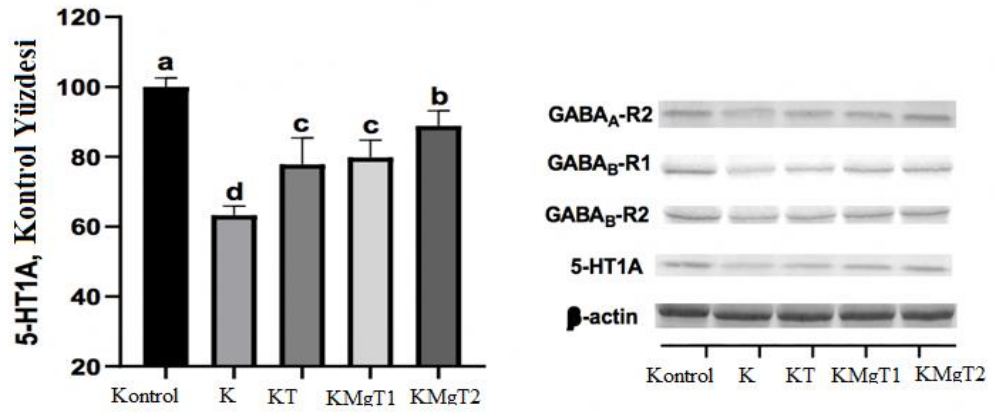
Şekil 6.2.2. GABA_B-R1 protein seviyesinin kontrole göre yüzdesi.

Kontrol grubuyla kıyaslandığında kafein grubunda GABA reseptörünün alt birimi olan ve heterodimerik fonksiyon sağlayan GABA_B-R1 protein seviyesi istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p<0,05$, **Şekil 6.2.2**). L-teanin grubunda ise kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir. L-teaninin formları olan #1Mg-teanin ve #2Mg-teanin verilen grumlarda kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış sağlamıştır.



Şekil 6.2.3. GABAB-R2 protein seviyesinin kontrole göre yüzdesi.

Kontrol grubuyla ile kıyaslandığında kafein grubunda GABA reseptörünün alt birimi olan ve izomerik fonksiyon sağlayan GABA_B -R2 protein seviyesi istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür ($p < 0,05$, Şekil 6.2.3). L-teanin grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. L-teaninin formları olan #1Mg-teanin ve #2Mg-teanin verilen gruplarda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiştir.



Şekil 6.2.4. 5-HT1A protein seviyesinin kontrole göre yüzdesi.

Kontrol grubuyla ile kıyaslandığında kafein grubunda santral bir mekanizma ile periferik vazodilatasyonu indükleyen 5-HT1A protein seviyesi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma göstermiştir ($p < 0,05$, Şekil 6.2.4). L-teanin grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. L-teaninin formları olan #1Mg-teanin ve #2Mg-teanin verilen gruplarda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür.

6.3.Beyin Hormonal Düzeylerinin Ölçülmesi

Tablo 6.3.1. Farklı teanin formlarının farelerin beyininde serotonin, dopamin ve melatonin düzeylerine etkisi

Öğeler	Gruplar					- -P--*
	Kontrol	K	KT	KMgT1	KMgT2	
Serotonin , ng/g	836.29+44. 21 ^a	571.00+42 .14 ^d	655.43+35 .46 ^c	762.29+25. 34 ^b	751.43+30. 34 ^b	0.0001
Dopamin , ng/g	968.00+74. 44 ^a	584.86+72 .47 ^d	779.00+77 .73 ^c	832.71+74. 50 ^{bc}	895.57+61. 93 ^{ab}	0.0001
Melatonin, pg/g	0.95+0.07 ^a	0.59+0.05 ^d	0.69+0.08 ^c	0.80+0.03 ^b	0.85+0.04 ^b	0.0001

K: Kafein; T: Teanin; Mg: Magnesium; MgT: Magnesium-teanet. Veriler ortalama ve standart sapmalar olarak sunulmuştur. a-c: Aynı çizgiyi ifade eden ortak bir üst simge olmadan önemli ölçüde farklı test ELISA ile yapıldı.

ELISA testi sonucu dokuda olan serotonin, dopamin ve melatonin kontrol grubu ile kıyaslandığında kafein verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma saptanmıştır ($P < 0,05$; *ANOVA and Tukey's *post-hoc test*). L-teanin grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak azalma görülmüştür. L-teaninin formları olan #1Mg-teanin ve #2Mg-teanin verilen gruplarda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak azalma tespit edilmiştir.

7. TARTIŞMA

Literatürde bulunan araştırmalarda uykusuzluk; uygun koşullar sağlanmasına rağmen, uykuya dalmakta veya uykuyu sürdürmede zorluk, yetersiz sürede uyuma ve restoratif olmayan uyku ile birlikte bu durumun kişinin uyanık yaşamında etkili olması olarak tanımlanmaktadır (136). Uyku bozuklukları bedensel ve sosyal yaşamı, ruh sağlığını, olumsuz etkileyen, akademik başarıda ve iş verimliliğinde düşüşe, kazalarda artışa neden olabilen ciddi anlamda bir halk sağlığı sorunudur (137). Epidemiyolojik çalışmaların çoğu, yetişkinlerin yaklaşık üçte birinin (%30-%36) uykuya başlama veya uyumayı sürdürmede zorluk yaşadığını rapor etmiştir (138). Biz de bu çalışma neticesinde daha önceki çalışmaları destekleyici nitelikte sonuçlar ortaya koyduk.

