

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİRKADİYEN RİTİM BOZUKLUKLARININ PEROKSİZOMAL LİPİD
METABOLİZMASINA ETKİSİ**

Hüsniye Gül OTLU

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
TDK-2017-601 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2019**

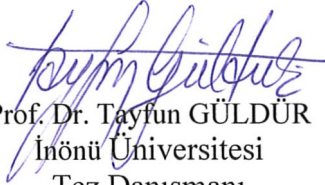
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Hüsniye Gül OTLU'nun "Sirkadiyen Ritim Bozukluklarının Peroksizomal Lipid Metabolizmasına Etkisi"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/06/2019




Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye



Prof. Dr. Nevin İLHAN
Fırat Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Necip İLHAN
Fırat Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Elif GÜREL
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2019 tarih ve 2019/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.



Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	Vi
ABSTRACT	Vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	Viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	Xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sirkadiyen Ritim	4
2.1.1. Sirkadiyen Ritmin Moleküler Temeli	4
2.2. Sirkadiyen Ritim Bozukluğu	7
2.2.1. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarının Önemi	8
2.2.2. Deneysel Çalışmalarda Memeli Sirkadiyen Ritminde Değişikliklerin Oluşturulması	10
2.2.3. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarında Değişim Gösteren Metabolitler.....	10
2.2.4. Merkezi (Master) ve Periferel Sirkadiyen Saatler Arasındaki Uyuşmazlığın Değerlendirilmesi	12
2.3. Merkezi Saatin Elçi Hormonları: Melatonin ve Kortikosteron	13
2.4. Peroksizomlar	15
2.4.1. Peroksizomların Biyogenezi	15
2.5. Peroksizomların Fonksiyonları	15
2.5.1. Peroksizomal H ₂ O ₂ Detoksifikasyonu:	16
2.5.2. Çok Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Metabolizması.....	16
2.5.3. Plazmalojenler ve Sentezi	17
2.5.4. Safra Asit ve Tuzlarının Sentezi	20
2.5.5. Fitamik Asit Alfa-Oksidasyonu	21
2.5.6. Gliokzalat Detoksifikasyonu.....	23
2.6. Peroksizomal hastalıklar	24
2.7. Nükleer Reseptörler	24
2.7.1. PPAR'lar ve Peroksizomlar.....	25

3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Deney Hayvanı Temini	28
3.1.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve alışma Protokolü	28
3.1.2. Numunelerin Hazırlanışı	28
3.2. Plazmalojen Analizi	30
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanışı	30
3.2.2. Enstrümental Analiz:	30
3.3. Çok Uzun Zincirli Yağ Asitleri, Pristanik Asit ve Fitamik Asit Analizleri.....	31
3.3.1. Çözeltilerin Hazırlanışı:	32
3.3.2. Enstrümental Analiz:	32
3.4. Melatonin Analizi	34
3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanışı	35
3.4.2. Enstrümental Analiz:	35
3.5. Plazma Kortikosteron Analizi.....	38
3.6. Trigliserid Analizi.....	39
3.7. Karaciğer Dokusu İmmünohistokimyasal Analizi.....	40
3.8. İstatistiksel Analizler	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Ratların Canlı Ağırlık Değişimi.....	42
4.2. Sirkadiyen Ritme Etki Eden Faktörlerin Rat Kan Lipid Parametreleri Üzerine Etkileri.....	43
4.2.1. Sirkadiyen Ritim Değişimlerinin Rat Plazma Trigliserid Düzeylerine Etkisi.....	43
4.2.2. Sirkadiyen Ritim Değişikliklerinin Rat Eritrosit Membranı Plazmalojen Düzeylerine Etkileri.....	44
4.2.3. Sirkadiyen Ritim Değişikliklerinin Rat Plazma ok Uzun Zincirli Yağ Asidi Düzeylerine Etkisi.....	52
4.3. Histolojik Bulgular	55
4.3.1. Karaciğerin Genel Morfolojisi.....	55
4.3.2. Katalaz İmmünreaktivitesi.....	57
4.4. Merkezi Sirkadiyen Ritimle İlgili Plazma Parametreleri.....	59
4.4.1. Rat Plazma Kortikosteron ve Melatonin Düzeyleri.....	59
4.5. Sirkadiyen Ritim Değişikliklerinde Melatonin Referansında Bazı Lipid Parametrelerinin Oranları.....	62

5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR	76
EKLER	90
EK 1. ÖZGEÇMİŞ	90
EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ	91



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Tayfun Güldür'e, tez çalışmamda emeği geçen İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Selim Erdoğan'a, Biyoistatistik ve Tıp bilişimi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Saim Yoloğlu'na, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Nigar Vardı ve Dr. Azibe Yıldız'a ve yaklaşık 9 yıldır birlikte çalıştığımız kıymetli Turgut Özal Tıp Merkezi, Merkez Laboratuvarı personeline ve değerli mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

TDK-2017-601 numaralı tez projemin mali desteğini sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi personeline; projenin analizlerinde emeği geçen Jasem Laboratuvar Sistem ve Çözümleri Sanayi ve Ticaret A.Ş., Synlab Lab-Referans M-B Sağlık Laboratuvar Hizmetleri San. Tic. A.Ş.'ye ve Nobel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ye teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili eşim Dr. Önder Otlu'ya ve sevgili aileme teşekkürü borç bilirim.

ÖZET

Sirkadiyen Ritim Bozukluklarının Peroksizomal Lipid Metabolizmasına Etkisi

Amaç: Sirkadiyen ritim bozuklukları modern yaşam şartları altında oldukça yaygınlaşmış olup kanser, metabolik sendrom, diyabet gibi kronik hastalıkların patogeneğinde önemli bir yer tutmaktadır. Uyku düzensizliklerine bağlı sirkadiyen ritim bozukluklarıyla ilgili serum lipidomiks çalışmaları peroksizomal bir metabolit olan plazmalojen düzeylerinin arttığını göstermiştir. Buradan yola çıkarak çalışmamızda, farklı etkenlerle oluşturulan sirkadiyen ritim bozukluklarının peroksizomal lipid metabolizmasını etkileyip etkilemediğini belirlemeyi amaçladık.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda, ratlara iki hafta boyunca sirkadiyen ritmi etkilediği bilinen kalori kısıtlaması, yemleme süresinin sınırlanması ve sürekli aydınlığa maruz bırakma gibi kısıtlamalar uygulandı. Aynı süre zarfında bir başka gruba peroksizomal aktivasyonu sağlamak amacıyla fenofibratlı yemler verildi. Peroksizomal metabolitler olan plazmalojenler eritrosit membranında, GC; çok uzun zincirli yağ asitleri, pristanik asit ve fitanik asit düzeyleri ise plazmada, GC-MS yöntemi ile analiz edildi. Karaciğerde peroksizomal aktivasyon immunohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

Bulgular: Eritrosit membranında FF, SA ve KK gruplarında plazmalojen seviyeleri kontrole göre düşük bulundu. Membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan bazı PUFA'lar azalırken, palmitik asit seviyesi artış gösterdi. Peroksizomal lipid metabolizması FF'de aktifken KK grubunda inaktifti. Sirkadiyen ritim bozukluğu oluşturulan gruplarda karaciğerde hidropik değişikliklerle birlikte katalaz immünreaktivitesinde artış gözlemlendi.

Sonuç: Sirkadiyen ritmi bozan etkenler, eritrosit membranı üzerinde benzer etkiler yaratırken, peroksizomlar üzerinde farklı etkiler yarattı. Dolayısıyla sirkadiyen ritim bozukluklarında eritrosit membranı fosfolipid kompozisyonunun değerlendirilmesinin bu bozuklukların teşhis ve tedavisinde bir yol gösterici olabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi, sirkadiyen ritim, peroksizom, plazmalojen, yağ asidi.

ABSTRACT

Effect of Circadian Rhythm Disturbances On Peroxisomal Lipid Metabolism

Aim: Circadian rhythm disorders are common in modern life conditions and they are involved in pathogenesis of cancer, metabolic syndrome, diabetes and other chronic diseases. Lipidomic studies revealed that circadian rhythm disorders increased some plasmalogen levels, a peroxisomal metabolite. Therefore; in this study, we aimed to determine whether circadian rhythm disorders affect peroxisomal lipid metabolism.

Material and Method: Constant light exposure, calorie restriction and time-restricted feeding were applied for two weeks in order to alter circadian rhythm in rats. An another group was assigned to food supplementation with phenofibrate to evaluate and to compare peroxisomal activation. Plasmalogens were analyzed by GC method in the erythrocyte membrane; very long chain fatty acids (C22, C24, C26), pristanic acid and phytic acid levels analyzed by GC-MS method in rat plasma. Peroxisomal activation was evaluated by immunohistochemical methods in liver.

Results: Plasmalogen levels were significantly lower in the erythrocyte membrane of the FF, SA and KK groups. While some of PUFAs in the membrane phospholipids decreased whereas palmitic acid levels were increased. While peroxisomal lipid metabolism was active in FF, it was inactive in KK group. In groups with circadian arrhythmia, there was an increase in catalase immunoreactivity along with hydropic changes in the liver.

Conclusion: The various conditions that disrupt the circadian rhythm have created similar effect on erythrocyte membrane while caused different effects on peroxisomes. Therefore we conclude that the evaluation of erythrocyte membrane phospholipid composition in circadian rhythm disorders can also be a valuable tool in the diagnosis and treatment of these disorders.

Key Words: Gas chromatography-mass spectroscopy, circadian rhythm, peroxisome, plasmalogen, fatty acid.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA-NAT	: Aril alkil amin N-asetil transferaz
ABCD1	: ATP binding cassette subfamily D member 1
ACOX2	: Açıl CoA oksidaz 2
AGFS	: Alkilgliseron fosfat sentaz
BAAT	: Safra asit CoA: amino asit N-açıl transferaz
BHT	: 2,6-di-terciyer-bütül-4-hidroksitoluen
BMAL1	: Brain Muscle Arnt Like -1
CLOCK	: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CYP27A1	: Sterol 27-hidroksilaz
ÇUZYA	: Çok uzun zincirli yağ asitleri
DHA	: cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksanoik asit
DHAF	: Dihidroksiaseton fosfat
DHAF-AT	: Dihidroksiaseton fosfat açıl transferaz
DHKA	: 3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -kolestanik asit
DMA	: Dimetil asetal
E-FT	: Etanolamin fosfotransferaz
ER	: Endoplazmik retikulum
FEO	: Besinle uyarılan osilatörler
FF	: Fenofibrat eklenen yemle beslenen grup
FLPT	: Fosfolipid transfer protein
GAT	: Gliokzalat aminotransferaz
GPE	: Gliserofosfoetanolamin
GPx	: Glutasyon peroksidad
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
H-E	: Hematoksilen-eozin
IS	: Internal standart
K-FT	: Kolin fosfotransferaz
KK	: Kalori kısıtlama grubu
KN	: Kontrol grubu
LEO	: Işıkla uyarılan osilatörler
Lizo PC	: Lizofosfotidilkolin

Mel	: Melatonin
MTBSTFA	: N-ter-bütildimetilsilil-N-metiltrifluoroasetamid; 1% ter-bütildimetilklorosilan
PC	: Fosfotidilkolin
PE	: Fosfotidiletanolamin
Per	: Period
PEX	: Peroksin
PG	: Fosfotidilgliserol
PK-2	: Prokiteticin-2
Plz	: Plazmalojen
PMP70	: Peroksizomal membran protein 70
PPAR α	: Peroksizome proliferatör-activated receptor alpha
PPARE	: Peroksizome proliferatör-activated receptor alpha response element
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RXR	: Retinoid X reseptör
SA	: Sürekli aydınlık grubu
SAFA	: Doymuş yağ asitleri
SCN	: Suprakiazmatik nükleus
SHP	: Small heterodimerik partner
SKB	: Süre kısıtlı besleme grubu
SM	: Sfingomiyelin
SPE	: Katı faz ekstraksiyon
SREBP	: Sterol regülatör eleman bağlayıcı protein
TG	: Triaçilgliserol
TGF- α	: Transforming büyüme faktörü
THKA	: $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -üçhidroksi- 5β -kolestanik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No.</u>	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 2.1. Memelilerde sirkadiyen saatin moleküler regülasyon ağı.....	6
Şekil 2.2. Rat serumunda melatonin hormonunun günlük osilasyonu	14
Şekil 2.3. Rat serumunda kortikosteronun günlük osilasyonu	14
Şekil 2.4. Peroksizomal β oksidasyon sistemi.....	17
Şekil 2.5. Plazmalojen Sentezi	19
Şekil 2.6. Safra asitlerinin sentezi	21
Şekil 2.7. Fitanyik asit α -oksidasyonu.....	23
Şekil 2.8. Ligand aracılı PPAR etki mekanizması.....	26
Şekil 3.1. Sürekli aydınlık grubu rat plazma numunesine ait ÇUZYA kromatogramı ..	33
Şekil 3.2. Fenofibrat eklenen yemle beslenen grup rat plazma numunesine ait ÇUZYA kromatogramı.....	33
Şekil 3.3. Süre kısıtlı besleme grubu rat plazma numunesine ait ÇUZYA kromatogramı	34
Şekil 3.4. Melatonin standart kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 3.5. Kontrol grubunu rat plazma numunesine ait melatonin kromatogramı	36
Şekil 3.6. Kalori kısıtlama grubu rat plazma numunesine ait plazma melatonin kromatogramı.....	37
Şekil 3.7. Süre kısıtlı besleme grubu rat plazma numunesine ait melatonin kromatogramı	37
Şekil 3.8. Süre kısıtlı besleme grubu rat plazma numunesine ait melatonin kromatogramı	38
Şekil 4.1. Ratların deney öncesi ve sonrası ortalama canlı ağırlık değişimleri grafiği ..	42
Şekil 4.2. Sirkadiyen ritmi etkileyen faktörlerin rat plazma TG konsantrasyonuna etkilerinin karşılaştırmalı grafiği	44
Şekil 4.3. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C16:0 yüzdesine etkileri.....	44
Şekil 4.4. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C16 plazmalojen yüzdesine etkileri	45
Şekil 4.5. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C18:0 yüzdesine etkileri.....	46

