

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN SEREBELLAR HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KAFEİNLE
OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTEDE VOLTAJ BAĞIMLI
KALSİYUM KANAL BLOKERİ NİMODİPİNİN ROLÜ

Ecz. Songül TUNA

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Akçahan GEPDİREMEN

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum-1998

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	i
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kafeinin Kimyasal Yapısı	3
2.2. Kafein Elde Edilen Droglar	4
2.3. Konuyla İlgili Yapılan Çalışmalar	6
2.4. Kalsiyum Kanal Blokerleri	8
2.5. Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Organ Sistemlerine Etkileri	9
2.5.1- Düz Kas	9
2.5.2- Kalp Kası	10
2.5.3- İskelet Kası	10
2.6. Kalsiyum Kanal Blokeri; Nimodipin	10
2.7. Kafeinin Etki Mekanizması	11
2.8. Kafeinin Metabolizması	11
2.9. Kafeinin Farmakolojik Etkileri	12
2.9.1. Düz Kas	12
2.9.2. Santral Sinir Sistemi	13
2.9.3. Kardiyovasküler Sistem	14
2.9.4. İskelet Kası	15
2.9.5. Diüretik Etki	15
2.9.6. Diğer Etkileri	15
2.10. Kafeinin Terapötik Kullanımı	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Nöron Hücre Kültürü	17

3.2. Deneyde Kullanılan Mediumlar Ve İçindekiler	18
3.3. Serebellar Hücre Kültürlerinin Hazırlanışı	20
3.4. Nörotoksisite Deney Prosedürü	20
3.5. Serebellar Granüler Nöron Kültürlerinin Mikroskopik Görüntülerine Ait Şekiller	22
4- BULGULAR	23
4.1. Sıçan Serebellar Granüler Hücre Kültürlerinde Kafeinin Doz-Cevap Eğrisine Ait Şekil	24
4.2. Sıçan Serebellar Hücre Kültürlerinde Kafein İle İndüklenen Nörotoksisiteye Nimodipinin Etkisini Gösteren Şekil	25
4.3. Serebellar Granüler Hücre Kültürlerinde Total Popülasyon İçerisinde Ölü Hücre Yüzdelerinin Ortalama±Standart Sapma Değerleri Ve Bu Değerlere Nimodipinin Etkilerini Gösteren Tablo	26
TARTIŞMA	27
KAYNAKLAR	31

TEŞEKKÜR

Bütün tez çalıŐması sũresince, emeğini ve kıymetli zamanını esirgemeyerek bũyũk bir ȳzveri ile ilgilenen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Akçahan Gepdiremen'e teŐekkũrũ borç bilirim.

Farmakoloji Anabilim Dalı ȳđretim ũyelerinden Prof. Dr. Z. Nur Banođlu'na, Doç. Dr. Fatma Gȳcer'e ve Farmakoloji Dalı ȳđretim ũyeleri ve elemanlarına da teŐekkũr ederim.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ȳđretim ũyelerinden Prof. Dr. İrfan Batat'a ve Merhum Yrd. Doç. Dr. Sinan Sȳnmez'e, Yrd.Doç.Dr. Mevlũt İkbale laboratuvarında çalıŐma imkanı vermeleri ve yardımlarından dolayı teŐekkũr ederim.

ÖZET

Metilksantinler (teofilin, teobromin ve kafein), merkezi sinir sistemi stimulanı olarak yaygın biçimde kullanılırlar. Kafein yeni doğanların apne tedavisinde kullanılır. Kafeinin plazma terapötik konsantrasyonu 110 μ M'dir. Kafein kan-beyin bariyerini kolayca geçer. Nöronlarda oksijen tüketimini artırır ve hücre ölümüne sebebiyet verir. Bu çalışmada serebellum hücre kültürü elde etmek için 4-7 günlük sıçan yavruları kullanıldı. Kafein 50, 150, 250 ve 350 μ M konsantrasyonlarda kullanıldı. En toksik doz 350 μ M olarak tespit edildi. Kontrol grubunda ölü hücre sayısı 0.9 ± 0.63 iken, 50 μ M kafein için 1.1 ± 0.39 ve 150 μ M için 0.89 ± 0.47 (her ikisi için $p > 0.05$) olarak tespit edildi. 250 μ M kafein için ölü hücre konsantrasyonları 3.84 ± 0.8 ($p:0.024$) ve 350 μ M için 6.2 ± 0.86 ($p:0.001$) olarak bulundu. Kafeinin nörotoksik etkisinin ortaya çıkmasında, voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının rolünü test edebilmek için 350 μ M kafeinden 45 dakika önce ve sonra 100 ve 200 μ M dozlarındaki nimodipin test edildi. Kafeinden sonra kullanılan nimodipinin her iki dozu nörotoksisiteyi bloke etmede etkisiz bulundu. Diğer taraftan kafeinden 45 dakika önce kültür içerisine eklenen 100 μ M nimodipin, ölü hücre konsantrasyonlarını 0.89 ± 0.23 ($p:0.000$) ve 200 μ M nimodipin 2.35 ± 0.96 ($p:0.000$) olarak değiştirdi. İskemik durumlarda kullanılan nimodipinin yararlılığı doza bağımlı olup, benzer veriler kafeinle yapılan bu nörotoksik çalışmada açıkça ortaya konulmuştur. Sonuç olarak yenidoğan apnelerinde solunum stimulanı olarak kullanılan kafeinin yüksek ve tekrarlanan dozlarında ortaya çıkan nörotoksik yan etkilerini önlemek için beraberinde L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokerlerinden biri olan nimodipin kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Kafein, metilksantinler, nimodipin, nörotoksisite, serebellum, hücre kültürü

SUMMARY

Methylxanthines (theophylline, theobromine and caffeine) are widely used as central nervous system stimulants and caffeine is used in the treatment of apnea in newborns. Plasma therapeutic concentration of caffeine is 110 μM . It diffuses through blood brain barrier easily, increases oxygen consumption in neurones and thus leads to cell death. In the present study, 4-7 day-old rat pups were used to obtain cerebellar granular cell cultures. Caffeine was used in 50, 150, 250 and 350 μM concentrations and the most toxic dose for it was found to be 350 μM . Death cell scores were 0.9 ± 0.63 for control, 1.1 ± 0.39 for 50 μM , 0.89 ± 0.47 for 150 μM ($p > 0.05$ for both), 3.84 ± 0.8 for 250 μM ($p: 0.024$) and 6.2 ± 0.86 for 350 μM ($p: 0.001$) caffeine concentrations. The role of voltage dependent calcium channels in caffeine induced neurotoxicity was tested with the doses of 100 and 200 μM nimodipine 45 minutes before or after the addition of 350 μM caffeine to the cell culture. Both doses of nimodipine following the caffeine administration were found to be ineffective to block neurotoxicity. On the other hand, 45 minutes prior to addition of caffeine to the culture, death cell score was reduced to 0.89 ± 0.23 ($p: 0.000$) with 100 μM nimodipine and 2.35 ± 0.96 ($p: 0.000$) with 200 μM nimodipine administration into the cultures. The efficiency of nimodipine used in ischemic states is related to dosage and this fact has been clearly confirmed by this neurotoxic experiment in caffeine-induced neuron death. In the light of these results it has been concluded that nimodipine, one of the L-type voltage-dependent calcium channel blockers, can be used in order to prevent neurotoxic side effects seen in high and repeated doses of caffeine used as a respiratory stimulant in newborn apneas.

Key words: Caffeine, methylxanthines, nimodipine, neurotoxicity, cerebellum, cell culture.

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Kafein, metilksantin türevi olan bir alkaloiddir. Beyin sapındaki solunum merkezini güçlü şekilde uyarır. Toksik tesirlerini genellikle 50 µg/L plazma düzeyinin üstünde gösterir. Normal deneklerde yaklaşık 3 mg/kg kafeinin solunumu uyarmadığı fakat solunum deprese edilmiş ise daha ufak dozdaki kafeinin dahi uyarıcı etki yapabildiği bildirilmiştir.¹

Dokularda ATP'nin yıkılması sonucu oluşan 5'-adenozin monofosfat (AMP)'dan; aşırı stimulasyon veya hipoksi gibi nedenlerle ATP'ye dönüşmemesi sonucu, adenzin oluşur. Adenzin direkt bronkokonstriktör etki yapar. Kafein ise adenzin antagonisti olan bir maddedir.¹

Son 25 yıl içinde periferde ve beyinde, bir nükleozid olan adenzinin, adenzin reseptörü olması muhtemel yüksek afiniteli bağlanma yerlerinin varlığı ve adenilat siklaz ile kenetlenmiş oldukları çeşitli beyin bölgelerinde saptanmıştır. Santral Sinir Sisteminde adenzin'in nöronlar üzerinde yaptığı depresan etkiye aracılık eden hipotetik ektoselüler adenzin reseptörleri, hipokampusta A1 tipi reseptörler ve serebral kortekste A2 veya başka tip reseptörlerdir. Nöron membranında kalsiyum kanalları ile kenetli A3 tipi adenzin reseptörlerinin varlığını gösteren kanıtlar da elde edilmiştir. Adenzin ve analogları kalsiyum influksunu inhibe ederler.¹

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) orta dereceli bir stimulan ve psikoaktif ilaç olarak yaygın biçimde kullanılır. Kafein, premature yeni doğanlarda apne başlangıcında yaygın olarak kullanılır.²

Kafein; norepinefrin salgısını uyarır ve beynin birçok bölgesinde nöron aktivitesini artırır.³ Nöron düzeyindeki etkisi (özellikle hipokampusun piramidal hücreleri gibi) membranın kalsiyum iyonuna permeabilitesinin artmasına ya da potasyum iyonun permeabilitesinin inhibisyonuna bağlıdır.¹

Metilksantinler; hücre içi kalsiyum konsantrasyonu üzerine hücre membran hiperpolarizasyonu yapmak veya adenzin reseptörlerini antagonize etmek suretiyle direkt veya indirekt etkiler oluşturur. Kafeinin çoğu farmakolojik etkileri ise adenzin reseptörlerinin antagonize edilmesiyle ortaya çıkar.³

Klinik yan tesirlerinin ve nörolojik nöbetlerin bulunmadığı ve önerilen kafein plazma terapötik konsantrasyonu 80-110 µM'dir.^{2,4,5}

Genetik olarak absans nöbetlerine sahip olan mutant farelerde en az yedi gün nöbet sıklığı tesbit edildikten sonra kafein (5, 10, 15 mg/kg) intraperitoneal uygulandığında 10 mg ve 15 mg için p: 0.001'den daha az olduğu ve nöbetlerin sıklığını azalttığı görülmüştür.⁶

Kafeinin yüksek dozlarında fokal ve yaygın konvülsiyonlar görülür. Kafeinin kan konsantrasyonu, terapötik kabul edilen dozun %50 yukarisına çıktığı kişilerde antikonvülsan ajanlara dirençli olabilen nöbetler oluşur.³

Kafein doza bağımlı olarak D₁ ve D₂ reseptörleri aracılığı ile sıçanlardaki lokomotor aktiviteyi arttırmaktadır.⁷