Bu tez çalışmasında L-teanin intraperitonel olarak farelerde 0,78mg/kg'dan daha yüksek bir dozda verildiğinde yapılan analizler sonucunda, kafeinin uyarıcı etkisini engelleyebileceği gösterildi. Maddenin sistem içerisindeki doz miktarı daha önceki çalışmalarla ilişkili olarak belirlendi. 2014 yılında yapılan bir çalışmada teanin ve formları 2 µmol/kg (0,348 mg/kg) yoğunlukta uygulandığı takdirde aynı kafein gibi uyarıcı etki ettiği gösterirken, bu yoğunluk 5 µmol/kg (0,781 mg/kg) çıkarıldığında kafeinin uyarıcı etkisini inhibe ettiği görülmüştür (139).

Bu zamana kadar yapılmış L-teanin çalışmalarında model hayvan olarak sıçan (139,140) ve tavşan (141) kullanılmıştır. Biz ise çalışmamızda hayvan modeli için Balb/c farelerini kullandık. Bu hayvan modelini seçme nedenimiz duyarlılığın lokasyona göre belirlendiği atipik bir deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) formu geliştirmemesidir (142). Sıçanlarda ortalama ağırlık 260-320g iken (140) kullandığımız farelerde bu ağırlık ortalama 30g olucak şekildedir. İlaç konsantrasyon ayarlaması bu ağırlıklar baz alınarak yapılmıştır.

Alınan EEG kaydı analizi sonucu kafein uygulanan deney gruplarında frekans değerlerinde belirgin artış gözlemlendi. Kafein ile beyin aktivitesinin uyarılması frekans değerine ters orantılı olarak genlik değerinde azalmaya sebep oldu. Sonuçlarımız geçmiş çalışmalar ile paralelik göstermiştir (143). Bunun yanı sıra EEG

sonuçları literatürdeki çalışmalarda beynin korteks, hipokampus ve amigdala gibi farklı bölgelerinden incelenmiş ve sonuçlar birbirleri ile uyduğu için yalnız korteks bölgesi ile çalışmanın yeterli olduğu düşünülmüştür (139).

Frekans ve genliklerdeki değişim sonuçlarını anlamlandırmak için kafeinin EEG belirteçleri üzerindeki etkisi 2008 yılında incelenmiş ve kafeinin uyku esnasında, uyku homeostazının EEG belirteçlerini azalttığı görülmüştür (144).

Kafein tüketimi uyanıklık süresinin artmasını sağladığı görülmektedir (145) ve maddenin alımı beynin yaygın bölgelerinde bulunan A_1 ve A_2A reseptörlerini antagonize ederek uyku uyarılma mekanizması üzerine etki ettiği bilinmektedir (146). Adenozin hem sinir hücresi davranışlarını hem de sinir hücresi aktivitesini postsinaptik bölgedeki sinir hücreleri üzerine direk olarak ve nörotransmitter kimyasallarının presinaptik salgılanışını dolaylı olarak engellediği görülmüştür (147).

Uygulanan kafein ile teanin ve formlarının hücre içi sinyal mekanizmasına nasıl etki ettiğinin değerlendirilebilmesi için Western Blot yöntemi ile protein analizi yapıldı. Özellikle GABA santral sinir sisteminde ve retinada en iyi bilinen presinaptik inhibitör ve beyin metabolizması ve işleyişi için önemli bir nörotransmitter olduğundan $GABA_A-R2$, $GABA_B-R1$, $GABA_B-R2i$ ve 5-HT1A protein seviyeleri analiz edildi. Bu protein seviyelerinden bir kısmı daha önceki çalışmalarda polyganatum sibiricum rhizome (PSR) maddesinin uyku arttırıcı etkilerini araştırmak üzere çalışılmış proteinlerdendir (148). Analizlerimiz sonucunda kafein uygulanan gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman dört protein seviyesinde de istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüş görülmüştür. Protein seviyesinde görülen bu değişim mRNA ekspresiyonunun artmasını sağlayarak uykuyu iyi yönden etkilemektedir (149). Aynı zamanda nöron verici sistemler olan glutamat bağlayıcı reseptörlerin aktivasyonuna değiştirerek uykuyla beraber öğrenme fizyolojisinde etkisi görülmektedir (150).

Biyokimyasal ve oksidatif stres belirteçleri olan, serotonin, melatonin ve dopamin hormonlarının beyindeki düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Kafein yapısal olarak adenozine benzer ve jeneralize inhibitör fonksiyona sahiptir.

Beyin, yüksek adenosin düzeyine sahiptir ve adenosin genellikle serotonin, dopamin, asetilkolin, norepinefrin gibi nörotransmitterlerin konsantrasyonunu düşürmektedir. Adenosin ile kafein arasındaki yapısal benzerlik, kafeinin adenosin reseptörlerine bağlanıp yarışabilmesine olanak tanır, böylece adenosinin sinir hücreleri üzerine etkisini bloke etmektedir (151). Bu bilgiler ışığında deney grupları değerlendirildiğinde ve serotonin değeri kontrol grubu ile kıyaslandığında kafein; serotonin seviyesinde büyük ölçüde azaltmaya neden oldu. Dopamin ve melatonin değerleri kontrol grubunu baz alarak bakıldığında ise aynı şekilde azalma gözlemlendi.