Şekil 4.6. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C18 plazmalojen yüzdesine etkileri	46
Şekil 4.7. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde behenik asit yüzdesine etkileri	47
Şekil 4.8. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde araşidonik asit yüzdesine etkileri	48
Şekil 4.9. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde lignoserik asit yüzdesine etkileri.....	48
Şekil 4.10. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde nervonik asit yüzdesine etkileri.....	49
Şekil 4.11. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde DHA yüzdesine etkileri	50
Şekil 4.12. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma C22 düzeylerine etkisi	52
Şekil 4.13. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma C24 düzeylerine etkisi	52
Şekil 4.14. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma C26 düzeylerine etkisi	53
Şekil 4.15. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma fitanik asit düzeylerine etkisi....	54
Şekil 4.16. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma pristanik asit düzeylerine etkisi	54
Şekil 4.17. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat karaciğer hepatositlerine etkileri.....	56
Şekil 4.18. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat karaciğer hepatositlerinde katalaz immünreaktivitesine etkileri	58
Şekil 4.19. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma kortikosteron düzeylerine etkisi	60
Şekil 4.20. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma melatonin düzeylerine etkisi.....	61
Şekil 4.21. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin melatonin/kortikosteron düzeylerine etkisi.	63

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No.	Sayfa No.
Tablo 2.1. Sirkadiyen ritim bozuklukları	9
Tablo 2.2. Sirkadiyen ritim gösteren bazı lipid/lipid metabolizması ile ilgili enzimlerin farklı türlerdeki pik zamanları	12
Tablo 2.3. Peroksizomda gerçekleşen reaksiyonlar	16
Tablo 2.4. Peroksizomal hastalıklar	24
Tablo 3.1. Rat pelet yem % içeriği.....	29
Tablo 4.1. Ratların deney öncesi ve sonrası ortalama canlı ağırlık değişimleri	42
Tablo 4.2. Sirkadiyen ritmi etkileyen faktörlerin rat plazma TG konsantrasyonuna etkilerinin karşılaştırılması	43
Tablo 4.3. Eritrosit membranı plazmalojen seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması..	51
Tablo 4.4. Plazma ÇUZYA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması	55
Tablo 4.5. Hepatositlerde hidropik değişiklikler ve katalaz immünreaktivite skor sonuçları	59
Tablo 4.6. Sirkadiyen ritim değişikliklerinde rat plazma kortikosteron seviyelerinin kontrole göre değişimi	60
Tablo 4.7. Sirkadiyen ritim değişikliklerinde rat plazma melatonin seviyelerinin fenofibratlı yemle beslenen gruba göre kıyaslanması.....	60
Tablo 4.8.1. Melatonin/yağ asidi veya plazmalojen oranlarının kontrole göre değişim şeması	62
Tablo 4.8.2. Grupların melatonin/yağ asidi veya plazmalojen oranları sayısal değişim şeması	63
Tablo 4.9. ÇUZYA, plazmalojen düzeyleri ile karaciğer immunohistokimyasal analiz sonuçlarındaki kontrole göre anlamlı değişimler şeması	64

1. GİRİŞ

Sirkadiyen ritim, endojen karaktere sahip olup, yaklaşık 24 saatlik bir sürede fizyolojik ve davranışsal ritmin sağlanması ve sürdürülmesini temin etmektedir. Bu ritim her ne kadar otonom özelliğe sahip olsa da başta aydınlık/karanlık döngüsü olmak üzere, beslenme, sosyal etkileşimler, günlük aktivite gibi uyaranlarla ayarlanabilmektedir (1, 2).

Suprakiazmatik nukleus (SCN) memeli sirkadiyen saatinin merkezi olup hormonal ve nöronal sinyalleri kullanarak periferel saatleri kontrol etmektedir. Bu periferel saatler ise karaciğer, pankreas, gastrointestinal sistem, iskelet kası ve adipoz doku başta olmak üzere memelilerde vücuda dağılmış haldedir (3, 4).

Sirkadiyen bozukluk fizyolojik çalışmalarda ritim şiddetindeki azalma, bazen total olarak ritim kaybı, bazen de periferel ve merkezi sirkadiyen saatler arasındaki faz farklılıkları (faz ilerlemesi, faz gecikmesi) şeklinde ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal sirkadiyen ritimlerin zamanlamalarındaki düzenin bozulması ve aynı zamanda endojen sirkadiyen ritim ile 24 saatlik çevresel döngüsü arasındaki normal faz ilişkisinin bozulmasıdır. Farklı fizyolojik değişkenler arasındaki senkronizasyon bozuklukları da aynı zamanda sirkadiyen ritim bozuklukları olarak değerlendirilmektedir (5). Gece vardiyaları, jet lag, sosyal jet lag, uyku-uyanıklık bozuklukları gibi durumlar sirkadiyen ritim bozukluklarına yol açmakta, bu tip durumlarda ya endojen saat bozulmakta ya da saat ile çevre arasındaki uyum bozulmaktadır (6). Çalışmalar, sirkadiyen ritim bozukluklarının, nörodejenaratif, nörogelişimsel, psikiyatrik pek çok hastalık riskini arttırdığını ve çeşitli onkogen ifadelerini değiştirdiğini göstermektedir (7, 8). Özellikle bipolar bozukluk gibi duyu durum bozuklukları ile sirkadiyen ritim bozuklukları arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmekle birlikte biyokimyasal açıklaması henüz yapılamamıştır (7). Uyku bozukluğu ve sirkadiyen uyku-uyanıklık ritim bozukluğunda yaşla ilişkili nörodejenaratif bir hastalık olan Alzheimer ve Parkinson riskini arttığı bilinmektedir. Bunun nedeni yaşla birlikte SCN'den periferel saatlere giden sinyallerin bozulması sonucu ortaya çıkan merkezi ve periferel saatler arasındaki senkronizasyonun bozulmasıdır (9).

Amerika Birleşik Devletleri tarafından rapor edilen bilgilere göre, tüm çalışanların %44'ü günde 6 saatten daha kısa uyku periyoduna sahiptir. Kısa uyku periyodunun kardiyovasküler hastalıklar, obezite, tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu daha da önemlisi bu kişilerde ölüm oranlarının arttığı ve algıda yavaşlama ve güçlük gibi

problemlere yol açtığı rapor edilmiştir. Kısa uyku periyodu sonucu bozulan ritim gelişmiş ülkelerde (Kanada, Almanya, Japonya ve ABD) yılda yaklaşık 680 milyon ekonomik kayba yol açmaktadır (10).

Beslenme ritmi ve besin kompozisyonu da periferik sirkadiyen saat için önemli uyarılardır. SCN beslenme ritimini beslenme ile ilişkili hormonlar (leptin, grelin, oreksin) ile düzenleyerek periferik saatleri koordine etmektedir. Gece yemek yeme alışkanlığı sirkadiyen ritmi bozmaktadır ve bu kişiler tipik olarak obez ve depresiftir (11). Bu kişilerin genelde yüksek serum triaçilgliserol ve düşük HDL kolesterol seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir (8, 12).

Melatonin hem uykuyu indüklemesi hem de SCN'deki nöronları inhibe etmesi sebebiyle sirkadiyen zamanı gösteren en önemli indikatördür (3). Hem uykuyu hem de diğer sirkadiyen aktiviteleri koordine etmesi nedeniyle ritmin senkronizasyonu için önemli bir yere sahiptir (13). Melatonin ve kortikosteron merkezi saatten gelen çıktı sinyallerini periferik saatlere götüren hormonlar olmasına rağmen; melatonin ritmi hem daha güçlü hem de seviyelerinin daha stabil olması nedeniyle ritim çalışmalarında daha özel bir yere sahiptir (14).

Uykusuzluğun neden olduğu sirkadiyen ritim bozukluklarının tespitine yönelik bir belirteç bulmayı hedefleyen önceki çalışmaların detaylı metabolomik analizleri PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) indüksiyonuna ve peroksizomal lipid metabolizmasında değişimlere işaret etmektedir (15). Ancak sirkadiyen ritim bozukluklarının peroksizomal lipid metabolizmasını nasıl etkilediği bilinmemektedir. İlave olarak, bugüne kadar sirkadiyen ritim bozuklukları ile ilgili bu tür araştırmalar çoğunlukla uykusuzluk ile ilgili sirkadiyen ritim bozukluklarına odaklanmıştır, ancak farklı mekanizmalarla sirkadiyen ritmi etkileyen faktörler hakkında veri bulunmamaktadır. Söz konusu faktörlerin bir kısmı periferik sirkadiyen saati etkilerken diğer bir kısmı ise periferik saati etkilemekte veya sirkadiyen faz kaymalarına yol açmaktadırlar. Bu amaçla mevcut çalışmada, yeni bir yaklaşımla, sirkadiyen ritim bozukluğuna yol açan çeşitli faktörlerin bazı peroksizomal lipid metabolitlerine etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması yoluyla sirkadiyen ritim bozukluklarının tespitinde kullanılacak yeni ve güvenilir belirteçlerin araştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca, sirkadiyen ritim bozukluklarının metabolik sonuçlarının merkez ve periferik sirkadiyen saatler arasındaki senkronizasyon bozukluğundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Merkezi sirkadiyen saatin, melatoninin günlük osilasyonunu sağlayarak periferik saati senkronize ettiği bilindiğinden, analiz edilen peroksizomal lipid

metabolitlerinin (C22, C24, C26, pristanik asit, fitanik asit, plazmalojen) konsantrasyonlarının aynı numunede tespit edilecek melatonin konsantrasyonuna oranlarının, merkezi ve periferel ritim uyumsuzluklarının tespitine yönelik bir belirteç olarak kullanılabilme seçeneği değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirkadiyen Ritim

Canlı organizmalarda sirkadiyen ritim yaklaşık 24 saatlik bir sürede davranışsal, fizyolojik işlemler ve uyku/uyanıklık siklusunu kontrol eder (16). Bu ritmik osilasyonlar organizmanın çevresindeki aydınlık/karanlık döngüsünde gelmekte olan değişimleri öngörmesine olanak sağlar. Çeşitli yaşam şekilleri bu şekilde metabolizmalarını değişen çevre şartlarına adapte ederek aktivitelerini günün optimal zamanında gerçekleştirebilirler. Sirkadiyen saat dış uyarılarla ayarlanır bu şekilde saatin çevre ile senkronizasyonu (uyumu) sağlanmış olur (17-20).

Sirkadiyen saatin, biri hipotalamustaki suprakiazmatik nükleusta (SCN) diğeri ise periferel doku ve organlarda bulunan iki kısımdan oluştuğu kabul edilmektedir. Hipotalamusta bulunan ana saat ışık ile, periferel dokulardaki ise besinlerle ve SCN'den gelen uyarılar doğrultusunda ayarlanmaktadır (21, 22). Memeli sirkadiyen saati transkripsiyon, translasyon ve posttranslasyonel olayları içeren feedback (negatif) ve feedforward (pozitif) döngülerden oluşmaktadır (17, 21). Bu mekanizmalarda transkripsiyon faktörleri Clock, Bmal1 ve Rev-Erba ile Period ve Cryptochrome saat genleri rol almaktadır (22, 23).

2.1.1. Sirkadiyen Ritmin Moleküler Temeli

Organizmadaki bütün hücreler merkezi saat (SCN) tarafından gelen sinyallerle ritmik olarak düzenlenir. Memelilerde CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput), BMAL1 (Brain Muscle Arnt-Like 1) ve NPAS2 (Neuronal PAS Domain Containing Protein 2) transkripsiyon faktörleri Period (Per 1,2) ve Cryptochrome (Cry 1, 2) genlerinin ifadelerini düzenlemektedir. Oluşan protein ürünleri CLOCK ve BMAL1 transkripsiyon faktörlerini feedback olarak inhibe etmektedir. Temelde bu regülasyon sistemi ile çok miktarda genin ifadesi kontrol edilmekte böylece, metabolik ve fizyolojik fonksiyonların yönetimi sağlanmaktadır.

Memelilerde sirkadiyen saatin pozitif feedback mekanizmasında, CLOCK veya NPAS2 nükleusta BMAL1 ile heterodimerize olup, Per1-3 ve Cry 1-2 genlerinin E box promotor bölgesine bağlanarak bu genlerin ifadelerini kontrol ederler (16, 24). Farklı Per ve Cry genleri PER-PER şeklinde homolog olarak ya da CRY-PER şeklinde eşleşirler. Daha sonra PER proteini CK1 (Kasein kinaz 1 ailesi) ile fosforillenir, PER-CK1 kompleksini oluşturur. Bu kompleks artık CRY proteinlerini bağlayabilir hale gelir ve

CRY-PER-CK1 kompleksini oluşturur. Kompleks oluşumu PER proteinlerinin sitoplazmada fosforilasyonunu ve yıkımını önlemektedir.

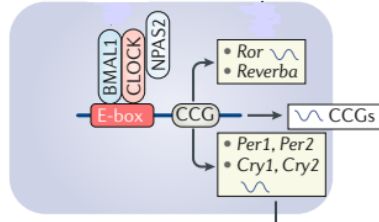
CRY-PER-CK1 kompleksi içindeki CRY ve PER'in diğer kinazlarca fosforilasyonu bunların nükleusa hareketine olanak sağlar ve nükleusa geçerek kendi transkripsiyonlarını uyararak BMAL1-CLOCK'u inhibe eder.

CRY-PER-CK1 protein kompleksi gün içinde artmakta ve akşam saatlerinde pik yapmakta bu saatlerden sonra gün doğana kadar düşüş göstermektedir. CRY-PER-CK1 kompleksi ve BMAL1-CLOCK arasındaki bu düzenlenme, saatin periyodunu belirleyen esas unsurdur (25). CK1, PER'in degradasyonunu kontrol ederken, adenosin monofosfat kinazlar (AMP kinaz) CRY proteininin fosforilasyonunu sağlamaktadır (26). Sirkadiyen transkripsiyon-translasyon feedback regülasyonunda diğer bir yolak da BMAL1'in aktivasyonu/inhibisyonudur. BMAL1'in ekspresyonu, retinoik asit ilişkili orfan reseptör elemanına bağlanan Revorb- α tarafından baskılanırken ROR- α (RAR-related retinoik asit reseptör alfa) tarafından aktive edilmektedir. Aynı zamanda Revorb- α ve ROR- α içerdiği E-box promotör bölgesi sayesinde, CLOCK ve BMAL1 tarafından ritmik olarak regüle edilmektedir. Tüm bilgiler ışığında ritmin kendi içinde birbirine bağlı pek çok mekanizma tarafından düzenlendiği söylenebilir (Şekil 2.1.) (27, 28).