Kafein kan-beyin bariyerini kolayca geçer⁸, serebral kan akımını azaltır.⁹ Yenidoğanlarda oksijen tüketimini artırır.¹⁰ Solunum merkezinin karbondioksit duyarlılığını artırır.¹ Glial hücre kültürlerinde, selüler membran bileşiminde büyük önemi olan kolesterol sentezini inhibe eder,¹¹ sonuç olarak myelinizasyonda anahtar bir enzim olan serebrosid sülfotransferaz aktivitesini azaltır.¹²

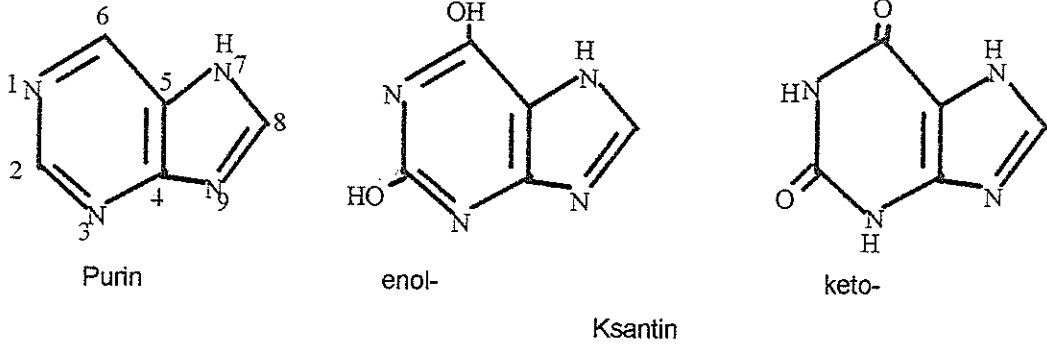
Glial hücre kültürlerinde kolesterol sentezini inhibe eden kafein sinir dejenerasyonunda, bozucu bir etki yapıyor olabilir.¹³

Ksantinlerle oluşan nöron dejenerasyonu ve hücre ölümünde c-AMP fosfodiesteraz enzimi inhibisyonu ve hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesinin rolü olduğu iddia edilir.¹⁴ Bu çalışmada sıçan serebellar hücre kültürlerinde kafeinin oluşturduğu nörotoksisiteye, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının ve ekstrasellüler kalsiyumun rolü incelenildi.

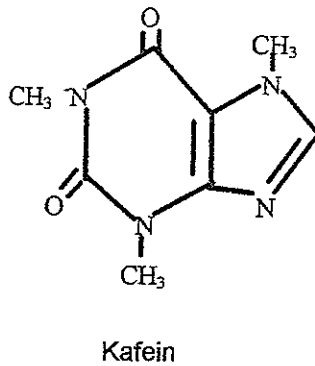
2- GENEL BİLGİLER

2.1. Kafeinin Kimyasal Yapısı

Değişik familyalara mensup bazı bitkilerde ve bunlardan elde edilen droglarda purin iskeleti taşıyan alkaloidler bulunmaktadır. Purin halkasında 2. ve 6. karbonlarda birer OH^- grubu bulunursa bu maddeye ksantin adı verilir. Ksantinin keto şekli 1. ve 3. konumundaki azotların metillenmesine olanak verir.



Ksantinde 1.3. ve 7. pozisyonundaki azotlara birer metil bağlanırsa 1, 3, 7-trimetilksantin, yani kafein alkaloidi oluşur; 1, 3- dimetilksantin; teofilin ve 3, 7-dimetilksantin; teobromin adını almaktadır.



Bu alkaloidler santral sinir sistemi stimulanı olduklarından hem psişik hem de müsküler olarak uyarıcı bir etki gösterirler. Bu nedenle öfori oluşturur, zihinsel canlılığı artırırlar. Fazla kullanıldıkları takdirde uykusuzluk ve sinir bozukluğu ile kendini gösteren ve "kafeizm" adı verilen bir entoksikasyon görülür. Bu alkaloidler

dolaşımı arttırdıklarından diüretik etki gösterirler ve kalp stimulanı olarak da kullanılırlar.

Purin alkaloidleri arasında suda en fazla çözüneni kafein'dir. Kafein 80 birim, teofilin 120 birim, teobromin ise 3280 birim suda çözünür. Erişlik, 1. konumdaki azotun süstitüe olmasıyla ve süstitüe sayısının çoğalmasıyla artar. Sudaki çözünürlük, etkinin de artmasına neden olur.

Teofilin, bronşiyal astmada, akciğer anfizeminde, bronkospazmda ve anjina pektoris'de kullanılır. Teofiline, etilen diamin katılması ile çözünürlüğü artar. Böylece elde edilen yarısentetik türev (aminofilin) den enjektabl preparatlar hazırlanır.¹⁵

2.2. Kafein Elde Edilen Droglar

SEMEN COFFEA, Kahve

Vatanı Habeşistan olan coffea arabica ile vatanı Tropik Afrika olan Coffea canefora (Rubiaceae) bitkilerinin çeşitli şekillerinden elde edilen bir tohumdur.

Kahve içerisinde % 1-2.5 kadar kafein bulunmaktadır. Bunun yanında az miktarda teobromin ve ksantin de bulunur. Kahvede bu alkaloidler, klorojenik asit adı verilen ve bir çeşit tanen sayılan bir asitle tuz oluşturmuş şekilde bulunur. Klorojenik asit, yan zinciri doymamış bir fenolik asit olan kafeik asit ile polihidroksi asit olan kinik asidin esterleşmesi sonucu meydana gelmiştir.

Kahve, bazı kodekslerde aromatan bir madde olarak kayıtlıdır ve eczacılıkta da bu amaçla kullanılmaktadır. Kahve tohumlarından sıcak içki hazırlandığı bilinmektedir. Bir fincan kahvede 10 santigram kafein bulunduğu hesaplanmıştır. Bu nedenle, içki olarak kullanılan kahve de stimulan ve öforizan bir etki göstermektedir.

FOLIA THEAE, Çay

Thea sinensis (Camelia thea) (Theaceae) bitkisinin dal uçlarındaki yapraklarıdır. Bitkinin vatanı Hindistan'ın kuzey, Çin'in de güney kısımlarıdır.

Çay yapraklarında % 1.5-4 kadar kafein, az miktarda da teofilin ve teobromin vardır. Taşıdığı alkaloidlerden dolayı belirgin diüretik etkisi bulunur. Eczacılıkta haricen kolir olarak, astrenjan etkisinden dolayı da göz banyolarında

kullanılır. Çay yapraklarının eczacılıkta asıl kullanılışı kafein elde etmek sebebiyledir. İlaç hammaddesi olarak oldukça fazla kullanılan kafein, ya sentetik olarak, ya da çay yapraklarından elde edilmektedir.

Uzun süre ve fazla miktarda çay kullananlarda teizm adı verilen bir çeşit kronik entoksikasyon görülür. Teizm; uykusuzluk, iştahsızlık, zayıflama ve sinirlilik halleri ile kendini gösteren bir hastalıktır.

SEMEN COLAE, Cola

Cola (Sterculiaceae) türlerinin kotiledonlarıdır. Afrika'da, Gine körfezi kıyılarında, Kongo'da, Brezilya'da ve Java'da kültürü yapılan bu bitkinin kestane büyüklüğünde tohumları vardır.

Drogun etken maddeleri kafein ve teobromin'dir. Eczacılıkta kullanılan semen Colae'de total alkaloid miktarı en az %1.5 olmalıdır. Cola vera kotiledonları %2 kadar alkaloid içerdiği halde, Cola acuminata kotiledonları ancak %1 kadar alkaloid taşır. Bu bakımdan Cola acuminatanın kotiledonları eczacılıkta değil, gıda sanayiinde kullanılmaktadır.

PASTA GUARANA

Brezilya'da yetişen Paulinia cupana (Sapindaceae) bitkisinin tohumlarından hazırlanan bir drogtur. Bu drog, % 3-5 kadar kafein taşır. Kafein miktarı en yüksek olan droglardan biridir.

SEMEN CACAO, kakao tohumu

Meksika ve Brezilya'da yetişmekte olan Theobroma cacao (Sterculiaceae) bitkisinin kavrulmuş tohumlarıdır.

Drog, %1.5-2 kadar teobromin ve %0.2 kadar kafein içerir. Kafein miktarı az olduğundan buraya kadar saydığımız droglara nazaran daha az etkilidir. Bundan, teobromin elde edilmesinde yararlanır.¹⁵

2.3. Konuyla İlgili Yapılan Çalışmalar:

Kafeinin konvülsif doz 50 (CD50) değeri 3 μ M olarak tesbit edilmiştir. Hipokampusta yapılan bu çalışmada kainik asitle oluşturulan "nöronal deşarjlar" teofilin ve kafeinle güçlenmektedir. Ancak bu etki hipokampusun CA3 bölgesinde ortaya çıkarken CA1'de görülmemektedir.¹⁶

Bir adenozin agonisti olan L-fenil-isopropiladenozin (L-PIA) (0.05 μ M konsantrasyonda) kafeinin epileptik etkilerini %50 oranında inhibe etmektedir. Aynı çalışmada bir kalsiyum kanal blokörü verapamil (0.05-0.2 μ M)ve nifedipin (0.05-0.1 μ M) kafeinin epileptik aktivitesine etkisiz bulunmuştur.¹⁷

Maksimal elektroşok ile indüklenen konvülsiyonlarda aminofilin ve kafeinin non-konvülsif dozlarının kullanılması, antiepileptik ilaçların etkinliğini azalttığı, diğer taraftan enprofilin (3-propylxanthine), diprofilin ve pentoksifilin, antiepileptik ilaçların maksimal elektroşokla uyarılmış konvülsiyonlar üzerine etkilerini değiştirmemekte veya güçlendirmektedir. Sadece pentoksifilin, difenilhidantoinin protektif etkisini azaltmıştır.¹⁸

Kobay hipokampus kesitlerindeki çalışmada; kafein, periyodik paroksizmal depolarizasyonlara yol açarken, ekstraselüler serbest kalsiyum miktarındaki azalmanın bu olaya eşlik ettiği saptanmış, organik kalsiyum antagonistlerinden verapamil ve flunarizinin bu depolarizasyonları baskıladıkları tespit edildiğinden, transmembranal kalsiyum akımlarının kafeinle oluşturulan bu depolarizasyonlarda önemli bir yeri olduğu iddia edilmiştir.¹⁹

Bir başka çalışmada ise metil aspartat (NMDA) ile oluşturulan klonik nöbetler ve mortalite, uzun süreli kafein tedavisini takiben anlamlı şekilde azaltılabilmektedir. Bu etkinin hipokampustaki adenozin A1 reseptör dansitesi ile herhangi bir bağlantısı tesbit edilememiştir.²⁰

Hipokampus CA3 nöronlarındaki adenozin reseptörleri ile yapılan çalışmada, çeşitli ksantin türevlerinin epileptojenik potansiyelinin, bu bölgedeki inhibitör A1 adenozin reseptör alt tipine afinitesi ile çok güçlü bir korelasyon içerisinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada ksantinlerle indüklenen epileptik aktivitenin, Adenozin A1 reseptör agonisti olan adenozin ve R-PIA (R-fenil-iso-propiladenozin) ile reversibl olarak baskılanabildiği tespit edilmiştir.²¹