Teanin uygulaması, hipokampusta (HIP) nörotropik faktör ekspresyonunu artırır ve dopamin, serotonin, ve γ -aminobutirik asit gibi beyin nöro-transmitterlerinin aktivitesini değiştirerek düzenler (88). Kafein uygulaması sonrasında teaninin formları verilen gruplarda kafein ile düşmüş olan hormon seviyeleri üzerinde artış gözlemlendi. Gözlemlenen artış uygulama yapılmamış kontrol grubunun hormon seviyeleri ile karşılaştırıldığında ise hiçbir teanin formunun kontrol grubu kadar yüksek olmadığı sonucuna varıldı. Bu sonuçlar bize her ne kadar teanin formlarının kafeinin uyarıcı etkisini inhibe ettiğini gösterse de, yüzde yüzlük bir etki sağlamadığı ortaya koyuldu.

8. SONUÇ

Elde edilen tüm veriler incelendiğinde teanin formları farelere intraperitoneal olarak 0,78mg/kg üzerinde bir dozda verildiğinde kafenin uyarıcı etkisini tersine çevirerek inhibe ettiği elektroensefalografi (EEG) kaydı sonucu görülmektedir.

Kafein uygulaması kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman GABA_A-R2, GABA_B-R1, GABA_B-R2, 5-HT1A protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmaktadır. Teanin formları ile kıyaslandığı zaman ise protein düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmaktadır.

Ayrıca kafein sonrası verilen teanin formları beyindeki serotonin, dopamin ve melatonin hormon düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında azaldığı, kafein grubu ile kıyaslandığında ise anlamlı şekilde arttığı görülmektedir.

Uygulanan teanin formlarının GABA aracılı inhibitör nörotransmisyonuna etki ederek kafein uygulamasının neden olduğu uyarıcı aktiviteyi engelleyerek stres önlediği, sakinlik hissini arttırdığı ve uyanıklık süresini azalttığı düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Suhyeon Kim, Kyungae Jo, Ki-Bae Hong, Sung Hee Han & Hyung Joo Suh GABA and l-theanine mixture decreases sleep latency and improves NREM sleep, *Pharmaceutical Biology*, 57:1, 65-73. (2019).
2. J.M. Siegel, Clues to the functions of mammalian sleep, *Nature* 437 (7063) 1264–1271. (2005).
3. A.G. Harvey, K. Stinson, K.L. Whitaker, D. Moskowitz, H. Virk, The subjective meaning of sleep quality: a comparison of individuals with and without insomnia, *Sleep* 31 (3) 383–393.(2008).
4. UYKU BOZUKLUKLARINDA TEDAVİ REHBERİ, İNSOMNİ Hikmet Yılmaz, Ayşin Kısabay, Utku Ogan Akyıldız, Ebru Ergin Bakar PSİKOFİZYOLOJİK İNSOMNİ.(2014).
5. L. Fiorentino, J.L. Martin, Awake at 4 AM: treatment of insomnia with early morning awakenings among older adults, *J. Clin. Psychol.* 66 (11) 1161–1174. (2010).
6. D. Cunningham, M.F. Junge, A.T. Fernando, İnsomnia: prevalence, consequences and effective treatment, *Med. J. Aust.* 199 (8) 36–40. (2013).
7. Z.J. Wang, J.F. Liu, The molecular basis of insomnia: implication for therapeutic approaches, *Drug Dev. Res.* 77 (8) 427–436. (2016).
8. J.H. Woods, J.L. Katz, G. Winger, Benzodiazepines: use, abuse, and consequences, *Pharmacol. Rev.* 44 (2) 151–347. (1992) .
9. Y. Shi, J.-W. Dong, J.-H. Zhao, L.-N. Tang, J.-J. Zhang, Herbal insomnia medications that target GABAergic systems: a review of the psychopharmacological evidence, *Curr. Neuropharmacol.* 12 (3) 289–302. (2014).
10. Khan S, Duan P, Yao L, Hou H. 2018. Shiftwork-mediated disruptions of circadian rhythms and sleep homeostasis cause serious health problems. *Int J Genomics*. 21:857-6890.(2018).

11. Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S. Valerenic acid potentiates and inhibits GABAA receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology*. 53:178–187. (2007).
12. Trauner G, Khom S, Baburin I, Benedek B, Hering S, Kopp B. Modulation of GABAA receptors by valerian extracts is related to the content of valerenic acid. *Planta Medica*. 74:19–24. (2008).
13. Wong T, Guin C, Bottiglieri T, Snead OC. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol*. 54:3–12. (2003).
14. Sagesaka, Y., Kakuda, T., and Kawamura, K., Pharmacological effect theanine, *Proceedings of the International Symposium on Tea Science*, Shizuoka, August, 362-365. (1991).
15. Kobayashi, K., Nagata, Y., Aoi, N., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T., and Sugimoto, S., Effects of L-theanine on the release of cM-brain waves in human volunteers, *Nihon Nibgeikakgaku Kaishi* (in Japanese), 72, 153-157. (1998).
16. Takami Kakuda, Ayumu Nozawa, Tomonori Unno, Noritaka Okamura and Osamu Okai. Inhibiting Effects of Theanine on Caffeine Stimulation Evaluated by EEG in the Rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(2), 287-293. (2000).
17. Kimura, R. and Murata, T., Influence of alkylamides of glutamic acid and related compounds on the central nervous system I, Central depressant effect of theanine. *Chem. Pharm. Bull*, 19, 1257-1261. (1971).
18. Clark I and Landolf HP. Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Sleep Medicine Reviews* 31 -78. (2017).
19. Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev*; 17(2):139-70. (1992).
20. Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk AV. Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep Med Rev*; 15(2):123-35. (2011).