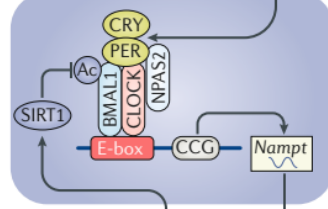
Çalışmalar memelilerde, ROR- α 'nın sabahın ilk saatlerinde pik yaptığını; Revorb- α 'nın ise akşam pik yaptığını göstermiştir. Bu etki BMAL1 ifadesini de etkilediğinden BMAL1 seviyesi, akşam artmakta sabah ise düşüş göstermektedir (25). Bunların dışında E3 ubiquitin ligaz kompleksi PER ve CRY proteinlerinin stabilitesini düzenleyerek sirkadiyen osilasyonu düzenlemektedir (29).

CLOCK ve BMAL1 kompleksi NAD⁺ biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan nikotinamid fosforibozil transferaz (NAMPT) ifadesini düzenlemektedir. Nikotinamid NAMPT enzimi ile nikotinamid mononüklotide oradan da pek çok adenosil transferaz aktivitesi ile NAD⁺'ye dönüşmektedir. Oluşan NAD'nin gün içindeki seviyeleri aslında NAMPT'nin osilasyonuna bağlıdır. NAD osilasyonu da SIRT1 (Sirtuin 1) adı verilen proteinin aktivasyonunu ve sinyalizasyonunu etkilemektedir. SIRT1 de direk olarak CLOCK ve BMAL1 ile etkileşip BMAL1'i deasetile eder ve CLOCK tarafından yürütülmekte olan transkripsiyonu durdurur. Bütün bu negatif-pozitif feedback regülasyon ağı memelilerde sirkadiyen saat modelini oluşturmaktadır (24).

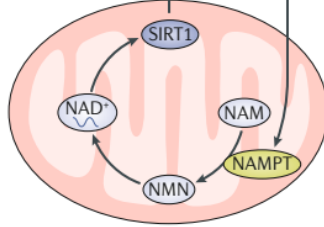
Pozitif Feedback



Negatif Feedback



Metabolik Düzenlenme



Şekil 2.1. Memelilerde sirkadiyen saatin moleküler regülasyon ağı (24)

2.1.2. Sirkadiyen Ritmin Işık ile Uyarımı

Işık uyarımı, sirkadiyen ritmi etkileyen en önemli çevresel unsurdur. Memelilerde, sadece merkezi sirkadiyen osilatör (SCN) ışık uyarımı tarafından uyarılabilirken periferel osilatörler ışığa duyarlı değildir. Bu nedenle periferel saatler ışığa duyarlı olan merkez osilatörden gelen sinyallerle uyarılabilirler (30). Retinal osilatörlerin ritmi SCN'yi etkileyebildiğinden retina önemli bir ritmik dokudur (23).

Işık impulsu retinadaki çubuk, koni hücreleri ile ışığa duyarlı olan ve melanopsin sentezleyen retinal gangliyonlarca alınır. Bu ışık bilgisi retinahipotalamik yol ile (RHT) SCN'ye iletilir ve intraselüler saat mekanizması işlemeye başlar.

RHT'de ana nörotransmitterler glutamattır (31). Glutamat SCN'de yer alan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünü aktive eder. G-protein bağlı bu reseptörün aktivasyonu intraselüler Ca^{2+} seviyesi artar ve mitojen aktif protein kinaz (MAPK) aktive olur. Bu kinazın aktivasyonu siklik AMP-response element bağlayıcı protein (CREB) adı verilen transkripsiyon faktörü fosforillenip aktif hale geçerek bazı saat ile ilişkili genlerin ifadelerini artırır (32). Bu nöronal uyarım mekanizması intraselüler Ca^{2+} ile artış göstermektedir (33). Ayrıca yapılan çalışmalar melanopsin ifadesinin azaldığı

durumlarda çubuk ve koni hücrelerinin ışığa duyarlılığının azaldığını göstermiştir (34). Işığa verilen yanıtta CREB ve MAPK aktivitesi SCN tarafından düzenlenmektedir. Bu merkez osilatör de sinyali çeşitli yollarla ışıkla uyarılabilen çevredeki osilatörlere yani, “ışıkla uyarılan osilatörler” (35) ulaştırır.

2.1.3. Sirkadiyen Ritmin Besinlerle Uyarımı

Sirkadiyen ritmin diğer bir önemli uyarını ise besinler olup pek çok farklı fiziksel ve davranışsal olayın yöneticisi olarak iş görürler. Normalde gece beslenen rodentlerde gün içinde beslenme durumunda çeşitli davranışsal ve fizyolojik aktivitelerin fazı tersine dönmüştür. Ayrıca SCN lezyonlu kemiricilerde ışık uyarını bertaraf edilerek, kısıtlı besleme çalışmaları yapılmış ve bir uyarım elde edilebilmiştir. Bütün bu bulgular organizmada LEO'dan başka besinlerle uyarılabilen osilatörlerin (FEO) varlığını göstermektedir (36). Bu osilatörler uyarımı hem besin alım zamanına hem de alınan besinlerin kompozisyonuna bağlıdır (37). Besinlerle uyarılan bu periferik osilatörler aynı zamanda ışık uyarını da alabilmektedir. Bu olay FEO'ların anatomik olarak yerinin dorsomedyal hipotalamus (DMH) olabileceğini, esas görevlerinin ise beslenme ile aktivite arasındaki bağlantıyı sağlamak olduğunu düşündürmektedir (38).

Besinlerin bir sinyale dönüşmesi ve sonra buna hücre/organ/organizma düzeyinde cevap verilmesi oldukça karmaşık mekanik ve moleküler bir dizi olayı kapsamaktadır. Temelde besinlerin sindirim işleminin ardından intestinal mukozayla etkileşime geçmesiyle humoral ya da vagal sinyaller oluşur. Sindirim sistemi ve beyin iş birliğiyle bir uyarım gerçekleştirilmiş olur (36). Besinlerin sindirimini de kapsayan metabolik faaliyetlerin tümü sirkadiyen saat tarafından oluşturulan ritme tabidir yani besin sinyalizasyon yolağı ve elde edilen cevaplar ritmiktir.

2.2. Sirkadiyen Ritim Bozukluğu

Sirkadiyen ritmin merkezi olan SCN, dünyanın rotasyon hareketi ile uyarılarak dış çevreye uyum sağlar. Sirkadiyen sistem girdi ve çıktı sinyallerinden oluşmaktadır (39). Sirkadiyen ritim her ne kadar endojen olsa da girdi adı verilen sinyaller ile yönlendirilebilmektedir. Örneğin; retinal ışık uyarını organizmanın iç saat ile dış çevre arasındaki uyumu sağlayan ana etkidir (40). Bunun yanı sıra beslenme rejimi, fiziksel aktivite, melatonin gibi hormonlar, jet lag, gece vardiyalarında çalışılması gibi uyarılar da sirkadiyen ritmi etkilemektedir. Bu tip uyarılar ritmin saatini etkilediğinden “zamanlayıcılar” (zeitgebers) olarak adlandırılır (41). SCN; bu tip çevresel uyarılarla iç saat ile dış saati arası uyumu sağlarken diğer taraftan, hormonal ve sinaptik

mekanizmalarla periferel dokulardaki osilatörleri yönetmekte ve ritmin senkronizasyonunu sağlamaktadır. Osilatörden gelen sinyali açık bir ritim oluşturmak üzere periferdeki dokulara ulaştıran döngüye çıktı döngüsü denir (39). Periferel saatler genelde SCN'den aldığı uyarılarda uyarılırken, beslenme zamanı SCN'den bağımsız olarak periferel saatleri uyarmaktadır (42).

SCN' de oluşturulan sinyallerin beyindeki veya organizmanın diğer bölgelerinde bulunan periferel osilatörlere nasıl ulaştığı henüz netlik kazanmamıştır. SCN'de yer alan nöronların transforming büyüme faktörü alfa (TGF- α), prokiteticin-2 (PK-2), gama amino bütirik asit, vazoaktif intestinal peptid ve arginin-vazopressin peptid gibi bazı hormon ve nörotransmitterlerin sentez ve salınımını ritmik bir şekilde gerçekleştirdiği bilinmektedir. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar bunlardan TGF- α ve PK-2'nin SCN membranından geçebildiğini ve beyinin diğer bölgelerindeki osilatörlere sinyal taşıdığını belirlenmiştir (43).

Genetik ve çevresel dalgalanmalar ritmin bozulmasına yol açmaktadır (44). Sirkadiyen ritim bozukluğu; fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal sirkadiyen ritimlerin zamanlamalarındaki düzenin bozulması ve aynı zamanda sirkadiyen ritim ile 24 saatlik çevresel döngüsü arasındaki normal faz ilişkisinin bozulmasıdır. Jet lag, gece vardiyalarında çalışılması, görme kaybı gibi durumlar iç saat ile dış çevre arasındaki senkronizasyonu bozmaktadır (40). Sirkadiyen bozukluk fizyolojik çalışmalarda ritim şiddetindeki azalma, bazen total olarak ritim kaybı, bazen de periferel ve merkezi sirkadiyen saatler arasındaki faz farklılıkları (faz ilerlemesi, faz gecikmesi) şeklinde ortaya çıkmaktadır. Farklı fizyolojik değişkenler arasındaki senkronizasyon bozuklukları da aynı zamanda sirkadiyen ritim bozuklukları olarak değerlendirilmektedir (5).

2.2.1. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarının Önemi

Sirkadiyen ritim bozuklukları ile obezite ve metabolik sendrom arasında önemli bağlantılar ortaya konulmuştur. Geç uyuma, geç yemek yeme ve düzensiz beslenme zamanları sirkadiyen ritim bozukluklarının önemli nedenlerindedir. Özellikle uyku yokluğu olan kişilerde inflamasyon, tip II diyabet, kardiyovasküler ve nöro-endokrin hastalık riski artmaktadır (45).

Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık %20'sinin gece vardiyasında çalıştığı tahmin edilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar gece vardiyası çalışanları arasında obezite, hipertrigliseridemi, düşük HDL-kolesterol, diyabet ve kardiyovasküler hastalık

risklerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ritmin senkronizasyonun bozulmasıyla total uyku miktarı azalır ve bu popülasyondaki bireylerde gastrointestinal sistemde bozukluklar, metabolik sendrom, diyabet, kalp hastalıkları, kanser gibi ciddi hastalıklara yakalanma riski artmaktadır (46). Sirkadiyen ritmi etkileyen en önemli faktör uyku düzenidir. Son yıllarda çeşitli sirkadiyen uyku bozukluğu tanısı alan hasta sayısında artış gözlemlenmektedir. Sirkadiyen uyku bozuklukları temelde ya endojen saatin bozukluğundan ya da endojen saat ile dış çevre arasındaki uyumun bozulmasından ileri gelmektedir. Gecikmiş uyku fazı bozukluğu, erken uyku fazı bozukluğu, düzensiz uyku-uyanıklık ritim bozukluğu, serbest ilerleyen uyku-uyanıklık ritim bozukluğu iç saatin bozulması sonucu oluşurken, farklı zaman bölgelerine seyahatler ve akşam vardiyasında çalışılması, çevresel ve sosyal yaşantının değişmesi iç saat ile dış çevre saati arasındaki uyumsuzluk sonucu meydana gelmektedir (47).

Miyokardiyal infarktüsler, ani kardiyak ölümler, pulmoner emboli, kol-bacak iskemileri ve aortik anevrizma yırtılmaları gibi ciddi sonuçları olan kardiyovasküler olaylar belirgin bir sirkadiyen ritme sahiptir. Örneğin; insanlarda miyokard infarktüsünün en sık 05:00-08:00 ve 17:00-20:00 saatleri arasında gerçekleştiği bildirilmiştir (48). Sirkadiyen saatteki bozukluklar obezite, diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar, trombozis ve inflamasyon gibi hastalıklar için risk faktörü oluşturmaktadır. Kronik sirkadiyen bozukluk bu tür hastalıklara duyarlılığı artırmaktadır. Örneğin, gece vardiyası 45-55 yaş arası kadın ve erkeklerde kardiyovasküler hastalık riskini 1.6 ile 3 kat artırmaktadır (26, 27). Gece yemek yeme diğer bir sirkadiyen ritim bozukluğu örneğidir ve bu tür kişiler tipik olarak obezdir (5).