İzole sıçan feokromositoma PC12 hücrelerinde yapılan bir çalışmada kafeinin etkisinin sarkoplazmik retikulumda bulunan ryanodine duyarlı kalsiyum depolarından kalsiyum saliverilmesi ile direkt ilgili olduğu belirtilmektedir.²²

Bir diğer çalışmada bir GABA/BDZ reseptör antagonisti olan bikukulinin (0.5-1.0 mg/kg, i.p), kafeinle oluşturulan lokomotor aktivite artışını potansiyalize ettiği saptanmıştır. Kafeinle oluşturulan bu lokomotor aktive artışının GABA agonisti musimol, dopamin antagonisti haloperidol, muskarinik reseptör blokeri atropin, asetilkolinesteraz inhibitörü fizostigmin ve nikotinik reseptör agonisti olan nikotin tarafından azaltıldığı tesbit edilmiştir. Ancak dopamin agonisti olan L-DOPA+karbidopa kombinasyonunun kafeinle oluşturulan lokomotor aktivite artışını potansiyalize ettiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, kafeinin lokomotor aktivite artışını adenosin reseptörleri üzerindeki antagonistik etkisi, dopaminerjik sistemin aktive edilmesi ve GABA'eriik ve kolinerjik sistemin aktivitelerini azaltması sonucu ortaya koyduğu sonucuna varılmıştır.²³

Kafein, sıçanlardaki epileptik nöbet eşiğini; pentilentetrazol (GABA/BDZ reseptör antagonisti), pikrotoksin (GABA-BDZ reseptör antagonisti) ve kainik asitten (NMDA reseptör agonisti) daha potent bir şekilde düşürmektedir.²⁴

Yedi günlük sıçanlarda 100 dakika süreli ünilateral karotit bağlanması ve %7.7 O₂'e maruz bırakıldıktan 2 hafta sonra beyinde oluşan hasar tesbit edilmiş ve bu hasara düşük (0.3 g/L) ve yüksek (0.8 g/L) doz kafeinin etkileri incelendiğinde, düşük doz kafeinin bu hasarı %30 civarında azalttığı ancak yüksek doz kafeinin bu hasara istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik oluşturmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada adenosin reseptörlerinde A1mRNA ve A2 α mRNA'ların ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır.²⁵

Ortamda kafein varlığında sıçandaki çeşitli hücrelerde internal serbest kalsiyum konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur. Çizgili kaslarda yapılan detaylı bir çalışmada, bu hücrelerde kalsiyuma duyarlılık artmakta, sarkoplasmik retikulumdaki kalsiyum pompasının işlevi yavaşlamakta, ancak sarkoplazmik retikulumun kalsiyuma permeabilitesi artmaktadır.²⁶

Ayrıca patch-clamp tekniği kullanılarak civciv nöronlarında yapılan çalışmalarda rektifiye potasyum akımlarını 0.1-10 μ M konsantrasyonda kafein bloke etmektedir. Kafeinin bu etkisi, santral sinir sistemi nöronlarından başka

sempatik sistem nöronları, pineal bez hücreleri ve sıçan anterior hipofiz hücrelerinde de gözlenmiştir. Kafeinin bu etkisi diğer bir ksantin türevi olan 3-isobutil-1-metilksantin (IBMX) ile beraber kullanımında aditif bulunmuştur. Potasyum akımındaki bu direkt inhibisyon, intrasellüler serbest kalsiyum oranında muhtemelen sekonder etkiler de oluşturmaktadır.²⁷

Genetik olarak epilepsiye yatkınlığı olan sıçanlarda yapılan bir çalışmada konvülsiyon potansiyeli en yüksek olan ksantin türevleri 3-isobutil-1-metilksantin, teofilin ve kafein olarak bulunurken, 8-kloroteofilin ve teobrominin bu etkileri çok düşük tespit edilmiş, enprofilin, etofilin, diprofilin ve doksofilinin ekimolar dozlarında herhangi bir epileptik cevaba rastlanmamıştır. Aynı çalışmada ksantinlerin epileptik potansiyelleri ile lipofilik özellikleri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.²⁸

2.4. Kalsiyum Kanal Blokerleri:

Normal şartlar altında kalsiyumun ekstraselüler konsantrasyonu 10^{-3} milimolar iken, intrasellüler konsantrasyonu 10^{-7} milimolardan daha azdır. Sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonu; reseptör kanallarının, voltaj bağımlı kanalların ve iyonik pompaların aktivitesi vasıtasıyla artırılır. Ayrıca hücre içi depolardan salınabilir.

2 tip voltaj bağımlı kalsiyum kanalı vardır:

1-) Düşük voltaj bağımlı kanallar: T-tipi kanallar olarak ifade edilir.

2-) Yüksek voltaj bağımlı kanallar: L-tipi, N-tipi ve P-tipi olmak üzere alt gruplara ayrılırlar.

Nörotransmitter ve nörohormon salıverilmesi genellikle hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışıyla beraber görülür. Ancak Schwann hücrelerinden asetilkolin ve juxtaglomerular aparatustan renin salıverilmesi, hücre içi kalsiyum seviyesinin düşmesiyle birlikte izlenir.²⁹

Endojen depolarda kalsiyum iyonu içeren iskelet kaslarının aksine, hem kalp kas hücreleri, hem de vasküler düz kaslarda kasılma fonksiyonları için hücre dışı kalsiyuma ihtiyaç vardır. Bu yüzden kalp kası ve vasküler düz kasların patolojileri olan; hipertansiyon, Raynaud, anjina ve migren gibi durumlar, kalsiyum antagonistleri veya kalsiyum kanal blokerleri tarafından tedavi edilmeye çalışılmaktadırlar.

Anokside olduğu gibi, kalsiyum homeostazisi bozulunca, plazma membranından kalsiyumun kontrolsüz akışı veya hücre içi bağlı durumdaki kalsiyumun yoğun bir şekilde salıverilmesi ile hücrenin canlılığı tehdit edilmektedir.

Kalsiyum Kanal Blokerleri:

Fenilalkilaminler= Verapamil, gallopamil, anipamil, desmetoksi- verapamil, emopamil, falipamil ve ronipamil.

Dihidropirimidinler= nifedipin, nicardipin, niludipin, nimodipin, ryosidine, amlodipin, azodipin, felodipin, oksodipin, irodipin dazodipin, felodipin

Benzotiazepinler= diltiazem

Dihidropirimidinler, plazma membranı üzerinden faaliyet gösterirler. Sarkoplazmik retikulum üzerinden etki gösterenler inositol 1,4,5 trifosfat ve kafeindir. Benzotiazepinler ise ionoforlar üzerinden faaliyet gösterir.

Kalsiyum kanal blokerlerinden flunarizin, migren profilaksisinde en etkili ilaç olarak bulunmuştur. Beyin hücrelerini hipoksiye karşı korumada ve serebrovasküler düz kas hücre kasılmasını önlemede yararlı olduğu da görülmüştür. Kalsiyum kanal blokerleri, ekstrapiramidal semptomlara ve şiddetli Parkinsonizme sebep olabilir.²⁹

2.5. Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Organ Sistemlerine Etkileri:

5.1- Düz Kas: Düz kasların çoğu kontraksiyon ve istirahat dönemine geçerken, transmembranal kalsiyum influksü izlenir. Kalsiyum kanal blokörleri hücre içine kalsiyumun girmesini önleyerek düz kaslarda gevşemeye neden olur. Damar düz kas hücreleri en duyarlı olmakla beraber, benzer etki bronşiyal, gastrointestinal ve uterin düz kaslarda da görülür. Damar sisteminde arterioller, venlerden daha hassastır. Ortostatik hipotansiyon yaygın bir yan etki değildir. Bu ajanların periferik damar rezistansını ve koroner arterial tonusu azalttığı görülmüştür.³⁰

5.2- Kalp Kası: Damar düz kas ve myokard hücrelerinde eksitasyon-kontraksiyon kenetinde temel öneme sahip olan ve hücre membranından kalsiyum girişini sağlayan kalsiyum kanallarının başlıca iki şekli vardır:¹

1-) Voltaj-bağımlı kalsiyum kanalları

2-) Reseptör bağımlı kalsiyum kanalları

Kalp hücrelerinin membranlarında, reseptör bağımlı kalsiyum kanallarından ziyade voltaj-bağımlı kalsiyum kanalları vardır.

Kalsiyum kanal blokerleri; sinoatrial ve artioventriküler impuls iletimini azaltırlar. Kardiyak kontraktiletiyi düşürürler. Myokardın oksijen gereksinimini azaltırlar. Kalsiyum akımı inhibisyonunun, eksperimental myokard infarktüsünde de yararlı olduğu görülmüştür. İskemik hücreler membran depolarizasyonuna sebep olarak, hücre içerisine kalsiyum girişini artırır. Kalsiyum kanal blokörleri, gelişen infarktüsü ve aritmik insidansı azaltmakta ve bu dokuları kalsiyumun zararlı etkilerine karşı korumaktadır. Verapamil kardiyak sodyum kanallarını da, kalsiyum kanallarından daha az olmak üzere bloke eder. Diltiazem ve nifedipin sodyum kanallarını verapamilden daha az bloke eder.³⁰

5.3- İskelet Kası: Çizgili kaslarda eksitasyon-kontraksiyon kenetinde intrasellüler kalsiyum düzeyi artması, membranlardaki kanallardan giren kalsiyuma değil, sarkoplazmik retikulumdan saliverilene bağlı olduğu için kalsiyum kanal blokörü ilaçların, çizgili kas kasılması ve tonusu üzerinde bir etkisi yoktur.¹

2.6. Kalsiyum Kanal Blokeri; Nimodipin

Dihidropirimidin türevi bir kalsiyum kanal blokörüdür. Deney hayvanlarındaki bulgulara göre; serebral damarlarda, diğer damarlara göre belirgin vazodilatasyon yaptığı ileri sürülmüşse de, insanlardaki sonuçlar bunu doğrulamamıştır. Şöyle ki; subaraknoid kanama olgularında; beyin damarlarındaki vazospazm sıklığını veya lokal kan akımı ölçümünü değiştirmeyen dozlarda bile, kanamadan sonra lokal beyin dokusunda yavaş olarak gelişen nekroz alanının boyutlarını küçülttüğü saptanmıştır.