21. Ursing C, Wikner J, Brismar K, Roëjdmark S. Caffeine raises the serum melatonin level in healthy subjects: an indication of melatonin metabolism by cytochrome P450(CYP)1A2. *J Endocrinol Invest*;26(5): 40306.(2003).
22. Kamimori, G. H., Karyekar, C. S., Otterstetter, R., Cox, D. S., Balkin, T. J., Belenky, G. L., et al. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*, 234(1–2), 159–167. (2002).
23. Retey, J. V., Adam, M., Khatami, R., Luhmann, U. F., Jung, H. H., Berger, W., et al. A genetic variation in the adenosine a2a receptor gene (adora2a) contributes to individual sensitivity to caffeine effects on sleep. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(5), 692–698. (2007).
24. Landolt, H. P. Sleep homeostasis: A role for adenosine in humans? *Biochemical Pharmacology*, 75(11), 2070–2079. (2008).
25. Pecotic, R., Valic, M., Kardum, G., Sevo, V., & Dogas, Z. Sleep habits of medical students, physicians and nurses regarding age, sex, shift work and caffeine consumption. *Lijecnicki Vjesnik*, 130(3–4), 87–91. (2008).
26. Carrier, J., Paquet, J., Fernandez-Bolanos, M., Girouard, L., Roy, J., Selmaoui, B., et al. Effects of caffeine on daytime recovery sleep: A double challenge to the sleep- wake cycle in aging. *Sleep Medicine*, 10(9), 1016–1024. (2009).
27. Philip, P., Taillard, J., Moore, N., Delord, S., Valtat, C., Sagaspe, P., et al. The effects of coffee and napping on nighttime highway driving: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 144(11), 785–791. (2006).
28. Ataka, S., Tanaka, M., Nozaki, S., Mizuma, H., Mizuno, K., Tahara, T., et al. Effects of oral administration of caffeine and d-ribose on mental fatigue. *Nutrition*, 24(3), 233–238. (2008).

29. Kilpeläinen, A. A., Huttunen, K. H., Lohi, J. J., & Lyytinen, H. Effect of caffeine on vigilance and cognitive performance during extended wakefulness. *The International Journal of Aviation Psychology*, 20(2), 144–159. (2010).
30. Bartley, S. H., & Chute, E. *Fatigue and impairment in man*. London: McGraw-Hill. (1947).
31. Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* 20:231–236. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01293-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01293-6). (1999).
32. Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1– A2A receptor heteromers. *J Neurosci* 26:. [https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3574-05.\(2006\)](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3574-05.(2006)).
33. Dall’Igna OP, Porciúncula LO, Souza DO et al. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 138:1207–1209. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705185>. (2003).
34. Machado-Filho JA, Correia AO, Montenegro ABA et al. Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. *Behav Brain Res* 264:116– 125. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.051>. (2014).
35. Augusto E, Matos M, Sevigny J et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A2A receptor functions. *J Neurosci* 33:11390–11399. [https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5817-12.\(2013\)](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5817-12.(2013))
36. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83–133. (1999).
37. Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J et al. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: A population-based CAIDE

- study. *J Alzheimer's Dis* 16:85–91. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0920>. (2009).
38. Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J et al .Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: A population- based CAIDE study. *J Alzheimer's Dis* 16:85–91. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0920>. (2009).
 39. Kumar PM, Paing SST, Li H et al.Differential effect of caffeine intake in subjects with genetic susceptibility to Parkinson's disease. *Sci Rep* 5:15492. <https://doi.org/10.1038/srep15492>. (2015).
 40. Costa MS, Botton PH, Mioranza S et al.Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience* 153:1071–1078. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.038>. (2008).
 41. Sakato, Y.The chemical constituents of tea: III. A new amide theanine. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 23, 262-7. (1949).
 42. Vuong, Q.V., Bowyer, M.C., Roach, P.D. L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (11), 1931-9. (2011).
 43. Casimir, J., Jadot, J., Renard,M. Separation and characterization of N-ethyl-L-glutamine in *Xerocomus badius* (*Boletus ladius*). *Biochimica Biophysica Acta*, 39, 462–8.(1960).
 44. Kvasnicka, F., Krátká, J. Isotachophoretic determination of theanine. (2), *Central European Journal of Chemistry*, 4 216–2.(2006).
 45. Wang, L., Xua, R., Hua, B., Lia, W., Suna, Y., Tub, Y., Zeng, X. Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 123 (4), 1259–66. (2010).
 46. Barros, L., Ferreira, IC. Phytochemicals and their effects on human health. *Curr Pharm Des* 23 (19) 873-4286.(2017).