Tablo 2.1. Sirkadiyen ritim bozuklukları (49)

a. Gecikmiş Uyku Fazı Bozukluğu
b. Erken Uyku Fazı Bozukluğu
c. Düzensiz Uyku-Uyanıklık Tipi Uyku Bozukluğu
d. Gece Vardiyası tipi Uyku Bozukluğu
e. Jet Lag Tipi Uyku Bozukluğu
f. Serbest İlerleyen Tip Uyku Bozukluğu

2.2.2. Deneysel Çalışmalarda Memeli Sirkadiyen Ritminde Değişikliklerin Oluşturulması

Memelilerde pek çok metabolik yolak sirkadiyen ritmin kontrolü altındadır. Lipogenez, lipid katabolizması, sterol metabolizması, glikoz homeostazisi (glikojen ve glukoz metabolizması) ritmin kontrolünde olan başlıca metabolik yollardır. Bu yollardaki kritik enzimlerin ifadeleri sirkadiyen saat tarafından düzenlenmektedir (36, 50, 51). Besinlerin periferal osilatörler için güçlü bir ritim belirleyici (zeitgeber; zamanı ayarlayan) vasıta olması sebebiyle besleme rejimlerinin değiştirilmesi, sirkadiyen ritim çalışmalarında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Bu amaçla kullanılan besleme rejimlerinden birisi yem verme süresinin sınırlandırılmasıdır (restricted feeding). Bu tip çalışmalarda, besinlerini her gün ad libitum alan hayvanların gün içerisinde ancak birkaç saat yeme ulaşmalarına müsaade edilmektedir. Bu besleme rejiminin periferal dokulardaki sirkadiyen osilatörleri etkilediği ancak merkezi sinir sisteminde bulunan, merkezi sirkadiyen ritim belirleyici mekanizmayı etkilemediği bildirilmiştir. Bir diğer beslenme rejimi ise kalori sınırlandırmasıdır. Kalori kısıtlaması, deneklerin günlük kalori ihtiyacının yalnızca %25-60'ının sağlanmasıdır. Bu tür besleme rejimi hem merkezi sinir sisteminde bulunan sirkadiyen saati etkilemekte hem de periferal saati etkilemektedir (52, 53). Bunların dışında beslenme zamanının değişmesi de sirkadiyen ritmi etkilemektedir. Beslenme saati alışkanlığının değişmesi periferal saatler üzerinde belirgin değişime neden olurken, merkezi saat üzerinde etkisi oldukça kısıtlıdır. Örneğin gece beslenen hayvanlar besin gereksiniminin hemen hemen hepsini gece saatlerinde karşılarlar. Bu nokturnal beslenme alışkanlığı tersine döndürüldüğünde yani bu hayvanlar gündüz beslenmeye başladığında periferal saatlerin fazı değişmekte ve yeni beslenme rejimine ancak 14 gün sonra adapte olabilmektedir (54).

Memelilerin sürekli aydınlığa maruz bırakılması sirkadiyen ritimlerinde senkronizasyon bozukluklarına (55), lokomotor aktivite ritminde sirkadiyen faz kaymalarına yol açmaktadır (56).

2.2.3. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarında Değişim Gösteren Metabolitler

Uyku sınırlandırmasının bir sonucunun sirkadiyen senkronizasyondaki bozulmalar olması sebebiyle, uyku sınırlandırılması yapılmış rat ve insanlarda detaylı metabolik profil çalışmaları yapılmıştır. Değişen metabolitler arasında, okzalik asit ve diaçilgliserolün (36:3) her iki türde de önemli oranda azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, daha kısa zincirli triaçilgliserollerin birikiminin işaret ettiği uzun zincirli yağ asitlerinin β -

oksidasyonlarındaki azalmanın yanı sıra bazı fosfolipidlerdeki ve oksidasyon ile bağlantılı metabolitlerdeki artış, PPAR yoluyla peroksizomların aktivasyonu şeklinde yorumlanmıştır (15).

Yine insanlarda akut uyku sınırlandırılmalarında yapılan metabolik profil çalışmalarında, 27 metabolitin önemli oranlarda artış gösterdiği, bu 27 metabolitin 13'ünün gliserofosfolipid olduğu ortaya konulmuştur. Bunlar arasında lizoPC (lizofosfatidil kolin) (C14:0), lizoPC (C18:1), PC (fosfatidilkolin) (C32:0, 32:1, 32:3, 34:4, 36:6, 38:4, 40:5, 40:6) gibi fosfolipidler bulunmaktadır (57). Fare plazmasında sirkadiyen osilasyon gösteren lipidler arasında çeşitli tipte lizofosfatidil kolinler (18:1, 22:4, 22:6, 22:5, 20:4, 20:3, 20:2) LC-MS analizleri ile tespit edilmiştir (58). İnsan kanında sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitler arasında PG (18:1, gliserofosfolipid) ve lizofosfolipid (LizoPC (16:1)) gösterilmiştir (59). Bunların yanı sıra kronik uyku kısıtlaması modeli uygulanan ratlarda plasmalojen ve sfingolipidlerin hepatik sirkülasyonlarının önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir (60).

Sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitler ile sirkadiyen ritim bozukluklarında düzeyleri değişen metabolitler, fosfolipidler üzerinde kesişmektedir. Peroksizomların diaçilgliserol ve eter bağlı fosfolipidler ürettiği göz önüne alındığında sirkadiyen ritim bozuklukları ve peroksizomal metabolizma arasındaki bağlantı düşünülebilir.

Bir hafta boyunca uykusuzluğa maruz bırakılmış insanlarda transkriptom analizleri sonucunda 711 genin aktivitesinin değiştiği, ve etkilenen genlerin sirkadiyen ritim (PER1, PER2, PER3, CRY2, CLOCK), uyku homeostazisi, oksidatif stres ve metabolizma ile ilgili oldukları belirtilmiştir. Ayrıca yetersiz uyku sirkadiyen ekspresyon gösteren genlerin sayısını ve ekspresyon şiddetlerini azaltmıştır. Etkilenen biyolojik faaliyetler, kromatin modifikasyonu, gen ekspresyon regülasyonu, immün ve stres yanıt mekanizmalarıdır (61). İnsanlarda uykusuz bırakma sonucunda 27 metabolit (bazıları; açilkarnitin, gliserofosfolipid ve sfingolipid) önemli oranda artış göstermiştir (57, 59). Bu moleküler zaman tablosu metodu oldukça optimize edilmiş ve kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarına (kronoterapi) katkıda bulunabilir. Kronoterapi; metabolomik çalışmaların da yardımıyla kişiye özel beslenme programlarının yapılmasını ya da hastaya özel ilaç dağılımının senkronize edilmesi gibi çok önemli katkılar sağlayacaktır.

Tablo 2.2. Sirkadiyen ritim gösteren bazı lipid/lipid metabolizması ile ilgili enzimlerin farklı türlerdeki pik zamanları

Tür	Lipid/Enzim	Pik Zamanı	Referans
Rodent	TG	Aktif periyodun başı	(54, 62)
İnsan	TG, DAG	Uyandıktan 8 saat sonra ve 20 saat sonra	(54, 62-64)
İnsan	ApoB48	10:00, 14:00, 18:30- 19:00 arası pik yapar	(62)
İnsan	HMG CoA redüktaz aktivitesi	Gündüz	(62)
Rodent	Kolesterol	24:00-04:00 pik	(62)
Fare	PPAR- α	Aktif periyodun başı	(63)
Fare	Cyp7A1	Aktif periyodun başı	(63)
İnsan	DHA, EPA	12:00	(63)
Fare	LysPC	Aktif periyodun başı	(63)
Fare	36:1 PC	Gece en düşük	(63)
İnsan	Gliserofosfolipid türleri	Aktif periyodun başı	(63)

2.2.4. Merkezi (Master) ve Periferik Sirkadiyen Saatler Arasındaki Uyuşmazlığın Değerlendirilmesi

Hipotalamik suprakiazmatik nükleus (SCN) merkezi sirkadiyen osilatör olarak kabul edilmektedir. Buna ilaveten, çoğu memeli hücrelerinin periferik saat olarak adlandırılan ve merkezi sirkadiyen saat ile benzer moleküler mekanizmalara sahip kendi sirkadiyen saatleri mevcuttur. Merkezi saat periferik saatler ile çeşitli sinirsel ve humoral sinyaller vasıtasıyla iletişim kurarak bu lokal saatleri senkronize ederler. Glukokortikoidler, SCN ve periferik saatler arasındaki hormonal bağlantının sağlanmasında önemli vasıtalarlardır. Glukokortikoidlerin karakteristik özelliklerinden birisi belirgin şekilde günlük ritim göstermeleridir. Dolaşımdaki glukokortikoid düzeyleri aktivite periyodunda (nokturnal türler için gece) daha yüksektir ve en yüksek değerlere

aktif periyodun başında ulaşırlar. Glukokortikoidlerin sirkadiyen sistemin senkronizasyonunda anahtar rollerinin bulunduğu bilinmektedir. SCN dolaşımdaki glukortikoid düzeylerinin günlük osilasyonu ağırlıklı olarak hipotalamus-hipofiz-adrenal bez nöroendokrin aksını regüle ederek gerçekleştirmektedir (65).

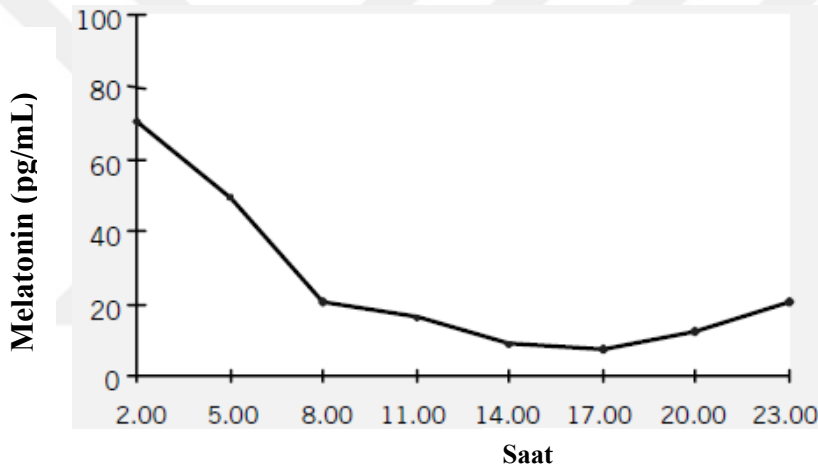
Merkezi ve periferel saatler farklı faktörler tarafından senkronize edilmektedir ve farklı çevresel veya fizyolojik uyarılara cevap vermektedirler. SCN'de bulunan merkezi saat ışık ile senkronize edilirken, periferel saatler beslenme ritmi ile senkronize edilmektedir. Beslenme zamanının değiştirmesiyle nokturnal kemiricilerin gündüz yemeye zorlanması karaciğer ve diğer periferel dokulardaki saat genlerinin RNA ekspresyonunun fazını 12 saat kadar değiştirebilmekte, ancak SCN'deki gen ekspresyonu aydınlık/karanlık döngüsüne bağlı kalmaya devam etmektedir (66). Sirkadiyen ritim bozukluklarına yol açan durumlarda (örneğin besin kısıtlaması, uyku sınırlaması) merkezi ve periferel sirkadiyen saatler arasındaki senkronizasyonun bozulabileceği bildirilmiştir. Örneğin besinlerin sadece aydınlık fazda verilmesi periferel saatte kaymalara sebep olurken merkezi sirkadiyen saati etkilememektedir (65).

2.3. Merkezi Saatin Elçi Hormonları: Melatonin ve Kortikosteron

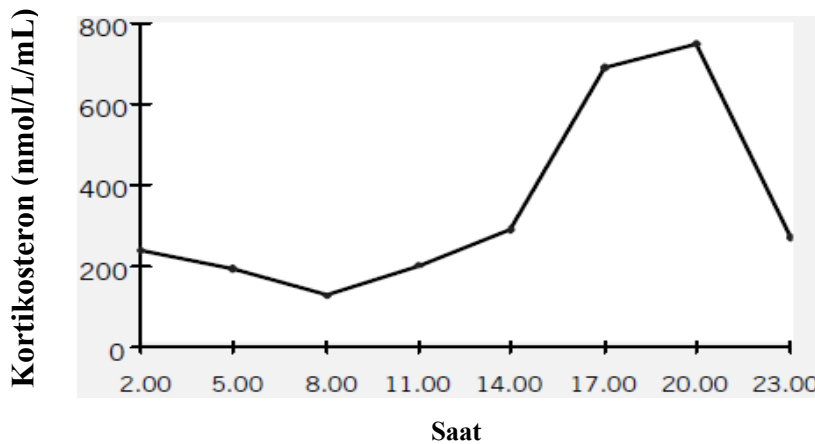
Melatonin ve kortikosteron merkezi saat tarafından kontrol edilen, metabolik faaliyetlerin ve enerji dengesinin sağlanmasında önemli hormonlardır. Kortikosteron piki aktif periyodun başında, gündüzden geceye geçiş sürecinde gerçekleşirken, melatonin piki aktif periyodun tam ortasında gerçekleşmektedir (67). Kortikosteron, kemirgenlerde baskın glukokortikoid olup karaciğer, akciğer, böbrek ve tükürük bezlerinde bulunan periferel saatlerdeki saat genlerinin ifadelerini düzenlemektedir. Kortikosteron reseptörleri ise SCN hariç vücuda dağılmış durumdadır. Bir merkezi saat geni olan Per1 promotor bölgesinde kortikosteron response elementi bulundurmakta ve bu genin ifadesi büyük ölçüde bu hormon tarafından SCN ve periferel saatlerde regüle edilmektedir. Ayrıca kortikosteronun Per2 ve *Reverb- α* ifadelerini direk olarak kontrol ettiği bilinmektedir (68, 69).

Melatonin triptofan aminoasidinden sentezlenmektedir ve pineal bezde depo edilmez, sentezini takiben sekrete edilir. Sentezinde ilk olarak triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofana (5-HT) dönüşür. 5-HT'nin ise melatonine dönüşümünde iki enzim görev almaktadır. İlk olarak aril alkil amin-N-asetil transferaz (AA-NAT) ile asetilasyona uğrayarak N-asetil serotonini oluşturur. İkinci aşamada ise hidroksiindol-o-metil transferaz enzimi s-adenozil metiyoninden metil grubunun

transferini katalizleyerek melatoninini oluşturur. Çalışmalar AA-NAT'ın melatonin sentezinin regülasyonunu sağlayan enzim olduğunu ve gece saatlerinde yüksek düzeyde eksprese edildiğini göstermiştir (14). Memelilerde pineal bezden melatonin sekresyonu SCN'ye lokalize olan merkezi sirkadiyen saat tarafından düzenlenmektedir (70). Bu merkezi saat üzerinde MT1 ve MT2 olarak adlandırılan ve melatonine spesifik 2 reseptör bulunmaktadır. Bu reseptör düzeyleri yaklaşık 24 saatlik periyot içinde değişim göstermekte ve gece saatlerinde pik yapmaktadır (71). Açlık, yeniden besleme durumlarında melatonin ve onun anahtar regülatörü AANAT seviyeleri ince bağırsakta artış göstermiştir. Ayrıca ratlarda besin tüketim miktarı ya da gün içinde besine ulaşma zamanının uzunluğu melatonin ritmini etkilemekte, açlığın ANAAT aktivitesini düşürmektedir (72).