Çok fazla lipofilik olduğu için beyine kolaylıkla girer. Beyin iskemisine yol açan durumlarda iskeminin, nöronlarda aşırı kalsiyum birikmesine bağlı zedeleyici etkisini azaltabileceği ileri sürülmüştür. Halen subaraknoid kanamanın tedavisinde kullanılır, bu durumda serebral arter spazmını önleme ve tedavi etme bakımından etkinliği kısıtlı derecede olmakla beraber, nörolojik bozukluğu yeterli derecede önleyebilir veya hafifletebilir. Migren profilaksisinde bazı incelemelerde, etkili bulunmuştur. Antikonvülsan etkinlik de gösterir.¹

2.7. Kafeinin Etki Mekanizması

Metilksantinlerin santral sinir sistemini stimüle etmelerinin, nöronlardaki fosfodiesteraz enzimini bloke etmelerine ve böylece sAMP düzeyini yükseltmelerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bu enzimin kafeinden daha güçlü inhibitörü olan ve santral sinir sistemine girebilen bazı maddelerin stimülan etki yapmaması bu sava uygun düşmez. Bugün kabul edildiğine göre metilksantinlerin stimülan etkisi, santral sinir sistemindeki adenzinerjik nöromodülatör sistemin sinir uçlarından salıverilen veya diğer tür sinirlerin uçlarından bir nöromodülatör olarak sızan adenzini antagonize etmelerine bağlıdır. Adenzin, postsinaptik ve presinaptik inhibisyon yaparak nörotransmitter salınımını inhibe eder. Adenzin santral sinir sistemindeki nöronları deprese eder ve beyin ventrikülleri içine injekte edildiğinde, sedatif ve antikonvülsan etki yapar. Bu maddenin santral sinir sistemindeki nöronlarda etkilediği A1 reseptörlerin, kafein ve teofilin tarafından kompetitif bir şekilde bloke edildiği gösterilmiştir. Bu reseptörler beyinde özellikle eksitator sinir uçlarında bulunur. Kafeinin stimülan etkisinden başka anksiyojenik etkisinin de endojen adenzinle etkileşmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Kafein beyinde GABA_A/benzodiazepin reseptör kompleksi ile etkileşmek suretiyle de disinhibisyon ve buna bağlı stimülasyon yapma potansiyeline sahiptir, ancak bu etkinin farmakolojik dozlarda oluşması beklenemez. Şöyle ki; in-vitro deneylerde kafeinin adı geçen kompleksi ancak yüksek konsantrasyonlarda inhibe ettiği gösterilmiştir; fakat bu inhibisyona farmakolojik dozlarda erişilemez. A1 reseptörler inhibitör düzenleyici protein (G1) ile kenetli oldukları için, kafeinin yaptığı A1 reseptörü blokajı, adenilat siklazı aktive edebilir.¹

2.8. Kafeinin Metabolizması:

Kafein, büyük kısmı itibariyle (%80) karaciğerde N-3'teki metil grubunun CYPLA₂ adlı sitokrom P450 enzimi tarafından kaldırılması (N-3 demetilasyon) sonucu 1,7 dimetilksantine (diğer adıyla paraksantin'e) dönüştürülerek inaktivasyona uğrar. Bu enzim genetik polimorfizm gösterir. Antidepresan bir ilaç olan fluvoksamin, adı geçen enzimi güçlü bir şekilde inhibe eder. Nöroleptik bir ilaç olan klozapin de aynı şekilde etki gösterir. Kafeinin ortalama 5 saat olan

eliminasyon yarılanma ömrü, fluvoksamin alanlarda 30 saate yükselir. Bu enzim fenobarbital ve sigara dumanı tarafından da indüklenir. Diğer sitokrom P450 oksidaz enzimleri kafein metabolizmasında ufak ölçüde rol oynarlar. Oksidazların etkisi sonucu kafeinden dimetilksantinler (bu arada ufak ölçüde de teofilin) ve bunlardan monometilksantin türevleri oluşur. Di- ve monometilksantinler, ksantin oksidaz tarafından di- ve monometilürik asid metabolitlerine ve kısmen de NAT-2 enzimi ile N-asetilasyon sonucu bir asetilaminourasil metabolitine dönüştürülür; idrarda esas olarak bu metabolitler bulunur. Bunlar, ürik asidden bağımsız bir şekilde suda çözündüklerinden, idrarda ürik asidin çözünmesini etkilemezler. Bu nedenle gutlu veya ürat taşı olan hastalarda, kahve ve diğer metilksantinli içecekler ve metilksantin türevi ilaçlar kontrendike değildir. Aksi yöndeki iddialar bilimsel bir temele dayanmaz. İdrarda %1 gibi düşük bir oranda değişmemiş kafein halinde çıkar. Kafein'in eliminasyon yarılanma ömrü 3 ile 7.5 saat arasında değişir (ortalama 5 saat). Oral kontraseptifler bu süreyi iki katına kadar arttırabilirler; gebeliğin ileri döneminde de bu sürede uzama olur. Sigara tiryakiliği mikrozomal enzim indüksiyonu sonucu kafein ve teofilin yıkımını hızlandırır.¹

2.9. Kafeinin Farmakolojik Etkileri:

Metilksantinler düz kaslarda, özellikle de bronşial kaslarda gevşeme yaparlar. Santral sinir sistemini ve kardiyak kasları stimüle ederler. Böbrekler üzerine diüretik etkilidirler. Bunların içerisinde teofilin bronşiyal düz kasa yüksek derecede selektif iken, kafein santral sinir sistemi üzerine en etkili ksantin türevidir.³⁰

9.1. Düz Kas:

Teofilin bronş düz kaslarını oldukça güçlü bir şekilde gevşetir. Beta-agonist ilaçlara göre bir üstünlüğü; bronkodilatör etkisine karşı bronşiyal astmalı hastalarda uzun süre kullanma sonucu tolerans gelişmemesidir. Kahve, kakao ve çayda bulunan diğer bir doğal ksantin türevi olan kafein de, güçsüz de olsa, bronkodilatasyon yapar. Kafeinin bu düz kaslı yapıları gevşetici etkisi belirgin değildir.¹

9.2. Santral Sinir Sistemi:

Kafein ve teofilin güçlü santral sinir sistemi stimülanıdır. Teobromin bu anlamda hemen hemen etkisizdir. Genel olarak kafein, metilksantinlerin en güçlüsü olarak kabul edilmiştir. Ancak teofilin daha potansiyel ve tehlikeli etkilerini kafeine nazaran santral sinir sistemi üzerinde göstermektedir.

Kafein ve kafein içeren içecekleri tüketen insanlar genellikle daha az uyku hali, daha az yorgunluk, daha hızlı ve temiz düşünce akışı ile karşı karşıya gelirler. Kafein ya da teofilin dozları arttırıldığında, ilerleyen santral sinir sistemi stimülasyonu, sinirlilik, sıkıntı hali, rahatsızlık, uykusuzluk, titremeler ve ateşte yükselme görülür. Daha da yüksek dozlarda fokal ve jeneralize konvülsiyonlar oluşur.

Kafein ve teofilin meduller solunum merkezini güçlü şekilde uyarırlar. Bu etkileri genellikle Cheyne-stokes solunumu gibi patofizyolojik durumlarda, erken doğan bebeklerin apnesinde ve opioid gibi ilaçlarla solunum deprese edildiğinde daha belirgin olur. Bu ilaçlar solunum merkezinin karbon dioksit duyarlılığını arttırırlar.³

Kafeinin insanda solunumu stimüle etmesi nisbeten yüksek dozda olur. Normal deneklerde yaklaşık 3 mg/kg kafeinin solunumu uyarmadığı saptanmıştır; fakat barbitüratların, diğer uyku ilaçlarının, morfin ve opioid ilaçların uygulanması sonucu solunum deprese edilmişse, daha ufak dozdaki kafein dahi uyarıcı etki yapabilir. Alkol sarhoşluğunu gidermez. Morfin (10 mg İ.M.) verilen hastalarda deprese edilmiş solunumu kafein yaklaşık 1 mg/kg dozunda bile belirgin şekilde uyarabilir.

Kafein yüksek dozda diğer stimulan ilaçlar gibi, santral etkileriyle bulantı ve kusma yapar.

Kafein bazı analjezik ilaç müstahzarlarına katılır. Ancak kendisinin analjezik etkisi yoktur. İnsanda i.v veya ağızdan 250 mg dozunda verilen kafeinin beyin kan akımını azalttığı bulunmuştur. Bazı baş ağrısı tiplerinde beyin damarlarında vazodilatasyon oluşturduğundan, baş ağrısına karşı kullanılan analjezik müstahzarlar içindeki kafeinin analjeziye bu şekilde bir katkısı olabilir. Öte yandan kafein ve diğer bazı ksantinlerin deney hayvanlarında morfin analjezisini azaltabildikleri ve ayrıca morfine bağımlı kılınmış deneklerde yoksunluk

sendromuna benzeyen bir durum oluşturduğu bulunmuştur. Söz konusu sendromun, locus coeruleus'un disinhibisyonla stimüle edilmesine bağlı olması muhtemeldir.

Kafein yüksek dozda injekte edildiğinde insanda anksiyete oluşturur. Bunun beyinde adenozin reseptörlerinin bloke edilmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Panik bozukluğu olan hastalar, kafeinin anksiyojenik etkisine özellikle duyarlıdırlar. Kafein manik-depresif ve şizofrenik belirtileri de arttırabilir. Ayrıca 100-200 mg dozunda ağızdan alındığında, benzodiazepinlerin anksiyolitik etkisini ve diğer bazı depresif etkilerini azaltır. Kahve içme, benzodiazepinlerin terapötik etkinliğini düşürür ve ayrıca fenotiazin türevi nöroleptiklerin absorpsiyonunu azaltır.

Kafein, ağızdan 200-400 mg dozunda alındığında psikostimülan etkinlik gösterir; vijilansı ve dikkati artırır, yorgunluğu azaltır. Kafeinin bellek fonksiyonları üzerinde genellikle bir etkisi yoktur. Kafein uykusuzluk yapar, yorgunluğa karşı dayancı artırır ve fiziksel, psikomotor ve intellektüel performans yükseltir. Bu etki amfetamin ve efedrinlere göre oldukça zayıftır. Kafeinin yaptığı uykusuzluk, bazı kimselerde belirgin olduğu halde, diğerlerinde belirgin değildir. Bu durumun genetik farklılığa bağlı olması muhtemeldir. Kafein genellikle bağımlılık oluşturmaz, ancak fazla kahve içenlerde (günde 11-15 çay fincanı amerikan kahvesi gibi) ilaç bağımlılığının temel öğeleri ortaya çıkar. Dozu artırmak suretiyle yapılan çift-kör denemelerde kafeinin insanda pekiştirici olduğu ve tolerans ve fiziksel bağımlılık oluşturabildiği bulunmuştur. Bu olgularda kafeinin kesilmesi; disfori, baş ağrısı, iritabilite, zihinsel konsantrasyonun azalması ve anksiyete ile kendini belli eden hafif bir yoksunluk sendromuna neden olur.¹

9.3. Kardiyovasküler sistem:

Kafein ve teofilinin kardiyovasküler sistemde belirgin etkileri vardır. Sempatomimetik etkilerinden başka adrenal medullasından katekolamin salıverilmesini artırır; plazmada renin etkinliğini yükseltirler. Kardiyovasküler etkileri genellikle 230 mg dozundan itibaren belirgin duruma gelir. Kalpte orta ve yüksek dozlarda belirgin pozitif inotrop ve pozitif kronotrop etki yaparlar. Kalp debisini, yaptığı işi ve oksijen tüketimini fazlalaştırırlar. Koroner kan akımını artırır. Aritmi oluşturabilirler. damarlarda genellikle genişleme yaparlar; periferik

damar rezistansını düşürürler. Ancak beyin damarlarını büzerler; serebrospinal sıvı oluşumunu azaltır ve basıncını düşürürler.¹

Daha yüksek konsantrasyonlarda kafein ve teofilin, belirgin taşikardi oluştururlar. Duyarlı bireylerde başka tür aritmiler de ortaya çıkabilir. Bu tür aritmiler kafein içeren içecekleri aşırı miktarlarda alan bireylerde de ortaya çıkabilir. Ancak normal kişilerde kardiyak aritmi oluşma şansı bir hayli azdır. İskemik kalp hastalığı ile daha önceden ventriküler ektopik aritmisi olan kişiler de kafeinin ortalama dozlarını tolere edebilirler. Aritmi frekansı artışına sebep olmaz.³

9.4. İskelet Kası:

Kafein insanda kas gücü kapasitesini arttırmaktadır. Örneğin: 6 mg/kg kafein kayak sporu yapan sporcularda yüksek rakımlarda performansı belirgin derecede arttırmaktadır. Ancak bu etkinin ne dereceye kadar kafeinin nöromüsküler iletim üzerindeki etkisinden kaynaklandığı kesin değildir. Terapötik konsantrasyonlarda hem kafein hem de teofilin diyafragmatik kontraktileti artırır ve diyafragmatik yorgunluğu normal bireylerde ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan bireylerde azaltır. Bu etkiler solunum fonksiyonlarının artışına ve düzeltilmesine katkıda bulunabilir. Bu durumun, dispnenin düzeltilmesine de katkıda bulunduğu sanılmaktadır.³

9.5. Diüretik Etki:

Metilksantinler, özellikle de teofilin su ve elektrolit atılımını artırarak idrar miktarını fazlalştırır. Bunun altında yatan mekanizma bilinmemektedir.³

9.6. Diğer Etkileri:

Kafein midede asid ve pepsin salgısını artırır. Bu etkinin midenin asid salgılayan hücrelerinde, siklik AMP üzerinden meydana geldiği sanılmaktadır. Kahvenin asid salgısını arttırıcı etkisi, içindeki kafeinden başka, diğer bitkisel maddelere de bağlıdır.