47. Keenan, E., Jones, P. S., Priestley, C. M., Finnie, M. D. A., How much theanine in a cup of tea? Effects of tea type and method of preparation. *Food Chemistry*, 125 (2), 588-94. (2011).
48. Chen, Z. M., Wang, H., You, X., Xu, N., The chemistry of tea non-volatiles. Tea, bioactivity and therapeutic potential. Zhen Y. (ed.), Taylor & Francis Press, London, UK, 57-88. (2002).
49. Ekborg-Ott, K. H., Taylor, A., Armstrong, D. W. Varietal differences in the total and enantiomeric composition of theanine in tea. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45 (2), 353-63. (1997).
50. Chu, D.C. Green tea: Its cultivation, processing of the leaves for drinking materials, and kinds of green tea. In: *Chemistry and Applications of Green Tea*, 1–11. (1997).
51. Chatterjee, S., Chatterjee, A., Bandyopadhyay, S. K., L- Theanine: A Prospective Natural Medicine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 41 (21), 95-103. (2016).
52. Yamada, T., Terashima, T., Kwano, S., Fruno, R., Okubo, T, et al. Theanine, r-glutamylethylamide a unique amino acid in tea leaves, modulates neurotransmitter concentrations in the brain striatum interstitium in conscious rats. *Amino Acids*, 36 (1), 21-07. (2009).
53. Türközü, D., Şahinler, N. L-theanine, unique amino acid of tea, and its metabolism, health effects, and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (8), 1681-7. (2017).
54. Başkan, M. H., Aydın, M. Electron paramagnetic resonance studies of gamma-irradiated DL-alanine ethyl ester hydrochloride, L-theanine and L-glutamic acid dimethyl ester hydrochloride. *Spectrochimica Acta A Molecular Biomolecular Spectroscopy*, 112, 280-2. (2013).
55. Ding, Y., Yu, H., & Mou, S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography*, 982 (2), 237-44. (2002).

56. Narukawa, M., Toda, Y., Nakagita, T., Hayashi, Y., Misaka, T. L-theanine elicits umami taste via the T1R1 + T1R3 umami taste receptor. *Amino Acids*, 46 (6), 1583-7. (2014).
57. Juneja, R., Chu, DC., Okubo, T., Nagato, Y., Yokogoshi, H. L-theanine-a unique amino acid of green tea and its effect in humans. *Trends in Food Science and Technology*, 10 (6), 199–204. (1999).
58. Yokogoshi, H., Kato, Y., Sagesaka, YM., Takihara-Matsuura, T., Kakuda, T., Takeuchi, N. Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59 (4), 615-8. (1995).
59. Mu, W., Zhang, T., Bo, J. An overview of biological production of L-theanine. *Biotechnology Advances*, 33 (3-4), 335–42. (2015).
60. Williams, J., Kellett, J., Roach, P. D., McKune, A., Mellor, D., Thomas, J., Naumovski, N. L-Theanine as a Functional Food Additive: Its Role in Disease Prevention and Health Promotion. *Beverages*, 2 (2), 13. (2016).
61. Nobre, A. C., Rao, A., Owen, G. N. L-theanine, a natural constituent in tea, and its effect on mental state. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17 (S1), 167–8. (2008).
62. Nathan, P. J., Lu, K., Gray, M., Oliver, C. The neuropharmacology of L-theanine (N-ethyl-L-glutamine): a possible neuroprotective and cognitive enhancing agent. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 6 (2), 21-30. (2006).
63. Sumathi, T., Asha, D., Nagarajan, G., Sreenivas, A., Nivedha, R. L-theanine alleviates the neuropathological changes induced by PCB (Aroclor 1254) via inhibiting upregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress in rat brain. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 42, 99–117. (2016).
64. Miodownik, C., Maayan, R., Ratner, Y., Lerner, V., Pintov, L., Mar, M., Weizman, A., Ritsner, M. S. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and cortisol to sulfate of dehydroepiandrosterone

- molar ratio associated with clinical response to L-theanine as augmentation of antipsychotic therapy in schizophrenia and schizoaffective disorder patients. *Clin Neuropharmacol* 34 (4), 155-160. (2011).
65. Owen, G.N., Parnell, H., DeBruin, E.A., Rycroft, J.A. The combined effects of L-theanine and caffeine on cognitive performance and mood, *Neuroscience*, 11(4), 193-8. (2008).
 66. Lyon, M. R., Kapoor, M. P., Juneja, L. R. The Effects of L-Theanine (Suntheanine®) on objective sleep quality in boys with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Alternative Medicine Review*, 16 (4), 348-54. (2011).
 67. Ahdihary, R., Mandal, V. L-Theanine: A potential multifaceted natural bioactive amide as health supplement. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (9), 842-8. (2017).
 68. Yoto, A., Motoki, M., Murao, S., Yokogoshi, H. (2012). Effects of L-theanine or caffeine intake on changes in blood pressure under physical and psychological stresses. *Journal of Physiological Anthropology*, 31 (1), 28.
 69. Yokozawa, T., Dong, E. Influence of green tea and its three major components upon low-density lipoprotein oxidation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49 (5), 329- 35. (1997).
 70. Jiang, W., Gao, M., Sun, S., Bi, A., Xin, Y., Han, X., Wang, L., Yin, Z., Luo, L. Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 422 (2), 344-50. (2012).
 71. Li, G., Ye, Y., Kang, J., Yao, X., Zhang, Y., Jiang, W., Gao, M., Dai, Y., Xin, Y., Wang, Q., Yin, Z., Luo, L. L-Theanine prevents alcoholic liver injury through enhancing the antioxidant capability of hepatocytes. *Food Chemistry and Toxicology*, 50 (2), 363-72. (2012).
 72. Pérez-Vargas, J., Zarco, N., Vergara, P., Shibayama, M., Segovia, J., Tsutsumi, V., Muriel, P. L-Theanine prevents carbon tetrachloride-