Şekil 2.2. Rat serumunda melatonin hormonunun günlük osilasyonu (73)



Şekil 2.3. Rat serumunda kortikosteronun günlük osilasyonu (73)

2.4. Peroksizomlar

Peroksizomlar, fonksiyonları oldukça geç anlaşılmış ökaryotik multifonksiyonel organellerdir. Çevresel uyarılara, gelişimsel ve selüler değişikliklere yanıt olarak sayı, büyüklük ve morfolojilerini hızlı bir şekilde değiştirme özelliğine sahiptirler. Bilim dünyasının peroksizomları ilk keşfi 1958’li yıllarda gerçekleşmiş ve ilk olarak karaciğer ile böbrek dokularında yer alan kristalize çekirdeğe sahip tek kat membran içeren granülize matriksli bir organel olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları adipoz dokuda lipid damlacıkları içerisinde, bunun yanı sıra intestinal mukozada ve beyinde de çok sayıda bulunduğu ortaya çıkmıştır (74).

2.4.1. Peroksizomların Biyogenezi

Peroksizomların orijinleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu konuyla ilgili farklı hipotezler mevcuttur. Bu hipotezlerden ilki mevcut zarlı organellerin büyümesi ve parçalanması sonucu oluştuğunu ileri sürerken, organelde var olan kopya kalıpların kullanıldığı yönünde de bilgiler bulunmaktadır. Çalışmalar peroksizomların kloroplast ve mitokondri gibi semi-otonom organeller olduğunu belirlemiştir. Yani peroksizomların da ancak var olan peroksizomlardan oluşabildikleri ileri sürülmektedir. *Sacharomyces cerevisia* ER’si üzerinde yapılan çalışmalar peroksizom biyogenezinin burada başladığını göstermiştir. Dolayısıyla bu bilgiler ışığında peroksizomların hem var olan peroksizomlardan hem de ER’de de novo sentezlendiğini söylenebilir. Veziküllerin peroksizomların prekürsörü olduğu ve ER’den tomurcuklanıp ayrıldığı belirlenmiş ve bu da luminal devamlılığı sağlayarak peroksizomal içeriğin transportuna imkan sağlamıştır (74, 75).

Peroksizomların biyogenezi ile ilgili faktörleri kodlayan ve peroksin adı verilen 30 adet esansiyel PEX (peroksin) geni tanımlanmıştır. Bu genlerin bazıları peroksizom membran biyogenezinde görev almakta (Pex3p, Pex16p ve Pex 19p) bazıları ise proteinlerin içeriye alınması (peroksinler) ve peroksizom bölünmesinde görev yapmaktadır (Pex11p β) (76).

2.5. Peroksizomların Fonksiyonları

Tüm hayvan hücrelerinde peroksizomlar kolesterol sentezi, safra asit ve tuzlarının sentezi, poliamin, D-aminoasitlerin metabolizması, çok uzun zincirli yağ asitlerinin (ÇUZYA) beta oksidasyonunda görev alırlar (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Peroksizomda gerçekleşen reaksiyonlar (76)

Reaksiyon	Görevli Enzim
Solunum	H ₂ O ₂ üreten oksidazlar
H ₂ O ₂ detoksifikasyonu	Katalaz
ÇUZYA β oksidasyonu	Açıl CoA oksidaz, bifonksiyonel protein, tiyolaz
Eter gliserofosfolipid sentezi	DHAF-AT, alkil DHAF sentaz
Transaminasyon ve oksidasyon reaksiyonları	Serin-pürivat amino transferaz
Pürin katabolizması	
Poliamin katabolizması	
Safra asit ve tuzlarının sentezi	
Pipekolik asit katabolizması	
Fitanik asit katabolizması	
α- oksidasyon	

ÇUZYA: Çok uzun zincirli yağ asitleri; DHAF-ATPaz: Dihidroksiaseton fosfat açıl transferaz; Alkil DHAF sentaz: Alkil dihidroksiaseton fosfat sentaz.

2.5.1. Peroksizomal H₂O₂ Detoksifikasyonu:

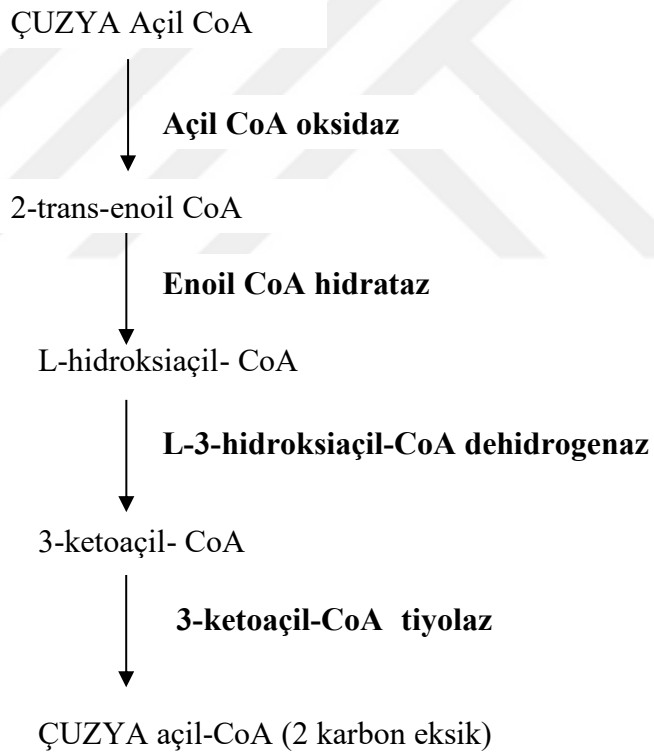
Peroksizomlar memelilerde total O₂'nin %20'sini tüketmektedir. Ancak bu organelde gerçekleşen solunum reaksiyonu sonucu mitokondridekinden farklı olarak ATP yerine H₂O₂ açığa çıkmaktadır. Çalışmalar bu organelin memeli dokularında H₂O₂ üretiminin %35'inden sorumlu olduğunu göstermiştir. Peroksizomlar, bu reaktif oksijen türünün (77) zararlı etkisini bertaraf etmek üzere çok miktarda katalaz içermektedir. Peroksizomal bir belirteç olan katalaz enzimi H₂O₂'yi suya dönüştürür. Peroksizomların katalaz aktivitesinin yanı sıra farklı ROS detoksifikasyon reaksiyonlarında da görev aldığı düşünülmektedir (78).

2.5.2. Çok Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Metabolizması

Yağ asitlerinin parçalanması beta oksidasyon adı verilen bir yolak ile gerçekleşmektedir. Memelilerde çok uzun zincirli yağ asitleri (C20, C22, C24, C26) önce β-oksidasyonun modifiye bir formu olan peroksizomal oksidasyona uğrayıp zincir uzunluğu kısaltılarak, mitokondriyal β-oksidasyon sistemine transfer edilir. Memelilerde yağ asitleri uzunluğuna göre değişen 2 alternatif oksidasyon yolağı mevcut iken bitki ve mantarlarda β-oksidasyon sadece peroksizomlarda gerçekleşmektedir (79). Peroksizomlardaki enzimler daha kısa zincirli yağ asitlerine etki etmemektedirler (80).

Karbon sayısı 20'den büyük olan yağ asitlerine çok uzun zincirli yağ asitleri denilmektedir. ER'de elongasyon reaksiyonuyla normal uzunluktaki yağ asitlerinden de

sentezlenmektedir. ÇUZYA'lar -CoA ile aktiflenip ÇUZYA-CoA şeklinde peroksizomal ABCD1 (ATP binding cassette subfamily D member 1) membran proteini ile peroksizomlara transfer edilmektedir. Burada β - oksidasyonla zincir uzunluğu kısaltılıp mitokondriyel oksidasyona hazır hale getirilir. Mitokondriyel ve peroksizomal β -oksidasyon benzer aşamalara sahip olsa da oksidasyondaki her bir enzim organelde özgüdür. Peroksizomal β -oksidasyon reaksiyonu temelde dehidrojenasyon, hidrasyon, dehidrajenasyon ve tiyolitik ayrılma basamaklarından oluşmaktadır. İlk basamakta açıl CoA oksidaz aktivitesi ile açılCoA, trans-2-enoil CoA'ya dönüştürülür. Peroksizomal β -oksidasyonun 2. ve 3. reaksiyonunda trans-2-enoil CoA hidrasyonu (Enoil CoA hidrataz) ve 3-hidroksiaçil CoA dehidrajenasyonu (L-3-hidroksiaçil-CoA dehidrogenaz) 17- β -hidroksisteroid dehidrogenaz 4 (D-bifonksiyonel protein, DBP) ile gerçekleştirilir (Şekil 2.4.) (81). Açıl CoA oksidaz, enoil CoA hidrataz, 3-ketoaçil-CoA tiyolaz, PPAR- α ligandları ile transkripsiyonel seviyede regüle edilmektedirler (82).



Şekil 2.4. Peroksizomal β oksidasyon sistemi (82)

2.5.3. Plazmalojenler ve Sentezi

Gliserofosfolipidler temelde gliserol iskeletinin sn-1 pozisyonunda genelde doymuş, sn-2 pozisyonunda doymamış yağ asidi içeren, sn-3'de ise fosfat ve gliseridin türüne göre değişen grup içeren fosfatidik asit türevi bileşiklerdir. Gliserol iskeletinin sn-

1 pozisyonunda bulundurduğu bağı türüne göre (ester, eter ya da vinil eter) açıl, alkil, alkenil gliserofosfolipidler olarak sınıflandırılır. Bunlardan diaçilgliseroller baskın gliserofosfolipidler iken, alkil ve alkenil sınıfları eter gliserofosfolipidler olarak adlandırılır (83).

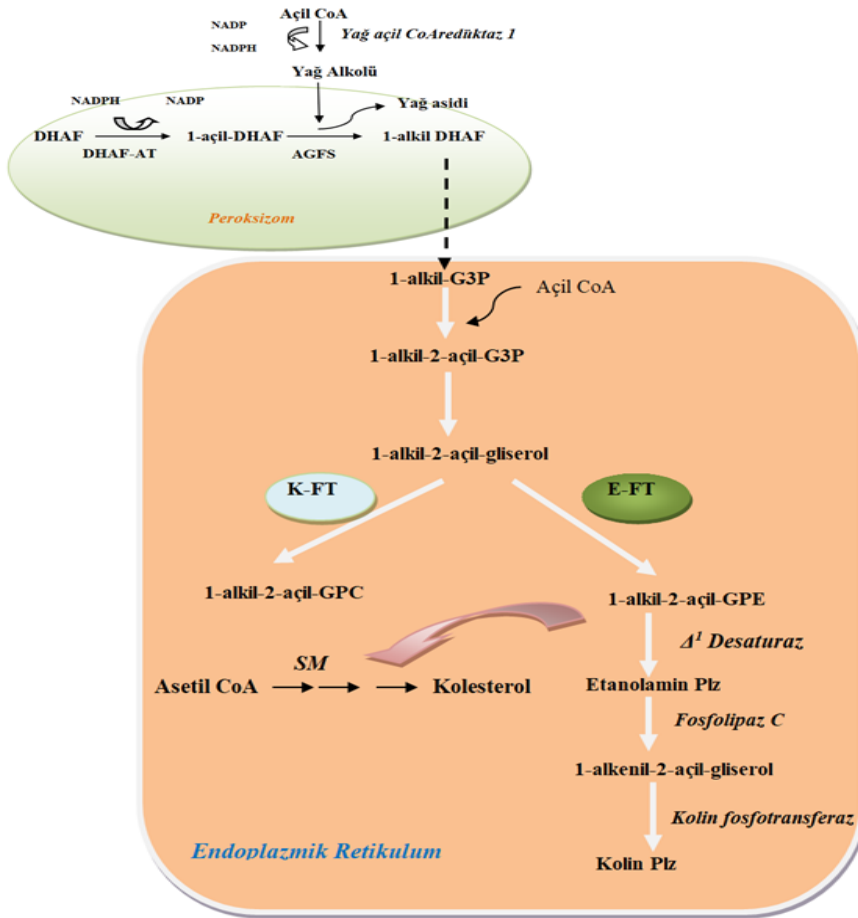
Eter fosfolipidler, gliserol iskeletinin 1.karbonuna bağlı 1-O-alkil ya da 1-O-alkenil bağı ile bağlı gruplar içermektedir. Plazmalojenler; sn-1 pozisyonunda vinil eter bağı (C-O-C=C-R) içeren özel bir eter fosfolipid türüdür (84). sn-1 pozisyonunda genelde C16, C18 veya C18:1 yağ alkollerini ve sn-2 pozisyonunda çoklu doymamış yağ asitlerini (araşidonik asit, dokozahekzaenoik asit) içerirler (85). Plazmalojenler; plazmenil fosfolipidler ya da alkenil akril fosfolipidler olarak da adlandırılmakta, hemen hemen tüm memeli dokularında bulunmakta ve hücre membranfosfolipidlerinin %18-20'sini oluşturmaktadır (86). Plazmalojenler, sn-3 pozisyonundaki polar gruba göre kolin plazmalojenler (Kolin Plz) ve etanolamin plazmalojenler (Etenolamin Plz) olarak sınıflandırılmaktadır. Kolin plazmalojenler kalp ve iskelet kasında baskın olarak bulunurken; etanolamin plazmalojenler sinir sistemi dokuları, böbrek ve iskelet kaslarında yaygındır (87).

Dihidroksiaseton fosfat metabolik yolu memeli dokularında eter bağı fosfolipidlerin ve diaçilfosfolipidlerin sentezinde önemlidir. Karaciğer eter fosfolipidleri sentezlemektedir ancak onları depolayamaz, bunun yerine hepatositler tercihen eter fosfolipidler HDL yapısında salgırlar. Lipoproteinlerde bulunan fosfoetanolaminin %30'luk kısmı bir eter lipid olan plazmalojen formundadır (74).