Kafein muhtemelen katekolaminler aracılığı ile lipolizi artırır ve plazma serbest yağ asidi düzeyini yükseltir.¹

2.10. Kafeinin Terapötik Kullanımı:

Kafeinin değişik farmakolojik etkileri pek çok terapötik uygulamada yer bulur. Bu preparatlar, astım tedavisinde bronşiyal düz kasların gevşetilmesi için ve solunum güçlüğüünün giderilmesinde; kronik obstrüktif akciğer hastalığında kullanılmaktadır. Kafein santral sinir sistemi üzerindeki stimülan etkilerinden dolayı uyanıklık durumunu arttırmak, yorgunluk ve halsizlik durumunu ortadan kaldırmak amacıyla tıbbi uygulamalar dışında da kullanılmaktadır. Bu kullanım ya kafeinli içecekler, ya da tabletler yoluyla olmaktadır.

Bundan daha önemlisi; hem kafein, hem de teofilin, erken doğan bebeklerde ortaya çıkan uzamış apne tedavisinde de kendine bir uygulama alanı bulmuştur. Onbeş saniyeden uzun süren uzamış apne dönemleri bradikardi ile birlikte. Bu olay prematür bebeklerde çok da nadir değildir. Bu durum tekrarlayan hipoksi ve nörolojik hasarı artırır. Çoğunlukla ciddi bir sistemik hastalıkla birlikte görülürse de, bazı durumlarda hiç bir sebep ortaya konulamaz.

Metilksantinler pek çok klinik çalışmada, tanımlanamayan apne tedavisinde kullanılmıştır. Metilksantinlerin oral ve intravenöz uygulanması, 20 saniyeden uzun süren apne dönemlerini ortadan kaldırır. Daha kısa süren apne dönem sayısını belirgin şekilde azaltır.³

Her ne kadar başlangıçta kafein bu amaçla teofilinden daha az kullanılmış ise de, şimdilerde bazı klinikler kafeini tercih etmektedir. Çünkü dozlama biçimleri daha basittir ve daha kolay kullanılabilir. Dahası, teofilin uygulanması belirgin düzeylerde kafein birikimine sebep olmaktadır. Metilksantinlerin büyüme ve gelişme üzerindeki etkileri de tam olarak araştırılmamıştır. Tedavinin olabildiğince kısa tutulması, birkaç hafta ile sınırlandırılması gerekmektedir.

Kafein terapötik dozlarının altında, pek çok reçetesiz satılan ilaç içerisinde de yer alır. Kafein aspirinle kombine olarak başağrısı tedavisinde analjezik olarak yaygın kullanılır. Aynı zamanda ergo alkaloidleri ile kombine biçimde migren tedavisinde kullanılmaktadır.³

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Nöron Hücre Kültürü

Nöron kültürlerinin sinir sistemini karakterize etmede iki önemli avantajı vardır. Azalan hücre kompleksliği ve hücresel çevrenin manipülasyonunun kolaylığıdır.

Tüm in-vitro çalışmalar için öne sürülen temel dezavantaj fizyolojik olarak uygun olan fenotipik ekspresyonun belirsizliğidir. Bununla birlikte nöronal hücrelerin in-vitro ve in-vivo olarak aynı özellikler ifade ettiklerine dair deliller vardır. Örneğin: Glial fibriler asidik protein ve vimentinden astroglial hücre üretimi gibi.

Nöronal doku kompleksinin azalması ve in-vitro hücresel çevrenin hazırlanması, spesifik nöronal hücrelerin in-vivo davranışları düzenlemesini ve önceden tahmin edilmesini araştırmacılara olası kılmıştır.

Nörotropik faktörlerin klonlanması, karakterizasyonu ve pürifikasyonu in-vitro tekniklerin kullanılmasına bağlıdır. Nörotropik faktörler nöron hücre kültürlerinin spesifik kısımlarının büyümesini ve canlılığını sürdürmesini sağlar.

Araştırmacılar göstermişlerdir ki spesifik nöronlar canlılıklarını sürdürme bilmeleri için nörotropik faktörlere gereksinim duyarlar.

Nöron kültürlerinin kullanımında şu faktörler pratik açıdan önemlidir:

- 1- Nöronal dokunun kaynağı: Hayvan türü, yaşı ve dokunun anatomik yeri.
- 2- Kültürün tipi: Organ, kesit, eksplant, disagresyon ve reagresyon ve hücre çizgisi.
- 3- Dış çevre: Medium, gaz fazı, sıcaklık, medium katkıları ve temel maddeler.

Çoğu hücre kültürleri vücut sıcaklığında ve %100 havada veya %5CO₂/%95 hava gaz fazında yapılır. Bununla birlikte çalışılan kültürün cinsine bağlı olarak medium, temel madde ve destekleyiciler değişebilir. Nöronal hücreler spesifik iyonlara, amino asitlere, ko-faktörlere, vitaminlere, hormonlara ve mitojenlere ihtiyaç duyarlar. Genel olarak bu ihtiyaçlar olgunluğa erişmemiş doku ekstraktları, insan serumu, yeni doğan inek ve at serumu içeren temel besin mediumları ile karşılanır.

3.2. Denejde Kullanılan Mediumlar Ve İçindekiler

Hanks Balanced Salt Solution: (HBSS)

CaCl ₂	: 1.4 g/L
KCL	: 4.0 g/L
KH ₂ PO ₄	: 0.6 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	: 1.0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	: 1.0 g/L
NaCL	: 80.0 g/L
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	: 0.9 g/L
Glukoz	: 10.0 g/L
Fenol kırmızısı	: 0.1 g/L
NaHCO ₃	: Üç defa distile edilmiş 100 ml su içinde

1.4 g NaHCO₃ içeren solüsyon hazırlanır. 0.2 µM'lik bir filtre ile steril edilir. Bu steril solüsyonun takriben 2.5 ml'si (0.35 g/L) dilüe edildikten sonra ve HBSS kullanılmadan önce ilave edilir.

1-) Herbir kimyasal madde tartılır. (Sodyum bikarbonat ve fenol kırmızısı hariç) 990 ml 3 defa distile edilmiş suda çözüldürülür.

2-) 10 ml %1 fenol kırmızı karıştırılır.

3-) 0.2 µM'lik bir filtre vasıtasıyla sterilize edilir.

4-) Kullanım için; 1/10 steril su veya 0.2 µM'lik bir filtre ile sterilize edilmiş su ile seyreltilir.

Eagle's Basal Medium (EBM) ve ilaveler (Eagle, 1955)

İnorganik tuzlar	mg/L
CaCl ₂ (anhidre)	200.00
KCL	400.00
Mg SO ₄ (anhidre)	97.67
NaCL	6800.00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	140.00
Diğer içerikler;	
D-glukoz	1000.00
Fenol kırmızısı	10.00

Amino asitler;	
L-Arginin.HCL	21.00
L-Sistin.2HCL	15.65
L-Glutamin	292.00
L-Histidin	8.00
L-İzolösin	26.00
L-Lisin HCL	36.47
L-Metionin	7.50
L-Fenilalanin	16.50
L-Treonin	24.00
L-Triptofan	4.00
L-Tirozin (disodyum tuzu)	26.00
L-Valin	23.50
Vitaminler;	
Biotin	1.00
D-Kalsiyum pantotenat	1.00
Kolin klorid	1.00
Folik asid	1.00
İnositol	2.00
Nikotinamid	1.00
Piridoksal HCL	1.00
Riboflavin	0.10
Tiamin HCL	1.00

Eagle's basal mediuma yukarıdakilere ilaveten 5.0 g/L D-glukoz ve 2.2 g/L sodyum bikarbonat eklenir. Bunlara steril olarak %0.1 FBS (fetal bovine serum) ve penisilin, glutamin, N1 karışımı (defined culture medium supplement) ve insülin ilave edilir.³¹

3.3. Serebellar Hücre Kültürlerinin Hazırlanışı

Serebellum hücre kültürleri Xu ve Wojik tarafından tarif edilen şekilde, farmakoloji anabilim dalı hayvan laboratuvarında yetiştirilen 4-7 günlük Spraque Dawley sıçanlarından hazırlandı.³² Yedi adet serebellum ortogonal yönde kesildi. Bu kesitler iki adet steril bisturi ucu yardımı ile laminar flow bench'de kıyıldı. 2 ml tripsin-EDTA (%0.25 tripsin-%0.02 EDTA) içeren 5 ml kalsiyumsuz HBSS solüsyonunda 10 dk 37°C'de süspansiyon haline getirildi. Tripsinin doku parçalayıcı fonksiyonu, tripsin deoksiribonükleaz Tip 1 (120 ünite/ml, Sigma Co) içeren 10 ml HBSS ile sona erdirildi. 800 rpm'de 5 dakika santrifujlenen hücre grubu süspansiyon haline getirildi.