- induced liver fibrosis via inhibition of nuclear factor κ B and down-regulation of transforming growth factor β and connective tissue growth factor. *Human and Experimental Toxicology*, 35 (2), 135-46. (2016).
73. Li, C., Yan, Q., Tang, S., Xiao, W., Tan, Z. Alteration of Mevalonate Pathway in Rat Splenic Lymphocytes: Possible Role in Cytokines Secretion Regulated by L-Theanine. *BioMed Research International*. 2018, 1497097. (2018).
 74. Friedman, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (1), 116-34. (2007).
 75. Friedman, M., Mackey, B. E., Kim, H. J., Lee, I. S., Lee, K. R., Lee, S. U, et al. Structure–activity relationships of tea compounds against human cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2), 243–53. (2007).
 76. Sugiyama, T., Sadzuka, Y. Theanine, a specific glutamate derivative in green tea, reduces the adverse reactions of doxorubicin by changing the glutathione level. *Cancer Letters*, 212 (2), 177-84. (2004).
 77. Bukowski, J. F., Percival, S. S. L-theanine intervention enhances human gamma delta T lymphocyte function. *Nutrition Reviews*, 66 (2), 96-102. (2008).
 78. Kurihara, S., Shibahara, S., Arisaka, H., Akiyama, Y. (2007). Enhancement of antigen-specific immunoglobulin G production in mice by co-administration of L-cystine and L-theanine. *Journal Veterinary Medicine Science*, 69 (12), 1263-70.
 79. Miyagawa, K., Hayashi, Y., Kurihara, S., Maeda, A. Co- administration of L-cystine and L-theanine enhances efficacy of influenza vaccination in elderly persons: Nutritional status- dependent immunogenicity. *Geriatrics and Gerontology International*, 8 (4), 243–50. (2008).
 80. Li, C., Tong, H., Yan, Q., Tang, S., Han, X. L-Theanine improves immunity by altering TH2/TH1 cytokine balance, brain neurotransmitters, and expression of phospholipase c in rat hearts. *Medical Science Monitor*, 22, 662–9. (2016).

81. Yokogoshi, H., Kobayashi, M., Mochizuki, M., Terashima, T. Effect of Theanine, gamma glutamylethylamide, on Brain Monoamines and Striatal Dopamine Release in Conscious Rats. *Neurochemical Research*, 23 (5), 671-77. (1998).
82. Zheng, G., Sayama, K., Okubo, T., Juneja, L.R., Oguni, I. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In Vivo*, 18 (1), 55-62. (2004).
83. Mu, W., Zhang, T., & Jiang, B. (2015). An overview of biological production of L-theanine. *Biotechnology Advances*, 33, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv. 04.004>. (2015).
84. Yokogoshi, H., Kobayashi, M., Mochizuki, M., & Terashima, T. Theanine-induced reduction of brain serotonin concentration in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 816–817. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.816> . (1998).
85. Lardner, A. L. Neurobiological effects of the green tea constituent theanine and its potential role in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Nutritional Neuroscience*, 17(4), 145–155. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000079> . (2014).
86. Hidese, S., Ota, M., Wakabayashi, C., Noda, T., Ozawa, H., Okubo, T., & Kunugi, H. Effects of chronic l-theanine administration in patients with major depressive disorder: An open-label study. *Acta Neuropsychiatr*, 2, 72–79. (2017).
87. Tamano, H., Fukura, K., Suzuki, M., Sakamoto, K., Yokogoshi, H., & Takeda, A. Advantageous effect of theanine intake on cognition. *Nutritional Neuroscience*, 17, 279–283. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000094>. (2014).
88. Wakabayashi, C., Numakawa, T., Ninomiya, M., Chiba, S., & Kunugi, H. Behavioral and molecular evidence for psychotropic effects in L-theanine. *Psychopharmacology*, 219, 1099–1109. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2440-z> . (2012).

89. Yokogoshi H, Mochizuki M, Saitoh K. Theanine-induced reduction of brain serotonin concentration in rats. *Biosci Biotech Biochem* 62: 816-817.(1998).
90. Kimura R, Murata T. Influence of alkylamides of glutamic acid and related compounds on the central nervous system IV. Effect of theanine on adenosine 3',5'- monophosphate formation in rat cerebral cortex. *Chem Pharm Bull* 80: 661-666.(1980).
91. Sakato Y. Studies on the chemical constituents of tea: part III. On a new amide theanine. *J Agr Chem Soc Japan* 23:262–267. (1950).
92. Nathan PJ, Lu K, Gray M, Oliver C. The neuropharmacology of L-theanine(N-ethyl-L-glutamine): a possible neuroprotective and cognitive enhancing agent. *J Herb Pharmacother* 6:21–30. (2006).
93. Borzelleca JF, Peters D, Hall W.A 13-week dietary toxicity and toxicokinetic study with L-theanine in rats. *Food Chem Toxicol* 44: 1158–1166.(2006)
94. Unno K, Fujitani K, Takamori N, Takabayashi F, Maeda K, Miyazaki H, Tanida N, Iguchi K, Shimoi K, Hoshino M. Theanine intake improves the shortened lifespan, cognitive dysfunction and behavioural depression that are induced by chronic psychosocial stress in mice. *Free Radic Res* 45:966–974. (2011)
95. Wakabayashi, C., Numakawa, T., Ninomiya, M., Chiba, S., & Kunugi, H. Behavioral and molecular evidence for psychotropic effects in L-theanine. *Psychopharmacology*, 219, 1099–1109. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2440-z>. (2012).
96. Yamada T, Terashima T, Wada K, Ueda S, Ito M, Okubo T, Juneja LR, Yokogoshi H. Theanine, r-glutamylethylamide, increases neurotransmission concentrations and neurotrophin mRNA levels in the brain during lactation. *Life Sci* 81:1247–1255. (2007)
97. Kaddurah-Daouk R, Yuan P, Boyle SH, Matson W, Wang Z, Zeng ZB, Zhu H, Dougherty GG, Yao JK, Chen G, Guitart X, Carlson PJ, Neumeister A, Zarate C, Krishnan RR, Manji HK, Drevets