Sirkadiyen osilasyon gösteren lipidler arasında insanlarda fosfolipidler de bulunmaktadır (fosfatidilgliserol, lizofosfatidil kolin) (59). İnsan ve ratlarda fosfolipidler (PC, LPC, PE, SM) uyku sınırlaması sonucunda en çok yükselen parametreler olarak belirlenmiştir (15).

Eter fosfolipidler, peroksizomda başlayan ve endoplazmik retikulumda sonlanan 7 reaksiyon sonucu oluşur. Sentezinin ilk iki basamağı peroksizomlarda gerçekleşir. Bu yolaktaki hız kısıtlayıcı enzim olan yağ açıl-CoA redüktaz 1 peroksizomal bir enzimdir. Bu enzim plazma membranının iç katmanında bulunan plazmalojenlere karşı duyarlıdır ve sentezini burada bulunan eterlipid oranına göre ayarlar. Gliserofosfolipidlerde eter bağı oluşumunu katalizleyen açıl dihidroksiaseton fosfat (Açıl DHAF) ve uzun zincirli yağ alkollerini görev yapar. DHAF açıl transferaz (DHAF-AT) DHAF'deki serbest hidroksil gruplarını uzun zincirli açıl CoA'ları kullanarak esterleştirir ve açıl DHAF oluşturur. Alkil DHAF sentaz, açıl DHAF'deki açıl zincirini uzun zincirli yağ alkolüyle

değiştirerek alkil DHAF oluşturur ki bu reaksiyon eter lipid biyosentez yolağındaki ilk eter bağılı lipiddir. Alkil DHAF redüktaz, alkil DHAF'deki keton grubunu NADPH kullanarak indirger ve alkil gliserol-3-fosfat oluşturur. Fosfataz aktivitesi sonucu oluşan 1-alkil-2-açıl-gliserol akabinde kolin fosfotransferaz (K-FT) ve etanolamin fosfotransferaz (E-FT) enzimleri ile alkil gliserofosfolipid kolin ve etanolamin eter fosfolipidlerine dönüşür. Son olarak Δ^1 desaturaz enziminin katalizörlüğünde etanolamin plazmalojen ve kolin plazmalojenler oluşur (Şekil 2.5.) (83, 88, 89).



Şekil 2.5. Plazmalojen Sentezi

Şekil, (83, 89) numaralı kaynaktan yararlanılarak yeniden çizilmiştir. DHAF: Dihidroksiaseton fosfat; AGFS: Alkilgliseron fosfat sentaz; DHAF-AT: Dihidroksiaseton fosfat açil transferaz; K-FT: Kolin fosfotransferaz; E-FT: etanolamin fosfotransferaz.

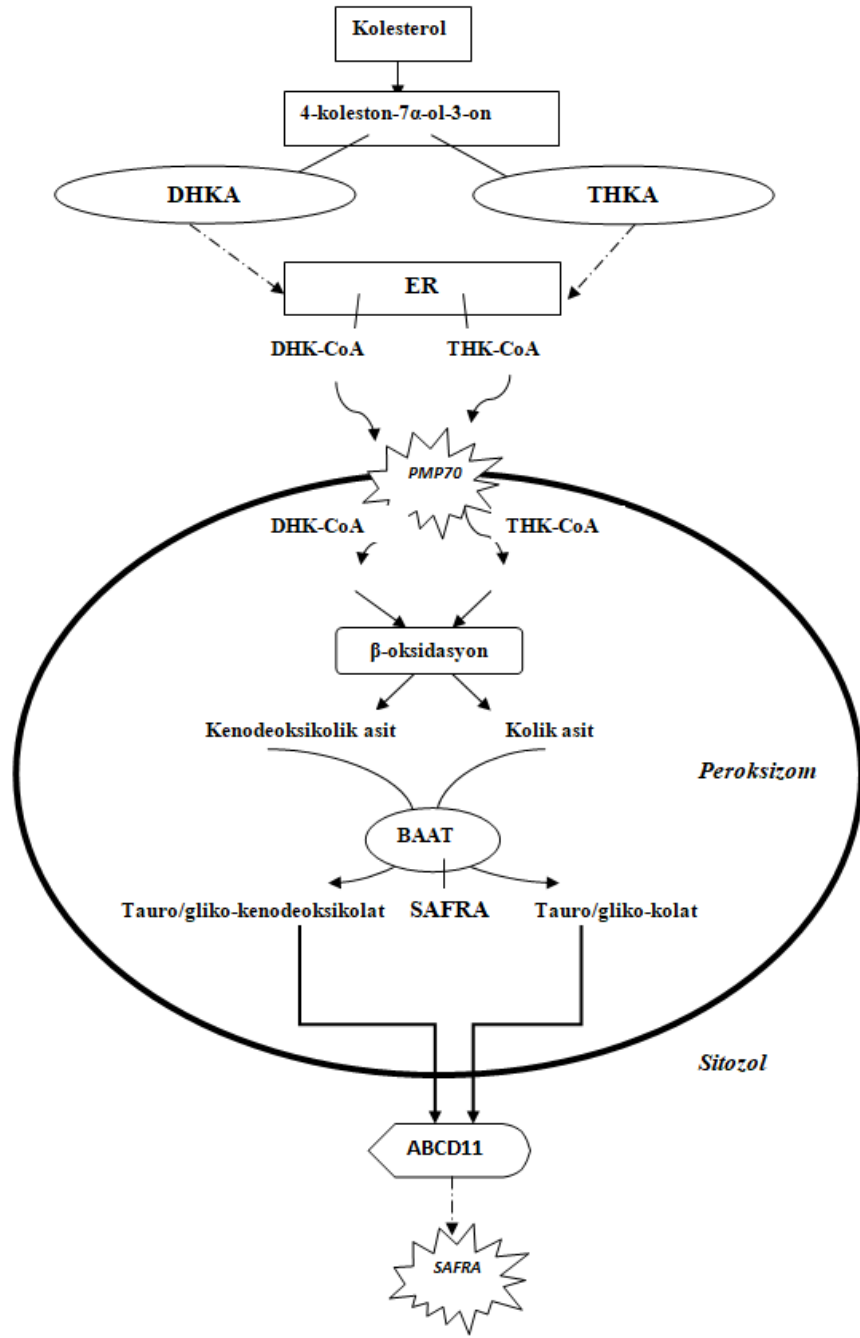
Plazmalojenlerin memelilerde beyin retina, lökositler (immün hücreler), sperm, kalp ve iskelet kaslarında bol miktarda bulunduğu rapor edilmiştir. Bu karakteristik dağılım memelilerde plazmalojenin önemine dikkat çekmektedir (86).

Plazmalojenler memeli hücre membranının major bileşenidir. sn-1 pozisyonunda karbonil oksijenini bulundurmaması baş grupları arasındaki intermoleküler hidrojen

bağını kuvvetlendirir. Ayrıca vinil eter bağı, sn-1 ve sn-2 pozisyonundaki zincirlerin birbirlerine paralel ve yakın pozisyon almasını kolaylaştırır. Böylece sıkı paketlenmiş fosfolipid tabakası membrana daha rijit bir yapı kazandırmaktadır (90).

2.5.4. Safra Asit ve Tuzlarının Sentezi

Peroksizomlar primer safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asit sentezinde rol alırlar. Primer safra asitlerinin oluşumu için gerekli olan enzimler safra ara metabolitlerini substrat olarak kullanmaktadır. Bu substratların sentezi ER, mitokondri ve sitozol olmak üzere 3 farklı kompartmanda gerçekleşmektedir (91). Klasik sentez yolağında kolesterol CYP7A ile, 7-hidroksi kolesterole dönüştürülmektedir. Bu enzim sitokrom p450 ailesine mensup olup güçlü bir sirkadiyen ritim göstermektedir. Klasik yolak insanda safra asidi sentezinin %90'ını farelerde ise %75'ini karşılamaktadır. Asidik yolakta ise prekürsör metabolit kolesterol değil, oksisteroldür. Bu yolaktaki kilit enzim mitokondriyel sitokrom p450 enzimi olan 27-hidroksilazdır (CYP27A1). Bu enzim aktivitesi sonucu esas olarak 27-hidroksikolesterol oluşurken, az miktarda da 24,25-hidroksikolesterol oluşabilmektedir. Bu yolak ise insanda safra sentezinin %10'unu farede ise yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır. Safra asidi ara metabolitleri olan 3α , 7α -dihidroksi- 5β -kolestanoik asit (DHKA) ve $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- 5β -kolestanoik asit (THKA) peroksizomal β -oksidasyona girerek propiyonil-CoA, kenodeoksikoloil-CoA ve koloil-CoA'ya dönüşür. ER'ye ait bir enzim olan safra asidi CoA ligaz ve mitokondriyel CYP27A1, DHK ve THK CoA esterlerini oluşturmaktadır. Bu iki metabolit daha sonra PMP70 (peroksizomal membran protein 70) (ABCD3) aracılığıyla peroksizomlara alınır. Daha sonra DHK-CoA ve THK-CoA burada ACOX2 (açıl CoA oksidaz 2), D-bifonksiyonel protein ve peroksizomal tiyolaz-2 (SCPx) ile β -oksidasyona girererek safra asit-CoA: amino asit N-açıltransferaz (BAAT) ile glisin/taurinle konjuge edilerek safra tuzlarına dönüşürler. Faber ve ark. yaptığı çalışma BAAT enziminin peroksizomlara özgü olduğunu göstermiş, bu da safra tuzlarının oluşumunda peroksizomların kaçınılmaz olduğunu ortaya koymuştur. Glisin/taurinle konjuge kolik ve kenodeoksi kolik asitler henüz aydınlığa kavuşturulmamış bir yolla sitozole oradan da hepatosit kanilüküler membranına lokalize BSEP (ABCD11) ile safraya salınır (Şekil 2.6.) (91). Peroksizomal hastalıklarda C27-safra asitlerinin plazma/serum, safra (92-94) ve idrar konsantrasyonunun arttığı bildirilmiştir (95).



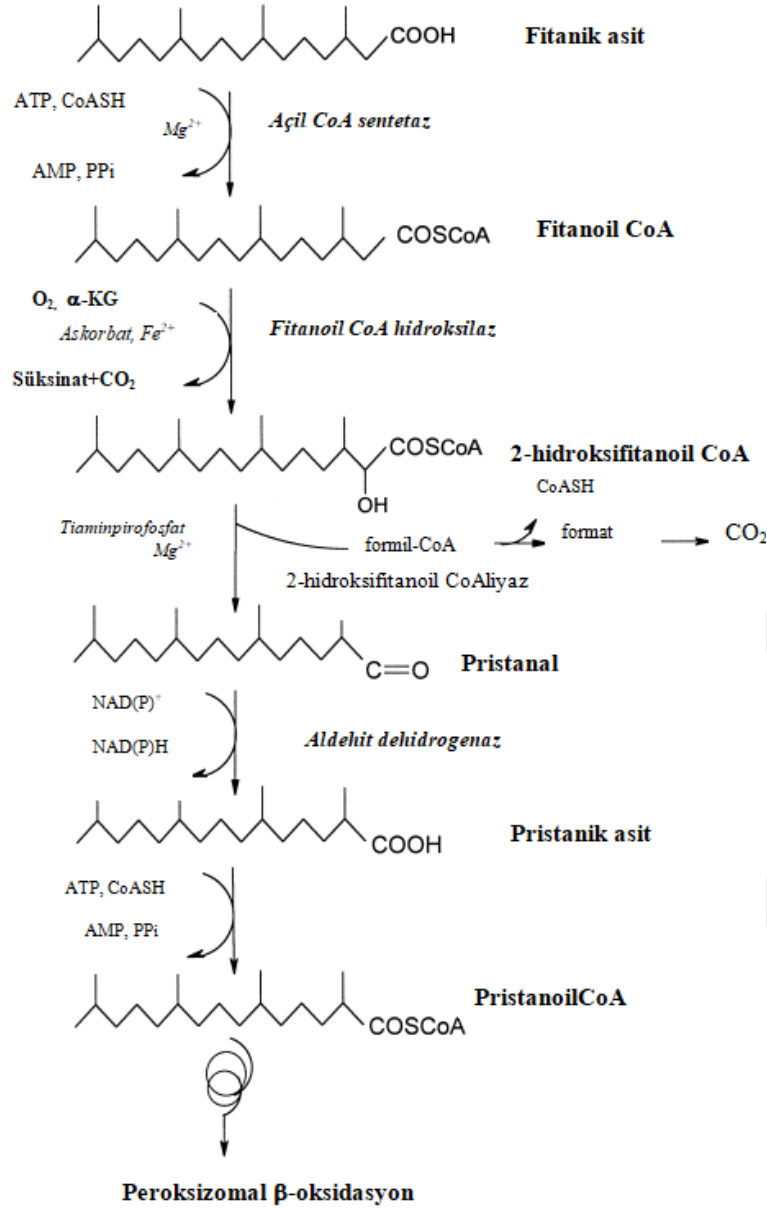
Şekil 2.6. Safra asitlerinin sentezi

Şekil, (91) numaralı kaynaktan yararlanılarak çizilmiştir. DHKA: 3 α , 7 α -dihidroksi-5 β -kolestanoik asit; THKA: trihidroksi-5 β -kolestanoik asit; BAAT: Safra asit-CoA: amino asit N-açil transferaz.

2.5.5. Fitamik Asit Alfa-Oksidasyonu

Eter lipid sentezi gibi α -oksidasyon da peroksizomlara özgüdür. Peroksizomal α -oksidasyon dallı zincirli yağ asitlerinin yıkımında önemlidir. Peroksizomal aktivitenin değişimi bu metabolik yolları, dolayısıyla substratların plazma düzeyini de etkilemektedir (80).