25 cm³ polipropilen doku kültür flaskları, poli-D-lizin ile kaplandı. (70.000 MW, 0.1 mg/ml poly/D-lysine, phosphate-buffered-saline (PBS) içerisinde eritildi ve flask bu solüsyon ile dolduruldu. Oda sıcaklığında takriben 5 dakika bekletildikten sonra vakumlandı ve flasklar distile su ile yıkandı ve kurutuldu.).³³

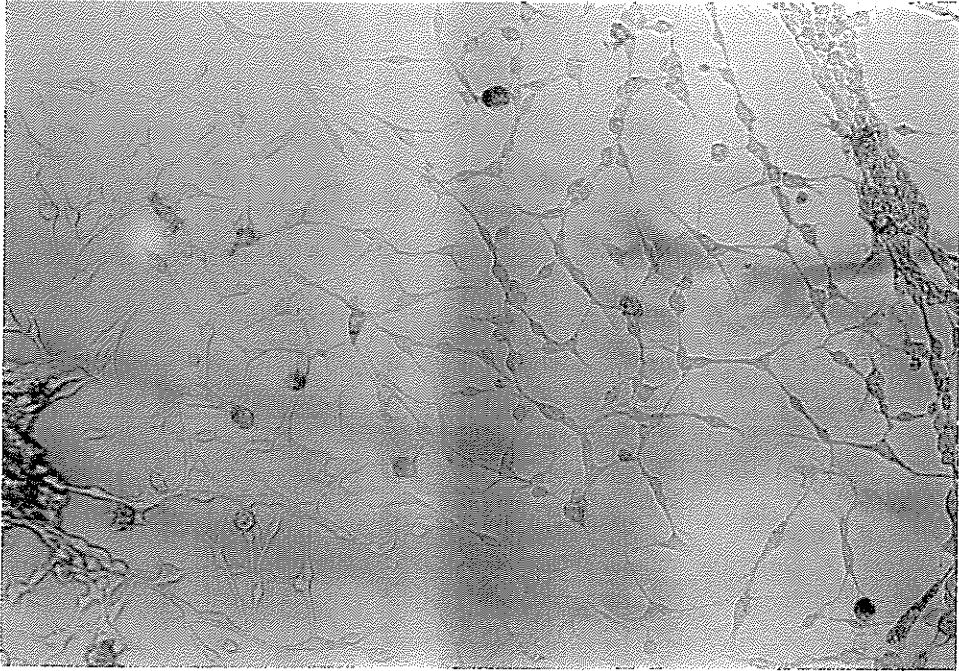
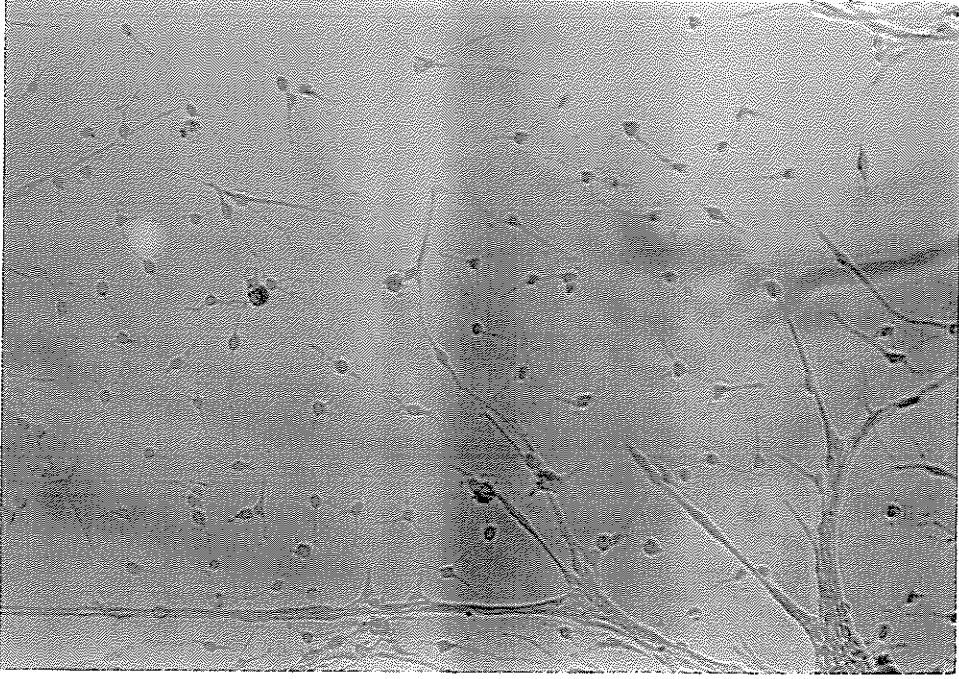
0.2 ml'lik hücre süspansiyonu, %10 fetal calf serum (Biol Ind), 100 mg/ml gentamisin, 25 mM KCL, 2 mM L-glutamin ve 0.1 mg/ml streptomisin, 100 ünite/ml penisilin içeren 2.5 ml basal eagle's medium ile kaplandı. 30 dakika sonra ortama yapışmayan hücrelerin eliminasyonunu sağlamak için medyum değiştirildi ve flaskların içine hemen aynı miktarda taze medyum eklendi. Kültürler % 95 O₂ ve %5 CO₂ ile nemlendirilen 37°C'deki steril bir ortamda muhafaza edildi. 24-48 saat sonra 10 µM sitozin arabinozid (cytosine-1-β-D-arabinofuranoside, Sigma Co.) nöron olmayan hücrelerin replikasyonunu önlemek için kültür ortamına ilave edildi. Kültür ortamı haftada iki kez değiştirildi. Nöronlar 16 günlük inkübasyondan sonra in-vitro nörotoksisite deneyleri için kullanıldı (Şekil 1).

3.4. Nörotoksisite Deney Prosedürü

Kafein 45 dakikalık bir süre için kültür ortamına 50, 150, 250 ve 350 µM konsantrasyonlarda ilave edildi ve en toksik konsantrasyonu tayin edildi. Kalsiyum kanal blokörü nimodipin, kafeinin en toksik konsantrasyonu olan 350 µM'da test edildi.

Kafeinden 45 dak önce ve sonra 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda nimodipin, kültür flasklarına ilave edildi. Bu periyodu takiben kültürler önce 5 cc

Basal Eagle's medyum ile yıkandı ve daha sonra 2.5 cc aynı kültür sıvısı ilave edildi. Kùltürler 16 saat 37°C de %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş otoklava konuldu. Bekleme süresini takiben kùltürler 2.5 cc %4 trypan mavisini ile boyandı. 5-15 dakika arasında boyanmış ve boyanmamış hücreler bir invert mikroskop yardımı ile incelendi. Herbir deney için altı kùltür ortamı kullanıldı. Her bir kùltür için en az on mikroskopik olan incelendi. 5-15 dakika arasında içerisine boya alan hücreler ölü, almayanlar ise canlı olarak kabul edildi. Bu süre sonunda sağlam nöronlar da boyanmaya başladığı için, değerlendirmelerde bu süreye özellikle çok sadık kalınmaya çalışılmıştır. Bu sayılar ölü hücrelerin total hücrelere yüzdesine çevrildi ve paired-t test kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.



Şekil 1. Serebellar granüler nöron kültürlerinin mikroskopik görüntüleri. Üstteki fotoğraf 4 günlük, alttaki ise 12 günlük kültürlerden çekilmiştir.

4- BULGULAR

Yeni doğan sıçanların serebellar hücre sayısında kafeinin 50 μ M ve 150 μ M konsantrasyonları etkisiz bulundu. Kontrol flaskındaki ölü hücre sayısı 0.9 ± 0.63 iken, 50 μ M için 1.1 ± 0.39 , 150 μ M için 0.89 ± 0.47 dir. Her iki konsantrasyon da istatikselsel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$).

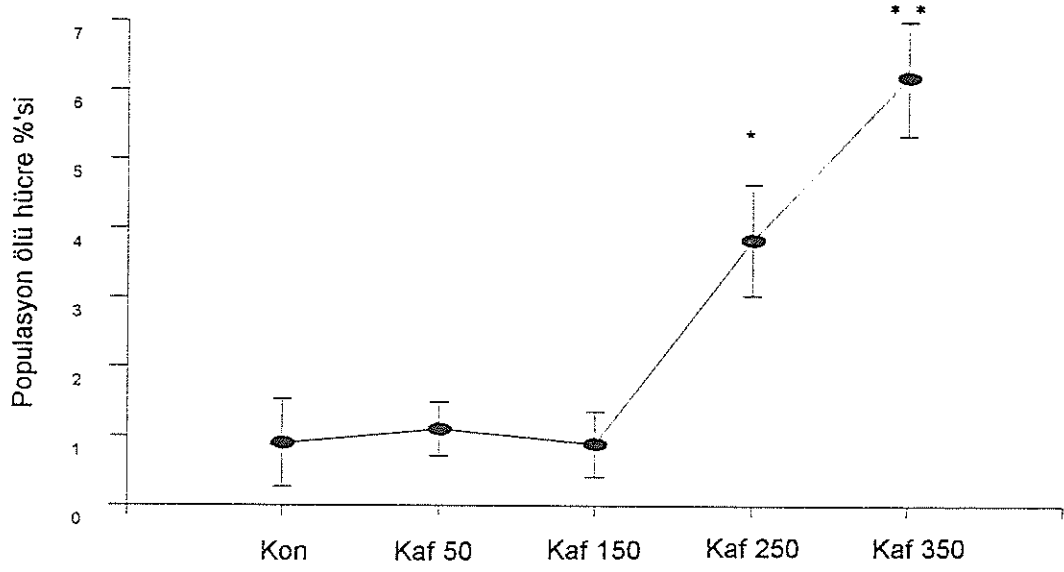
250 μ M ve 350 μ M kafein konsantrasyonlarında yaşayan hücre sayılarının azaldığı görülmüştür. 250 μ M kafein için ölü hücre sayısı 3.84 ± 0.8 (t:2.86 p:0.024) 350 μ M kafein için ölü hücre sayısı 6.2 ± 0.86 (t: 5.43 p:0.001) olarak tesbit edildi (Şekil 2).

Kafein 250 ve 350 μ M konsantrasyonlarda toksik 150 μ M konsantrasyonda ise terapötik olarak kabul edilmektedir. Bu sonuçlar ışığında 350 μ M kafein sıçan serebellar granüler hücre kültürlerinde en toksik doz olarak tesbit edildi.

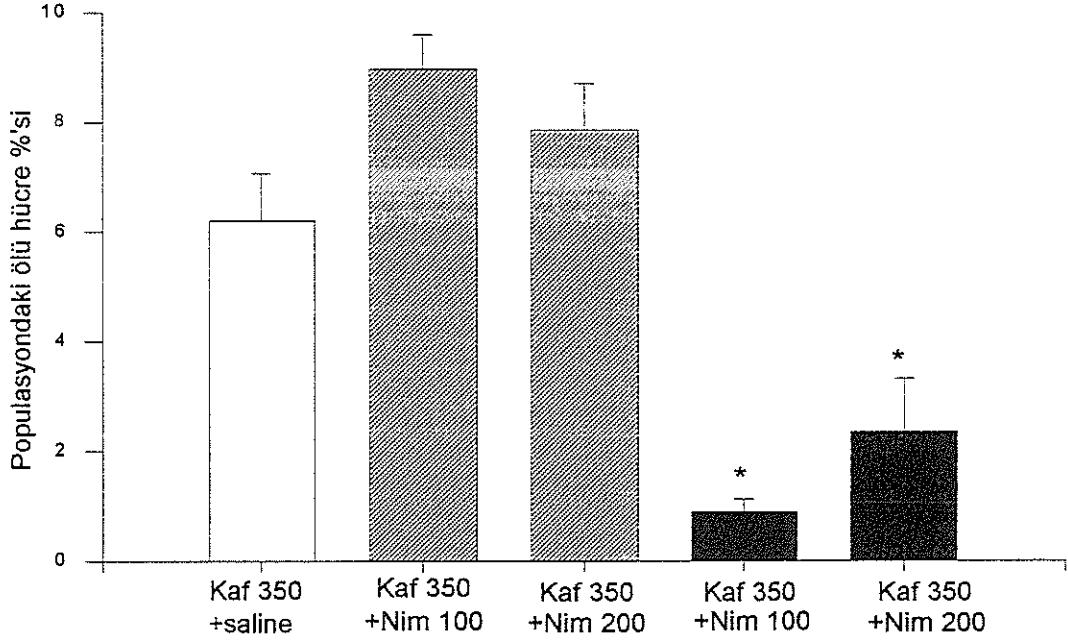
Kafeinin en toksik konsantrasyonundan (350 μ M) 45 dakika önce ve sonra 100 μ M ve 200 μ M konsantrasyonda Nimodipin kullanıldı. Kafeinden sonra uygulanan Nimodipin kültürlerde ölü hücre popülasyonu üzerine etkisiz bulundu. 100 μ M Nimodipinde ölü hücre sayısı 8.96 ± 0.63 iken 200 μ M nimodipin konsantrasyonunda ölü hücre sayısı 7.84 ± 0.87 'dir. Her iki doz için ($p>0.05$)