- W.Cerebrospinal fluid metabolome in mood disorders- remission state has a unique metabolic profile. *Sci Rep* 2:667.(2012).
98. Hashimoto K, Sawa A, Iyo M.Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 62:1310–1316.(2007).
 99. Hermens DF, Chitty KM, Lee RS, Tickell A, Haber PS, Naismith SL, Hickie IB, Lagopoulos J.Hippocampal glutamate is increased and associated with risky drinking in young adults with major depression. *J Affect Disord* 186:95–98.(2015).
 100. Zhou Y, Danbolt NC.Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)* 121:799–817.(2014).
 101. Ota M, Wakabayashi C, Sato N, Hori H, Hattori K, Teraishi T, Ozawa H, Okubo T, Kunugi H.Effect of L-theanine on glutamatergic function in patients with schizophrenia. *Acta Neuropsychiatr* 27: 291–296. (2015).
 102. Williams M, Jarvis M F. Adenosine antagonists as potential therapeutic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 29:4333-441.(1988).
 103. Deckert J, Gleiter C H. Adenosinergic psychopharmaceuticals. *TIPS*, 10: 99-100. (1989).
 104. Goodman Gilman A, Goodman L S,Rall T W, Murad F(eds).The pharmacological basis of therapeutics. Macmillian, New York. (1985).
 105. Conners C K. The acute effects of caffeine on evoked response, vigilance and activity levels of hyperkinetic children. *J Abnorm Child Psychol* 7.145-151. (1979).
 106. Philips E, Newsholme E A. Maximum activities, properties and distribution of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in rat and human brain. *J Neurochem* 33:553-558.(1979).
 107. Van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine regulates, via two different types of receptors the accumulation of cyclicAMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33:999-1005.(1979).

108. Schubert P, Lee K, West M, Deadwyler S, Lynch G. Stimulation-dependent release of (H)-adenosine derivatives from central axon terminals to target neurons. *Nature* 260; 541-542. (1976).
109. Silinsky E M, Hubbard J I. Release of ATP from rat motor nerve terminals. *Nature* 243: 404-405.(1973).
110. Hagberg H, Andersson P, Lazarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during ischemia. *J Neurochem* 49:227-23. (1987)
111. Dechert J, Morgan P F, Marangos P J. Adenosine uptake heterogeneity in the mammalian CNS? Uptake inhibitors as probes and potential neuropharmaceuticals. *Life Sci* 42: 1331-1345. (1988).
112. Arch J R S, Newsholme E A. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem J* 174: 965-977.(1978).
113. Eccles JC, Schmidt R & Willis WD. Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *J Physiol* 168, 500–530. (1963).
114. Stell BM, Rostaing P, Triller A & Marty A. Activation of presynaptic GABAA receptors induces glutamate release from parallel fiber synapses. *J Neurosci* 27, 9022–9031. (2007).
115. Casado M, Dieudonne S & Ascher P. Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors at the parallel fiber–Purkinje cell synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11593–11597. (2000).
116. Shin JH & Linden DJ. An NMDA receptor/nitric oxide cascade is involved in cerebellar LTD but is not localized to the parallel fiber terminal. *J Neurophysiol* 94, 4281–4289. (2005).
117. Dé sarmé nien M, Santangelo F, Occhipinti G, Schlichter R, Loeffler JP, Desaulles E, Demeneix BA & Feltz P. Electrophysiological study of GABAA versus GABAB receptors on excitation-secretion coupling. *Adv Biochem Psychopharmacol* 37, 93–105. (1983).

118. Ruiz A, Fabian-Fine R, Scott R, Walker MC, Rusakov DA & Kullmann DM. GABAA receptors at hippocampal mossy fibers. *Neuron* 39, 961–973. (2003).
119. Cabezas C, Irinopoulou T, Gauvain G & Poncer JC. Presynaptic but not postsynaptic GABA signaling at unitary mossy fiber synapses. *J Neurosci* 32, 11835–11840. (2012).
120. Price GD & Trussell LO. Estimate of the chloride concentration in a central glutamatergic terminal: a gramicidin perforated-patch study on the calyx of Held. *J Neurosci* 26, 11432–11436. (2006).
121. Trigo FF, Marty A & Stell BM. Axonal GABAA receptors. *Eur J Neurosci* 28, 841–848. (2008).
122. Mintz IM & Bean BP. GABAB receptor inhibition of P-type Ca^{2+} channels in central neurons. *Neuron* 10, 889–898. (1993).
123. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, et al. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*, 54(2), 247-264. (2002).
124. Malcangio M. GABAB receptors and pain. *Neuropharmacology*, 136(Part A), 102-105. (2018).
125. Russell IJ, Holman AJ, Swick TJ, Alvarez-Horine S, Wang YG, Guinta D, et al. Sodium oxybate reduces pain, fatigue, and sleep disturbance and improves functionality in fibromyalgia: results from a 14-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pain*, 152(5), 1007-1017. (2011).
126. Spaeth M, Bennett RM, Benson BA, Wang YG, Lai C, Choy EH. Sodium oxybate therapy provides multidimensional improvement in fibromyalgia: results of an international phase 3 trial. *Ann Rheum Dis*, 71(6), 935-942. (2012).
127. Chin RL, Sporer KA, Cullison B, Dyer JE, Wu TD. Clinical course of γ -hydroxybutyrate overdose. *Ann Emerg Med*, 31(6), 716-722. (1998).
128. Dario A, Tomei G. A benefit-risk assessment of baclofen in severe spinal spasticity. *Drug Saf*, 27(11), 799-818. (2004).