Fitanik asit (3,7,11,14-tetrametil hegzadekanoik asit); 3. pozisyonunda metil grubu içeren dallanmış zincirli bir poliizoprenoid lipid olup genelde bitki klorofilleri, kırmızı et, deniz ürünlerinde bol bulunmaktadır. İnsanda de novo sentezlenemeyip sadece besinlerle vücuda alınabilen bu lipid dallanmış yapısı nedeniyle β -oksidasyon ile yıkılamamaktadır (96). 3-metil-yağ asitleri peroksizomlarda α -oksidasyon reaksiyonu sonucunda 2-metil-yağ asitlerine dönüştürülerek β -oksidasyona uğrayabilmektedir. Buna alternatif olarak dallanmış zincire sahip yağ asitleri omega ucundan başlayarak da okside olabilmektedirler. α -oksidasyon reaksiyonunda fitanik asit, açıl CoA sentaz enzimi ile fitanoil-CoA'ya dönüştürülür ve PMP70 aracılığıyla peroksizom membranından içeri alınır. İçeri alınan fitanoil-CoA, fitanoil-CoA-2-hidroksilaz enzimi ile 2-hidroksi-fitanoil-CoA'ya dönüşür. Bu enzim 2-okzoglutarat bağımlı dioksijenaz grubundan olup, 2-okzoglutarat ve moleküler oksijeni kullanarak süksinat ve CO₂ açığa çıkarır. Akabinde 2-hidroksiaçıl-CoA liyaz ile 2-hidroksi-fitanoil-CoA'yı formil CoA'ya ve pristanal'a parçalar. Pristanal da aldehid dehidrogenaz aktivasyonu ile pristanik aside (2,6,10,14-tetrametilpentadekanoik asit) yükseltgenir (Şekil 2.7.) (91). Refsum hastalığı ve Rizomelik Kondrodisplazi Tip I ve V yüksek fitanik asit seviyeleri ile karakterize peroksizomal hastalıklardır. Yine geniş spektrumlu peroksizomal hastalık olan Zellweger Spektrum Hastalığında hem pristanik hem de fitanik asit seviyeleri yükselmişken α -metil-CoA rasemaz eksikliğinde sadece pristanik asidin yükseldiği bildirilmiştir (97).



Şekil 2.7. Fitanik asit α -oksidasyonu
Şekil, (98) numaralı kaynaktan yararlanılarak çizilmiştir.

2.5.6. Gliokzalat Detoksifikasyonu

İnsanda alanin gliokzalat aminotransferaz (GAT) gliokzalat detoksifikasyonunda görev alan karaciğer ve peroksizoma spesifik bir enzimdir. Gliokzalat GAT enzimi ile pürivat ve glisine dönüştürülmektedir. Pürivat daha sonra sitozolde bulunan transaminazlar ile alanine dönüştürülür ya da mitokondride pürivat dehidrogenaz ile asetil CoA'ya parçalanır. Yani gliokzalat detoksifikasyonu peroksizom, sitozol ve mitokondriyi içeren çok organelli bir metabolik yolaktır. Glisin ise mitokondriye geçerek burada bulunan P-, T-,H- ve L-olmak üzere 4 farklı proteinden oluşan glisin yıkıcı enzim ile yıkılır (91). GAT eksikliğinde hiperoksalüri tip1 görülmektedir. Hiperoksalüride

kalsiyum okzalata başta böbrek, karaciğer ve kalp olmak üzere pek çok dokuda öldürücü dozda birikir (99).

2.6. Peroksizomal hastalıklar

Peroksizomal fonksiyon bozuklukları ile karakterize genetik olarak heterojen hastalıklardır. Bunlar içerisinde Zellweger sendromu, infantil Refsum hastalığı ve neonatal adrenolökodistrofi örnek verilebilir. İskelet ve kranofasiyal dismorfizm, karaciğer fonksiyon bozuklukları, işitme kaybı ve retinopatilere yol açarlar. Bu tür hastalıklarda uzun zincirli yağ asitleri ve dallı-zincirli yağ asitlerinde aşırı birikme (fitanik asit) görülmektedir. Ayrıca bazı peroksizomal hastalıklarda yetersiz plazmalojen (eterlipid) düzeyleri tespit edilmiştir (100). Uyku sınırlaması yoluyla oluşturulan deneysel sirkadiyen ritim bozukluklarında uzun zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyonundaki azalma ayrıca diaçilgliserol ve fosfolipid metabolitlerindeki değişim peroksizomal hastalıklarda görülen metabolit değişimi profiline oldukça benzerlik göstermektedir (Tablo 2.4.).

Tablo 2.4. Peroksizomal hastalıklar (76)

Peroksizom Biyogenez Hastalıkları

Zellweger Spektrum Hastalığı

- a. Zellweger Hastalığı
- b. Neonatal adrenolökodistrofi
- c. İnfantil Refsum Hastalığı

Tek Enzim Eksiklikleri

- a. Adrenolökodistrofi
- b. AçılCoA oksidaz eksikliği
- c. D-bifonksiyonel protein eksikliği
- d. 3-ketoaçıl CoA tiyolaz eksikliği
- e. Refsum Hastalığı
- f. Hiperoksalüri tip 1
- g. Mevolanatinaz eksikliği
- h. Glutarik asidüri 3
- i. Akatalosemi

2.7. Nükleer Reseptörler

Nükleer reseptörler steroid hormonlar, tiroid hormonları, retinoik asit, oksisteroller gibi hidrofobik ligandların bağlanmasıyla aktive olan metabolik regülatörlerdir. Bu reseptörlerin ligand bağımlı aktivasyonları sonucu metabolik

yolalarda görevli pekçok genin ifadesi doğrudan değişmektedir (101). İnsanlarda yaklaşık 48 nükleer reseptör tanımlanmışken farelerde 49 tane nükleer reseptör tanımlanmış ve bunların büyük ölçüde osilasyon gösterdiği belirlenmiştir (101, 102). Rev-Erb- α , ROR- α , SHP (Small heterodimerik partner) ve PPAR'lar (PPAR α , β , γ) moleküler sirkadiyen saat mekanizmasının integral unsurlarıdır.

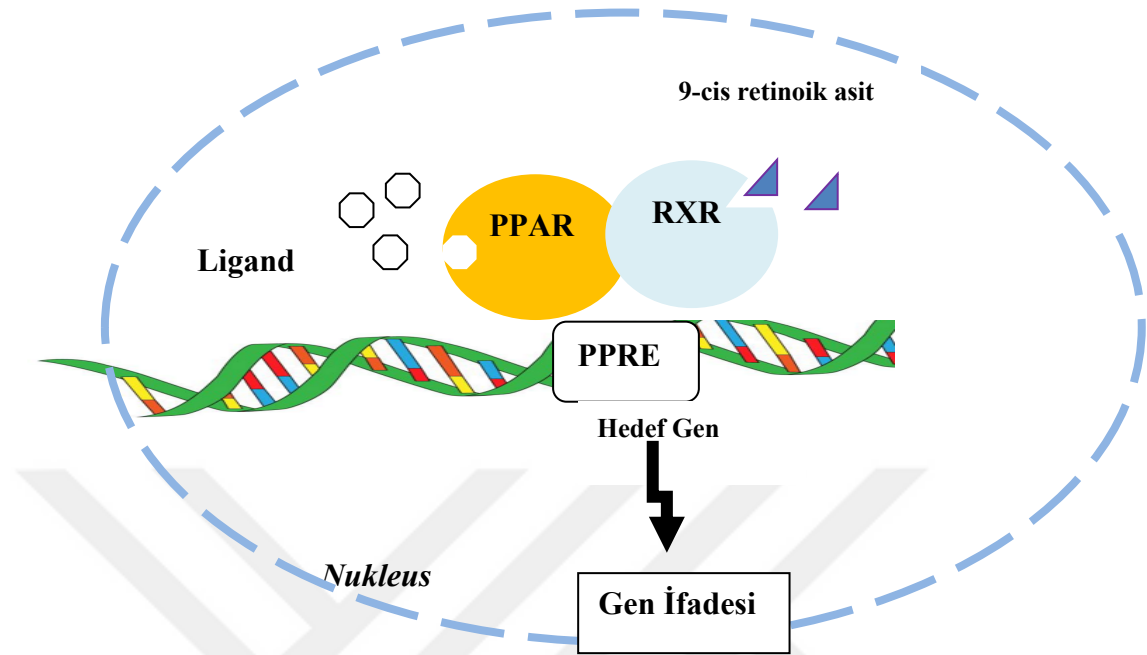
2.7.1. PPAR'lar ve Peroksizomlar

PPAR ailesinin üç üyesi de (PPAR α , β , γ) lipid metabolizması ve enerji homeostazisinin sağlanmasında önemli rol üstlenirler ve doku spesifik ritme sahiptirler. PPAR- α açlığa cevap olarak hepatik yağ asidi oksidasyonu ve ketogenezisi başlatmaktadır. Transkripsiyonu gün içinde açlıkta keton cisimleri tarafından uyarılırken gece 6 karbonlu şekerden zengin diyetle baskılanmaktadır. Karaciğer ve adipoz dokuda pik yapma zamanları arasında dört saat bulunmaktadır. Yani farklı organlarda farklı ritme sahiptir. PPAR- γ ise adipoz dokuda lipid depolanması ve lipogenezisi uyarılmaktadır (103).

Nükleer reseptör PPAR'lar ortamda ligand yokken inaktif haldedir. Ligand bağlanmasıyla konformasyonel değişime uğrayıp RXR ile heterodimerize olurlar. Bu heterodimer hedef gen DNA'sının spesifik bir bölgesinde bulunan PPAR response element (PPARRE) bağlanıp ilgili genin ifadesini değiştirirler. Bu hedef genlerin proteinleri ise genelde lipid metabolizması ve glukoz homeostazisi ile ilgili metabolik yollarda görev yapmaktadır (104) (Şekil 2.8.). Bu nükleer reseptörler hedef genlerin ekspresyonlarını sirkadiyen ritme göre regüle etmektedirler ve bu şekilde metabolik olayların uygun sirkadiyen zamanda gerçekleşmesine olanak sağlamaktadırlar (19). Nükleer reseptörler PPAR α ve PPAR β/δ lipid oksidasyonu ile ilgili genleri aktive etmektedir. PPAR γ ise lipojenik genlerin diurnal ekspresyonlarını kontrol etmektedir. Mevcut çalışmalar PPAR γ 'nın aynı zamanda peroksizomal biyogenez ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenlediğini de göstermektedir. PPAR'ların ekspresyonları doku spesifik ritim göstermektedir (105). PPAR α ekspresyonu Clock gen tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (106). Memeli dokularında nükleer reseptör ifadelerinin CLOCK ve BMAL1'in en aktif olduğu zaman diliminde ZT8 veya ZT4'de pik yaptığı belirlenmiştir (102). Ayrıca PPAR ligandı olan bezafibrat sirkadiyen uyku/uyanıklık ritminde faz değişikliğine yol açmaktadır (107).

PPAR α aktivatörleri olan fibrik asit türevleri (fibratlar) ratlarda peroksizom sayısı ve büyüklüklerinde artışa neden olmaktadır (18, 74). Bu artışın spesifik proteinlerin,

özellikle peroksizomal β -oksidasyonda rol alan enzimlerin (örneğin açıl CoA oksidaz) induksiyonu sonucu olduğu belirtilmektedir (18).



Şekil 2.8. Ligand aracılı PPAR etki mekanizması

Şekil, (108) numaralı kaynaktan yararlanarak çizilmiştir. RXR: Retinoid X reseptörü; PPARRE: PPAR response element.

2.7.2. ROR ve Reverb- α

ROR- α ekspresyonu karaciğer, böbrek, akciğer ve retinada zayıf bir sirkadiyen osilasyona sahiptir. SCN'de CT6-8 arası pik yapmakta ve burada güçlü osilasyon göstermektedir. İzofomları olan ROR- β da sirkadiyen osilasyon gösterirken ROR- γ SCN'de ifade edilmemektedir. Nitekim ROR- α ve ROR- β delesyonlu farelerde sirkadiyen ritmin bozulduğu gözlenmiştir. Ayrıca ROR'lar ritmik faaliyetlerinin yanı sıra ksenebiyotik metabolizması, lipid ve enerji homoestazisi gibi pek çok önemli yolakta kritik göreve sahiptir (109). Reverb- α 'nın lipid metabolizmasındaki bu rolünü SREBP (sterol regülâtör element bağlayıcı protein) adı verilen bir diğer transkripsiyon faktörünün ifadelerini düzenleyerek yaptığı düşünülmektedir. SREBP kolesterol, yağ asidi, TAG ve fosfolipid sentezi gibi lipid metabolizmasında görev alan genlerin ifadelerini kontrol etmektedir (110). Reverb- α , SREBP'nin sirkadiyen düzenlenmesinde görev almakta bu şekilde SREBP tarafından kontrol edilen lipid metabolizmasıyla ilgili genlerin ritmik osilasyonunu sağlamaktadır (111).

Reverb- α adipoz doku, karaciğer ve kas gibi periferel organlarda yüksek oranda ifade edilmektedir. Bu nükleer reseptörün özellikle karaciğer fonksiyonu üzerine etkisi iyi araştırılmıştır. Reverb- α ana saat genleri ve saat ilişkili genlerin regülasyonunu ve karaciğerin normal fizyolojisini düzenlemektedir. Hepatositlerde glukojenik genleri özellikle de glukoz-6-fosfataz ifadesini baskıladığı ve safra asidi sentezini direk ya da indirek mekanizmalarla düzenlediği bilinmektedir. Ayrıca hem sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan delta aminolevulinik asit sentaz (ALAS) ifadesini arttırdığı ve bu enzimin de sirkadiyen osilasyon gösterdiği bildirilmiştir (112).

ROR- α ve Reverb- α ana sirkadiyen saati zıt etki mekanizmaları ile regüle etmektedir. Reverb- α , BMAL1'in promoturundaki RORE'e bağlanarak BMAL1 ifadesini baskılamakta, çalışmalar ROR- α 'ın yine aynı bölgeye bağlandığını ve BMAL1 transkripsiyonunu aktive ettiğini göstermiştir (18, 113).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Hayvanı Temini

İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden ortalama 360-380 g ağırlığında 9-10 aylık 75 adet *Sprague Dawley* erkek rat, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2017/A-29 protokol numaralı izni ile kullanıldı.