Diğer taraftan 350 μ M kafein konsantrasyonundan önce kullanılan her iki Nimodipin konsantrasyonu, kültürlerdeki nöronal hücre ölümünü bloke etti. Kafeinden 45 dakika önce kullanılan 100 μ M nimodipin konsantrasyonunda ölü hücre popülasyonu 0.89 ± 0.23 (t: 5.23 p:0.000) iken 200 μ M nimodipin konsantrasyonunda ölü hücre popülasyonu 2.35 ± 0.96 (t: 5.69 p: 0.000) olarak bulundu (Şekil 3)

Kafeinin 350 μ M konsantrasyonundan önce 100 μ M konsantrasyonundaki Nimodipin dozunun 200 μ M nimodipin konsantrasyonundan daha etkili olduğu görüldü (Tablo 1).



Şekil 2. Sıçan serebellar granüler hücre kültürlerinde kafeinin doz-cevap eğrisi.
Kon : Kontrol, Kaf : Kafein (mikro M), * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. (n=6)



Şekil 3. Grafik sıçan serebellar hücre kültürlerinde kafein ile indüklenen nörotoksisteye nimodipinin etkisini göstermektedir. Kaf : Kafein (mikro M), n=6.

Nim : Nimodipin (mikro M),  Nimodipin kafeinden 45 dakika sonra,

 Nimodipin kafeinden 45 dakika önce. * p< 0.0001.

TABLO 1- Serebellar granüler hücre kültürlerinde total popülasyon içerisinde ölü hücre yüzdelерinin ortalama \pm standard sapma değеrleri ve bu değеrlere nimodipinin etkileri. * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$.

Kafein Konsantrasyonu μM	Ölü hücre sayısı	45 dakika sonra Nimodipin 100 μM	45 dakika sonra Nimodipin 200 μM	45 dakika önce Nimodipin 100 μM	45 dakika önce Nimodipin 200 μM
Kontrol	0.9 \pm 0.63				
50	1.1 \pm 0.39				
150	0.89 \pm 0.47				
250	3.84 \pm 0.8*				
350	6.2 \pm 0.86**	8.96 \pm 0.63	7.84 \pm 0.87	0.89 \pm 0.23***	2.35 \pm 0.96***

5- TARTIŞMA

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) ülkemizde ve dünyada yaygın olarak bulunan, halk arasında tanınan ve kullanılan bir drogdur.

Bu invitro çalışmada kafein in-vivo terapötik konsantrasyon olan (80-110 μM) 50 ve 150 μM konsantrasyonda ve serum toksik konsantrasyonu (255 μM) temsilen 250 μM ve 350 μM konsantrasyonlarda hücre kültür sıvılarına eklendi. Daha önceden belirtildiği gibi kafein 50 ve 150 μM konsantrasyonlarda nöronal hücre sayısı üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamaktadır.^{11,34} 250 ve 350 μM konsantrasyonlarda ise serebellar hücre konsantrasyonu anlamlı derecede azalmış bulundu. Kafeinin 250 ve 350 μM dozlarda oluşturduğu etkilerin toksik veya metabolik olabileceği düşünüldü.

Bu konsantrasyonlarda ilginç olan taraf bazı hücreler ölürken diğer bir grup hücrelerin sağlam olarak gözlenmesiydi. Bazı yazarların düşüncelerine göre kafein memeli hücrelerinde DNA replikasyonunun tamamlanması aşamasında uncoupling mitozu indüklediği iddia edilmektedir.³⁵ Diğer bazı yazarlar ise bu etkileri adenosin reseptör antagonizmasına bağlamaktadırlar.³⁶ Bu ikinci görüşe göre intrasellüler depolardan internal kalsiyum saliverilmesi artmakta ve ksantinler bu yolla nöron dejenerasyonu ve hücre ölümünde direkt etki oluşturmaktadır.¹⁴ Ancak adenosin A₁ reseptörlerini kafein kadar bloke edebilen enprofilin nörötoksik ve konvülsan etki göstermemesi bu teoriyi zayıflatmaktadır.¹

Kafein ile indüklenen nörötoksitede eksternal kalsiyumun ve nöronlardaki kalsiyum kanallarının rolü henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada her iki dozda kafeinden 45 dakika önce kullanılan nimodipin çok etkili bulunmuş ve beyindeki iskemiye en hassas dokulardan biri olan serebellar granüler nöronal hücrelerin³⁷ kafeinle indüklenmiş nörötoksitesinde intrasellüler kalsiyum kadar eksternal kalsiyumunda rolü olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmadaki eksternal kalsiyumun kaynağı hücrelerin kültüre edilmesinde kullanılan fetal calf serum veya Basal Eagle's medium olabilir.

Çalışmamızdaki bir diğer ilginç nokta ise düşük doz nimodipinin yüksek dozdakine nazaran daha etkin bulunmasıdır. Nimodipinin sıçanlardaki iskemik olaylarda ve felçli hastalardaki doz bağımlı karakteri daha önce yayınlanmıştır. Wimalaratna ve Capildeo 215 felçli hastada nimodipinin farklı dozlarının

oluşturduğu etkileri detaylı bir şekilde rapor etmiş bulunmaktadır. Bu araştırmacılar nimodipinin farklı dozlarını intravenöz olarak infuzyon yoluyla hastalara uygulamışlar, her iki nimodipin dozunu plaseboya karşı etkili bulmalarına rağmen 120 mg/kg nimodipinin 240 mg/kg nimodipine göre daha yararlı bulunduğunu bildirmişlerdir.³⁸

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında daha önce yapılan ve kainik asitle oluşturulan in-vitro nörotoksositeye nimodipinin etkilerinde de benzer sonuçlara rastlanmıştır. 50 μ M kainik asit toksisitesi, 100 μ M nimodipin kullanımında başarılı bir şekilde önlenirken 200 μ M nimodipin aynı doz kainik asit toksisitesine karşı etkisiz bulunmuştur. 100 μ M kainik asit nörotoksitesinde ise en etkin nimodipin dozu 200 μ M olarak bulunmuş, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlardaki nimodipin ise nörotoksiteyi önlemede etkisiz kalmıştır.³⁹

Kalsiyum kanallarının bloke edilmesi, zengin enerjili fosfatların seviyesini yükseltir ve post-iskemik laktat birikimini azaltır.⁴⁰ Bu zengin enerjili fosfatların aktive edilmesi olayı kalsiyuma bağımlı bir olay olup kalsiyum kanallarının yüksek doz nimodipin ile tamamen bloke edilmesi sonucu hücre içerisinde bu fosfatların seviyesinin yükselmesini engelliyor olabilir. Diğer bir olasılık ise bütün kalsiyum kanallarının bloke edilmesi sonucu sarkoplazmik retikulum kaynaklı ryanodine-duyarlı kalsiyum kanalları aktifleniyor olabilir.

Sonuç olarak 250 ve 350 μ M kafeinin in-vitro uygulanması canlı nöronal hücrelerin oranını azaltırken 50 ve 150 μ M konsantrasyondaki kafein kültürdeki, canlı hücre sayısı üzerinde herhangi bir değişiklik yapmamıştır. Kafeinle indüklenen nörotoksitede ekstrasellüler kalsiyumun muhtemelen önemli bir rolü bulunmaktadır. Voltaj bağımlı bir kalsiyum kanal blokeri olan nimodipin, kafeinle ile indüklenen nörotoksiteyi önlemede etkin bulunmuştur. Ancak kalsiyumun bu olaydaki gerçek etkisinin tesbit edilmesi için benzer in-vivo pre-klinik çalışmalara daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

Kafeinin oluşturduğu epileptik etkileri kalsiyum kanal blokerlerinden verapamil ve nifedipinin değiştirmedeği bildirilmiştir.¹⁷ Patch-clamp tekniği kullanılarak civciv nöronları üzerinde yapılan bir çalışmada kafeinin hücredeki potasyum kanallarını bloke ettiği ve bu etkisinin bir başka ksantin türevi olan 3-isobutil-1-metilksantin ile beraber kullanıldığında aditif olduğu tesbit edilmiştir.²⁷

Potasyum akımındaki bu direkt inhibisyonun, intrasellüler serbest kalsiyum oranında bir artışa yol açabileceği belirtilmiştir.¹⁴

Sıçan ve tavşanlarda pentilentetrazol (GABA/Benzodiazepin reseptör blokeri) ile oluşturulan deneysel konvülsiyonlarda nimodipinin antikonvülsan etki gösterdiği saptanmıştır.^{41,42} Bazı bilim adamları son yıllarda kan beyin bariyerini yüksek oranda geçebilen kalsiyum kanal blokerlerini yeni bir antikonvülsan grup olarak göstermektedir.⁴³ Nimodipin sadece yüksek konsantrasyonlarda nöronal dokulardan bazı nörotransmitter ve hormonların salıverilmesini bloke ettiği bildirilmiştir.⁴⁴ Nimodipinin yüksek ve düşük dozları arasındaki farklı etki profilleri belirtilen hormon ve nörotransmitter blokajına bağlı olarak ortaya çıkıyor olabilir.