129. Ong J, Kerr DI. Clinical potential of GABAB receptor modulators. *CNS Drug Rev*, 11(3), 317-334.(2005).
130. Engers DW, Lindsley CW. Allosteric modulation of Class C GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Drug Discov Today Technol*, 10(2), e269-276.(2013).
131. Price GD & Trussell LO. Estimate of the chloride concentration in a central glutamatergic terminal: a gramicidin perforated-patch study on the calyx of Held. *J Neurosci* 26, 11432–11436. (2006).
132. Trigo FF, Marty A & Stell BM. Axonal GABAA receptors. *Eur J Neurosci* 28, 841–848.(2008).
133. Kerr, D.I.B. and Ong, J.,. GABAB receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 67(2), pp.187-246.(1995).
134. Howell and Jason R. Pugh Biphasic modulation of parallel fibre synaptic transmission by co-activation of presynaptic GABAA and GABAB receptors in mice. *J Physiol*. 1;594(13):3651-66. (2016).
135. Aylin Hatice Yamac, 1 Omer Uysal, 2 Ziya Ismailoglu, 1 Mehmet Ertürk, 3 Mert Celikten, 4 Ahmet Bacaksiz, 1 and Ulkan Kilic. Premature Myocardial Infarction: Genetic Variations in SIRT1 Affect Disease Susceptibility. *Cardiol Res Pract*. 2019; 2019: 8921806. (2019).
136. Chouvarda I, Mendez MO, Rosso V, Bianchi AM, Parrino L, Grassi A, Terzano MG, Cerutti S, Maglaveras N. Cyclic alternating patterns in normal sleep and insomnia: structure and content differences. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*;20(5):642-52. (2012).
137. Young, T. B. Epidemiology of daytime sleepiness: definitions, symptomatology, and prevalence. *Journal of Clinical Psychiatry*, 65(16), 12-6.(2004).
138. Hikmet.Y., Uyku Bozuklukları Epidemiyolojisi: Epilepsi ve Uyku Bozuklukları Birimi. #297. (2007).
139. Takami KAKUDA, Ayumu NOZAWA, Tomonori UNNO, Noritaka OKAMURA & Osamu OKAI Inhibiting Effects of Theanine on

- Caffeine Stimulation Evaluated by EEG in the Rat, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64:2, 287-293, (2000).
140. Jang, H. S., Jung, J. Y., Jang, I. S., Jang, K. H., Kim, S. H., Ha, J. H., ... & Lee, M. G. (2012). L-theanine partially counteracts caffeine-induced sleep disturbances in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 101(2), 217-221.
 141. Qian Liu, Huiying Duan, Jinling Luan, Kazumi Yagasaki, and Guoying Zhang. Effects of theanine on growth of human lung cancer and leukemia cells as well as migration and invasion of human lung cancer cells. *Cytotechnology* 59(3): 211–217.(2009).
 142. <https://www.jax.org/strain/019120>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2020
 143. Kobayashi, K., Nagato, Y., Aoi, N., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T., & Sugimoto, S. Effects of L-theanine on the release of alpha-brain waves in human volunteers. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan (Japan)*. (1998).
 144. Landolt, H. P. Genotype-dependent differences in sleep, vigilance, and response to stimulants. *Current Pharmaceutical Design*, 14(32), 3396–3407. (2008a).
 145. Zwyzghuizen-Doorenbos A, Roehrs TA.Effects of caffeine on alertness. *Psychopharmacology* 100:36, (1990).
 146. Ribeiro, J. A., & Sebastiao, A. M. Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(Suppl. 1), 3–15. (2010).
 147. Griffiths RR, Woodsen PP. Caffeine physical dependence :a review of human and laboratory animal studies. *Psychopharmacology*. 94:437,(1988).
 148. Jo, Kyungae, Hyung Joo Suh, and Hyeon-Son Choi. "Polygonatum sibiricum rhizome promotes sleep by regulating non-rapid eye movement and GABAergic/serotonergic receptors in rodent models." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 105,167-175. (2018).
 149. J.D. Shepherd, Memory, plasticity and sleep - a role for calcium permeable AMPA receptors? *Front. Mol. Neurosci.* 5-49.(2012).

150. C. Chen, M. Hardy, J. Zhang, G.J. LaHoste, N.G. Bazan, Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (2) ,435–440. (2006).
151. Spriet LL, Gibala MJ. Nutritional strategies to influence adaptations of training. *Journal of sports sciences*; 22(1):127-41. (2004).



10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
29/08/2019	57		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Farklı Teanin Formlarının farelerde Uyku, Rahatlama ve GABAerjik/ Serotonerjik Reseptörler Üzerine Etkisi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Havakhanum	Soyadı	Mamedova
Doğum Yeri	Sagarejo/ Gürcistan	Doğum Tarihi	13.09.1991
Uyruğu	Gürcistan	TC Kimlik No	
E-mail	memmedovahavva@hotmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		-
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Lisans	Fatih Üniversitesi	2015
Lise	Ordubad Qız Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1.			
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
YÖKDİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi
MATLAB	Orta
Java	Orta