Epileptik nöbetlerde nöronal kalsiyum influksunun önemli bir rol oynadığı tesbit edilmiştir. Kalsiyum kanal blokeri nimodipin 21 epileptik hastada kullanılmış ve on iki haftalık tedaviden sonra 14 hastada nöbetlerin %67, 4 hastada ise %38 oranında azaldığı, 3 hastada ise değişmediği gözlenmiştir.⁴⁵

Deneysel kemoterapötik ajan ve in-vivo periferik nöropati yapan suramin üzerinde yapılan bir çalışmada nörotoksisitenin ortaya çıkmasında intrasellüler kalsiyum salıverilmesinden çok ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine girişinin daha önemli olduğu bildirilmiştir.⁴⁶

Eksitabl veya non-eksitabl hücrelerin her ikisinde intrasellüler ve sellüler kalsiyum kanallarına sahip olabileceği yönünde bulgulara son yıllardaki çalışmalarda rastlanmıştır.⁴⁷

L-tipi kalsiyum kanal blokeri nimodipinin 1 μ M dozu kafeinin indüklediği hücre içine kalsiyum girişini inhibe etmektedir. Aynı çalışmada ryanodin ile önceden muamele edilmiş hücrelerde kafeinle indüklenen kalsiyum salıverilmesi bloke edilememiştir.⁴⁸

Bir endoplazmik retikulum kalsiyum adenozin trifosfat inhibitörü olan thapsigargin ile 10 dakikalık muameleden sonra IP_3 'e duyarlı kalsiyum depolarının boşaldığı tesbit edilmiştir. Thapsigargin ile muameleden sonra kullanılan kafein ise intrasellüler kalsiyum miktarını spayk oluşturacak kadar yükseltememiş, ancak bir plato oluşturacak şekilde kalsiyum yükselmesi tesbit edilmiştir. Bu sonuçlara göre kafeinle indüklenen kalsiyum influksunun intrasellüler depolardan kalsiyum salıverilmesinden bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır.⁴⁸ Aynı çalışmada

pankreas RINm5F hücrelerinin nimodipin ile muamele edilmesi sonucu kafeine bağlı kalsiyum influksu doza bağımlı olarak azalmıştır.⁴⁸ Bu bulgulara tamamen aksi yönde sonuçların elde edildiği bazı literatür çalışmalarındaki farklılığın hücrelerin pasajlanma aşamasındaki değişikliklerden kaynaklandığı iddia edilmiştir.⁴⁹

Pankreas β -hücrelerinde intrasellüler kalsiyumun iki ayrı mekanizma ile salıverildiği, bunlardan birinin IP_3 'e duyarlı, diğerinin ise kafeine duyarlı depolar olduğu belirtilmiştir. Bu β -hücrelerinde endoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesinde IP_3 'ün ikincil ulak olarak görev yaptığı belirtilmiştir.⁵⁰

Kafein 130 μM dozlarında konsantrasyona bağlı olarak ekstrasellüler kalsiyumun varlığında veya yokluğunda hücre içi kalsiyum miktarının arttığı tesbit edilmiştir. Ancak kalsiyumun yokluğunda kafeinin oluşturduğu spaykların büyüklüğünde, kalsiyum varlığında oluşturulanlara göre yaklaşık %40-60'lık bir azalma tesbit edilmiştir. Bu sonuçlara göre kafeinin oluşturduğu spayklarda intrasellüler ve ekstrasellüler kalsiyumun her ikisinde de önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.⁴⁸

KAYNAKLAR

- 1- Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Feryal Matbaacılık, 7. Baskı 1995: 1147-2029
- 2- Aranda JV, Gorman W, Bergsteinsson H, Gunn T. Efficacy of caffeine in treatment of apnea in low birth weight infant. *J Peiatr* 1997; 90: 467-72.
- 3- Serafin WE. Drugs used in the treatment of asthma. In J.G. Hardman and L.E. Limbird (Eds.). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: The Mc-Graw Hill Company, 1996: 672-7
- 4- Gerhardt T, McCathy J, Bancalari E. Effect of aminophylline on respiratory center activity and metabolic rate in premature infants with apnea. *Pediatrics* 1979; 63: 537-42.
- 5- Gunn TR, Metrakos K, Riley P, Willis D, Aranda JV. Sequela in caffeine treatment in preterm infants with apnea. *Pediatr* 1979; 94: 106-9
- 6- Kostopoulos G, Veronikis DK, Efthimiou I. Caffeine blocks absence seizures in the tottering mutant mouse. *Epilepsia* 1987; 28 (4): 415-20
- 7- Garrettt BE, Holtzman SG. D₁ and D₂ dopamine receptor antagonists block caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 47(1): 89-94
- 8- Somani SM, Khanna NN, Bada HS. Caffeine and Theophylline: Serum CSF correlation in premature infants. *J Pediatr* 1980; 96: 1091-1093
- 9- Rosenkrantz TS, Oh W. Aminophylline reduces cerebral blood flow velocity in low -birth- weight infants. *Am J Dis Child* 1984; 138: 489-91
- 10- Aranda JV, Chemtob S, Laudignon N, Sasyniuk A. Pharmacological effects of theophylline in the newborn. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 773-80
- 11- Volpe JJ. Effects of methylxanthines on lipid synthesis in developing neurologic systems. In Oliver TK, Kirschbaum TH ed. *Seminars in perinatology*. Grun and Stratton New York 1981; 395-403
- 12- Siegrist HP, Burkart T, Hoffmann K, Weismann U, Herschkowitz N. Theophylline reduces the activity of cerebroside- sulfotransferase, a key enzyme in myelination, in cell cultures from newborn mouse brain. *Pediatr Res* 1980; 14: 1226-9.

- 13- Allan WC, Volpe JJ. Methylxanthines cause a marked reduction in cholesterol synthesis in cultured glial cells. [Abstract 266] *Pediatr Res* 1978; 12: 401
- 14- Stone TW. *Neuropharmacology*. New York: WH Freeman and Company Limited, 1995: 122-5
- 15- Tanker M, Tanker N. *Farmakognozi*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1990: 159-167
- 16- Ault B, Olney MA, Joyner JL, Boyer CE, Notrica NA, Soroko FE, Wang CM. Pro-convulsant actions of theophylline and caffeine in the hippocampus: implications for the management of temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1987; 426(1): 93-102
- 17- Frank C, Sagratella S, Benedetti M, Scotti de Carolis A. Comparative influence of calcium blocker and purinergic drugs on epileptiform bursting in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1988; 441(2): 393-7.
- 18- Czeuzwar SJ, Kleinrok Z. Modulation of the protective efficacy of common antiepileptic drugs by xanthine derivatives: implications for the clinical use of xanthines in epileptic patients. *Pharmacol Res* 1990; 22(6): 661-5
- 19- Moraidis I, Bingmann D, Lehmenkühler A, Speckmann EJ. Caffeine-induced epileptic discharges in CA3 neurons of hippocampal slices of the guinea pig. *Author. Neurosci Lett* 1991; 129(1): 51-4
- 20- Georgiev V, Johansson B, Fredholm BB. Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A1 receptor number. *Brain Res* 1993; 612(1-2): 271-7
- 21- Moraidis I, Bingmann D. Epileptogenic actions of xanthines in relation to their affinities for adenosine A1 receptors in CA3 neurons of hippocampal slices (guinea pig). *Brain Res* 1994; 640(1-2): 140-5
- 22- Avidor T, Clementi E, Schwartz L, Atlas D. Caffeine-induced transmitter release is mediated via ryanodine-sensitive channel. *Neurosci Lett* 1994; 165(1-2): 133-6
- 23- Mukhopadhyay S, Poddar MK. Caffeine-induced locomotor activity: possible involvement of GABAergic-dopaminergic-adenosinergic interaction. *Neurochem Res* 1995; 20(1): 39-44

- 24- Guillet R, Dunham L. Neonatal caffeine exposure and seizure susceptibility in adult rats. *Epilepsia* 1995; 36(8): 743-9
- 25- Bona E, Aden U, Fredholm BB, Haghberg H. The effect of long term caffeine treatment on hypoxic-ischemic brain damage in the neonate. *Pediatr Res* 1995; 38(3): 312-8
- 26- Allen DG, Westerblad H. The effects of caffeine on intracellular calcium, force and the rate of relaxation of mouse skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 1995; 487: 331-42
- 27- Reiser MA, D'Souza T, Dryer SE. Effects of caffeine and 3-isobutyl-1-methylxanthine on voltage-activated potassium currents in vertebrate neurones and secretory cells *Br J Pharmacol* 1996; 118(8): 2145-51
- 28- De Sarro A, Grasso S, Zappala M, Nava F, De Sarro G. Convulsant effects of some xanthine derivatives in genetically epilepsy-prone rats. *Author Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 356(1): 48-55
- 29- Manuchair Ebadi. Core concepts in pharmacology. New York: Lippincott-Raven publishers, Chapter 34 1997: 153-154
- 30- Bertram G, Katzung MD, PhD, Kanu Chatterjee MB, FRCP. Vasodilators & the treatment of angina pectoris. In Katzung BG, ed. *Basic and Clinical Pharmacology*. Lebanon: Middle East Edition, 1989: 140-151
- 31- Manthorpe M. Neural cells in Microcultures. In Fedoroff S, Richardson A, ed. *Protocols for neural cell culture*. New Jersey: Humana Press, 1997: 91-106
- 32- Xu J, Wojcik WJ. Gamma aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: Blockade by islet activating protein. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239: 568-73.
- 33- Davis JM. *Basic cell culture; a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1994: 116
- 34- Marret S, Delpech B, Girard N, Leroy A, Maingonnat C, Menard JF, Fessard C. Caffeine decreases glial cell number and increases Hyaluronan secretion in newborn rat brain cultures. *Pediatr Res* 1993; 34: 716-9.
- 35- Schlegel R, Pardee AB. Caffeine induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. *Science* 1986; 232: 1264-6

- 36- Chin JH. Adenosine receptors in brain: neuromodulation and role in epilepsy. *Ann Neurol* 1989; 26; 695-8
- 37- Choi D. Early pathophysiology and treatment stroke. *Stroke* 1994; 25: 1877-8
- 38- Wimalaratna HSK, Capildeo R. What dosage of nimodipine for stroke? A randomized double blind controlled trial comparing two doses of nimodipine in acute ischemic stroke. *Neurol India* 1989; 37(1): 147
- 39- Gepdiremen A, Sönmez S, Batat I, Esrefoğlu M, Düzenli S, Süleyman H. Nimodipine ameliorates kainic acid induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture: A double blind dose response study (In press).
- 40- Bielenberg GW, Beck T, Saver D, Burnoil M, Krieglstein J. Effects of cerebroprotective agents on cerebral blood flow and on postischemic energy metabolism in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 480-488
- 41- Dolin SJ, Hunter AB, Halsey MJ, Little HJ: Anticonvulsant profile of the dihydropyridine calcium channel antagonists, nitrendipine and nimodipine. *Eur J. Pharmacol* 1988; 152(1-2): 19-27
- 42- Popoli P, Pezzola A, Seotti de Carolis A. Effects of calcium antagonist nimodipine on pentylentetrazole-induced seizures in rats and rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1988; 292: 58-67
- 43- Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM, Yaksh TL, Sharbrough FW. Suppression of pentylentetrazol seizures by oral administration of a dihydropyridine calcium antagonist. *Epilepsia* 1987; 28(4): 409-14
- 44- Scriabine A, Schuurman T, Traber J. Pharmacological basis for the use of nimodipine in central nervous system disorders 1989; 3(7): 1799-806
- 45- De Falco FA, Bartiromo U, Majello L et al. Calcium antagonist nimodipine in intractable epilepsy. *Epilepsia* 1992; 33(2): 343-5
- 46- Sun X, Windebank AJ. Calcium in suramin-induced rat sensory neuron toxicity in vitro. *Brain Res* 1996; 742 (1-2): 149-56
- 47- Meissner G. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 485-508

- 48- Chen TH, Lee B, Yang C. Effects of caffeine on intracellular calcium release and calcium influx in a clonal beta-cell line RINm5F. *Life Sci* 1996; 58(12): 983-90
- 49- Islam MS, Rorsman P, Berggren PO. Ca(2+)-induced Ca2+ release in insulin-secreting cells. *Febs lett* 1992; 296(3): 287-91
- 50- Wolf BA, Comens PG, Ackermann KE, Sherman WR, McDaniel ML. The digitonin-permeabilized pancreatic islet model. Effect of myo-inositol 1,4,5-trisphosphate on Ca2+ mobilization. *Biochem J* 1985; 227(3): 965-9