3.1.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Çalışma Protokolü

21-22 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda tutulan ratlar, deneye başlamadan 1 hafta önce her kafeste 3 rat olacak şekilde Kontrol (KN), Sürekli Aydınlık Grubu (SA), Süre Kısıtlı Besleme Grubu (SKB), Fenofibratlı Yemle Beslenen Grup ve Kalori Kısıtlaması Grubu olmak üzere 25 kafese ayrılarak adaptasyon süreci başlatıldı. Bu 1 haftalık süre içinde ratlar ad libitum, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Pelet yem % içeriği Tablo 3.1.'de verilmiştir.

1. Süre Kısıtlı Besleme Grubu (SKB): Bu grupta 15 adet rata yemler yalnızca gündüz 3 saat boyunca (08:00 – 11:00) ad libitum olarak 2 hafta süreyle verildi.
2. Sürekli Aydınlık Grubu (SA): Bu gruptaki 15 rat önceden başka bir odaya alınarak adaptasyon süreci sağlandı, akabinde odanın ışığı 2 hafta süreyle sürekli aydınlık bırakıldı.
3. Fenofibrat Eklenen Yemle Beslenen Grup (FF): Bu gruptaki 15 rata önceden hazırlanmış %0.1 (w/w) oranında fenofibrat (Lipanthyl, Recipharm Fontaine, Fransa; Alembic Pharmaceuticals, Hindistan) içeren yem, 2 hafta süreyle ad libitum verildi.
4. Kalori Kısıtlama Grubu (KK): 15 rata günlük kalori gereksiniminin %60'ını karşılayacak miktarda pelet yem verildi. Önceden yapılan literatür taramaları ve Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde 2 gün süreyle beslenmeleri izlemeye alınan ratların, günde yaklaşık 26 g yem tükettikleri belirlendi; her bir rat için günlük 16 g yem tartılarak 2 hafta boyunca saat 08:00'da verildi.
5. Kontrol Grubu (KN): Son grup olarak 15 rat normal ad libitum besleme ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde 2 hafta süreyle tutuldu.

3.1.2. Numunelerin Hazırlanışı

Her iki günde bir olmak üzere ratların canlı ağırlık ve yem tüketim miktarlarının takibi yapıldı. İki haftanın sonunda saat 19:00'da ratlara anestezik ajan olarak 80 mg/kg

ketamin ve 5 mg/kg ksilazin karışımı intramusküler yolla verildi. Ardından anestezi verilen ratların dilleri dışarı alındı ve refleksleri kontrol edildi. Karın duvarı ve periton açılarak karın organları dışarı alındı. Çevresindeki dokular temizlenerek femoral artere ulaşıldı. Femoral arterin bifurkasyon noktasından 10 cc'lik enjektör yardımıyla kan alınarak denekler sakrifiye edildi. İlgili gruplardaki deneklerden alınan kanlar EDTA'lı CBC tüplerine (Becton Dickinson, NJ ABD) alındı. Melatonin analizi için ise örneklerin ışık almasını engellemek amacıyla rat başına 1'er CBC tüpü önceden alüminyum folyo ile sarılarak santrifüjden önce 20-30 dk 2-8 °C'de muhafaza edildi. Kan numunelerinin alınımından hemen sonra her bir rat için aynı bölgeden olmak koşuluyla karaciğer kesitleri alındı ve bu kesitler %10'luk formaldehite konularak immünohistokimyasal inceleme için ayrıldı.

Deneklerden kan ve doku örneklerinin toplanmasının tamamlanmasıyla 2-8 °C'de muhafaza edilen kan numuneleri 3000 rpm'de 10 dakika (Hettich/Almanya) soğutmalı santrifüjde 15 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen plazma numunelerinin bir kısmı Eppendorf tüplere (Isolab Mikrosantrifüj tüpü 2 ml'lik, Almanya) -80 °C'de analiz süresine kadar muhafaza edildi. Plazmalojen analizi için ise, santrifüj işleminden sonra kırmızı kan hücre peleti 1:1 oranında salinle yıkanarak, izole edilen eritrositler, 1 saat öncesinden azot gazı altında uçurulmuş %1'lik 100 µL BHT (2,6-di-ter-bütül-4-hidroksitoluen) (%99 saflıkta Sigma-Aldrich, Almanya) içeren Eppendorf tüplere koyularak -80°C'de saklandı.

Tablo 3.1. Rat pelet yem % içeriği

Yem İçeriği	Ağırlıkça Yüzdesi
Su	En çok 12
Ham Protein	En az 24
Ham Selüloz	En çok 7
Ham Kül	En çok 8
HCl'de Çözünmeyen Kül	En çok 2
NaCl	En çok 1
Na	En az-En çok 0,5-0,7
P	En az 0,9
Ca	En az-En çok 1-2,8

3.2. Plazmalojen Analizi

Plazmalojen analiz prensibi, örneklere metanolik HCL eklenerek bu karışımın 90 °C'de ısıtılması sonucu plazmalojenlerin transmetilasyonla dimetilasetal türevlerine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Transmetilasyon sonucu dimetilasetaller, hekzan ile ekstrakte edilmektedir (117).

Rat eritrosit numunelerinde plazmalojen analizi için, BHT eklenmiş plazma örneklerinden 50 µL, 4 mL'lik cam tüpe alınarak üzerine 100 µL hazırladığımız IS (İnternal Standart) çalışma solüsyonu eklendi. Ardından 1 mL 3N metanolik HCL (Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek tüplerin ağzı sıkıca teflonlu kapaklarla kapatıldı ve 4 saat 90 °C'de inkübasyona bırakılarak transmetilasyon sağlandı. İnkübasyon işleminden sonra tüpler soğutularak oda sıcaklığına getirildi ve 2 mL hekzan (Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek 10 saniye vortekslendi. Bu işlemin ardından üstteki hekzan tabakası alınarak konik tabanlı cam tüpe transfer edildi ve oda sıcaklığında nitrojen gazı altında uçuruldu. Kalan rezidüye 80 µL hekzan eklenip viallere aktarıldı. Enjeksiyon hacmi 1µL olacak şekilde analiz için GC'ye enjekte edildi.

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanışı

%1 'lik BHT çözeltisi: 1g BHT tartılıp 100 mL etanolde çözüldü. Bu çözelti yaklaşık 6 °C'de karanlıkta muhafaza edildi. Eritrosit numuneleri alınmadan hemen önce 100 µL BHT Eppendorf tüplere pipetlendi ve nitrojen gazı altında uçuruldu.

İnternal Standart (IS) Stok Solüsyonu: 25 mg 18-metil-C19:0 metilesteri (LGC-LA 21-1918-7, İngiltere) 37,9 mL kloroformda çözüldü (2mM). Hazırlanan çözelti 6 °C'de muhafaza edildi.

İnternal Standart (IS) Çalışma Solüsyonu: 2 mmol/L derişimindeki stok solüsyonu klorofomla son konsantrasyon 72 µmol/L olacak şekilde 28 kat seyreltilerek hazırlandı.

3.2.2. Enstrümental Analiz:

Gaz kromatografisi (GC) yöntemi, numunenin buharlaştırılıp kromatografi kolonuna enjekte edildiği ve hareketli gaz fazı ile taşındığı kromatografi çeşitidir. Diğer kromatografik yöntemlerin aksine taşıyıcı gaz faz ile analit molekülleri etkileşmez; gazın tek işlevi, analiti kolon boyunca taşımaktır. Karışımdaki her maddenin hareket hızı dağılma katsayısı ile belirlenir. Hareketli fazda daha çok dağılıma uğrayan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit fazda dağılımı yüksek olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Gaz kromatografisi gazların ve uçucu maddelerin analizleri ve ayrılmasında

uygun bir metod olarak yaygın bir şekilde kabul edilmiştir. Çalışmamızda gaz kromatografik analiz için Hewlett-Packard 5890 serisi HP 7673A injector ve alev iyonizasyon dedektörü (Wilmington, ABD) kullanıldı. Serbest yağ asit faz kolonu (Hewlett -Packard FFAP 19091F-105), (50 m × 0.20 mm × 0.33 µm) 25m uzunluğunda iki parçaya ayrılarak kullanıldı. Numuneler 1 µL hacimde kesintisiz modda ve helyum taşıyıcı gazı altında inlet basıncı 2,5 atm olacak şekilde ayarlandı. Kolon sıcaklığı 50°C’de 1,5 dk tutulup ardından 30°C/dk hızla 190 °C’ye kadar arttırıldı. Bu sıcaklıkta 5 dk bekletildikten sonra, 8°C/dk hızla 230 °C’ye kadar arttırılarak bu sıcaklıkta sabitlendi. Total analiz süresi 45 dakikadır. Rat eritrosit membranında plazmalojen analiz sonuçları değerlendirilirken tüm pik alanları %100 kabul edilip her bir pik alanının yüzde değeri hesaplanmaktadır.

3.3. Çok Uzun Zincirli Yağ Asitleri, Pristanik Asit ve Fitanik Asit Analizleri

ÇUZYA, fitanik asit ve pristanik analizi ölçüm prensibi temelde asit ve alkali hidrolizin ardından hekzanla ekstrakte edilen örneklerin n-ter-bütildimetilsilil-n-metiltrifluoroasetamid; 1% ter-bütildimetilklorosilan ile türevlendirilip uçucu hale getirilmesi esasına dayanmaktadır (117). Rat plazmasında çok uzun zincirli yağ asitleri (C22, C24, C26), fitanik ve pristanik asit analizi için öncelikle plazma ve IS karışımı buz üzerinde çözdürüldü ve su banyosu açılarak 110 °C’ye ayarlandı. 4 mL’lik cam tüpe, 100 µL plazma pipetlendi. Ardından plazma numuneerinin üzerine 100 µL IS ve 2 mL asit hidroliz çözültisi pipetlenerek tüplerin ağzı teflonlu kapaklarla kapatılarak 45 dk 110 °C’de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda su banyosundan alınan tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Soğutulan numunelere 2 mL alkalın hidroliz çözültisi eklenip tekrar kapakları kapatılarak 45 dakika 110°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüpler tekrar oda sıcaklığına kadar soğutulup, üzerine 0,5 mL %25’lik HCl eklendi. Bu işlemin ardından 4 mL hekzan konulup tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak ve 60 sn elde çalkalandı. Faz ayrımı için beklendi ve ayırım gerçekleşikten sonra üstteki hekzan tabakası atılırken, örnek tabakası 10 mL’lik cam tüpe transfer edildi. Yeni tüplere alınan numunelere 3,5 mL 1M KOH eklenip tüplerin kapakları kapatıldı ve elde hafif ters düz edilerek karıştırıldı. Üstteki hekzan tabakası 4 mL’lik cam tüpe alındı ve 50 °C’de nitrojen gazı altında uçuruldu. Uçurma işleminin ardından tüpler 50 µL piridin ile durulanıp ve üzerine 100 µL MTBSTFA (N-ter-bütildimetilsilil-N-metiltrifluoroasetamid;1% ter-bütildimetilklorosilan) (Sigma-Aldrich, Almanya)

pipetlendi. Tüplerin kapakları kapatılarak 80 °C’de 30 dk türevlenmesi için inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından 50 °C sıcaklıkta nitrojen gazı altında karışım uçuruldu. Kalan rezidüler 200 µL hekzan ile durulandı ve viallere alındı. Örnekler 1’er µL halinde GC/MS sistemine enjekte edildi.

3.3.1. Çözeltilerin Hazırlanışı:

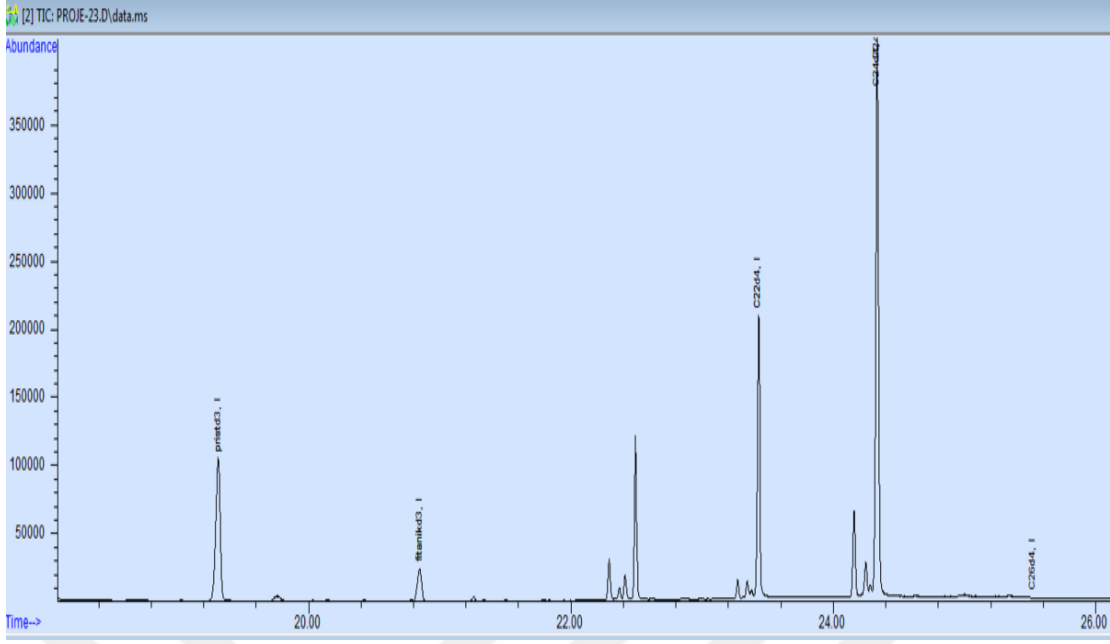
Asit Hidroliz Çözeltisi Hazırlanışı: 1/23 oranında %37’lik HCl/asetonitril karışımı hazırlandı. Bu çözelti analizin hemen öncesinde taze hazırlandı.

Alkalin Hidroliz Çözeltisi Hazırlanışı: 8g NaOH tartılarak 10 mL distile suda çözüldü, son hacim 200 mL olacak şekilde tamamlandı.

1 M KOH Çözeltisi Hazırlanışı: 56g KOH tartılarak 250 mL distile suda çözüldü son hacim 1L olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

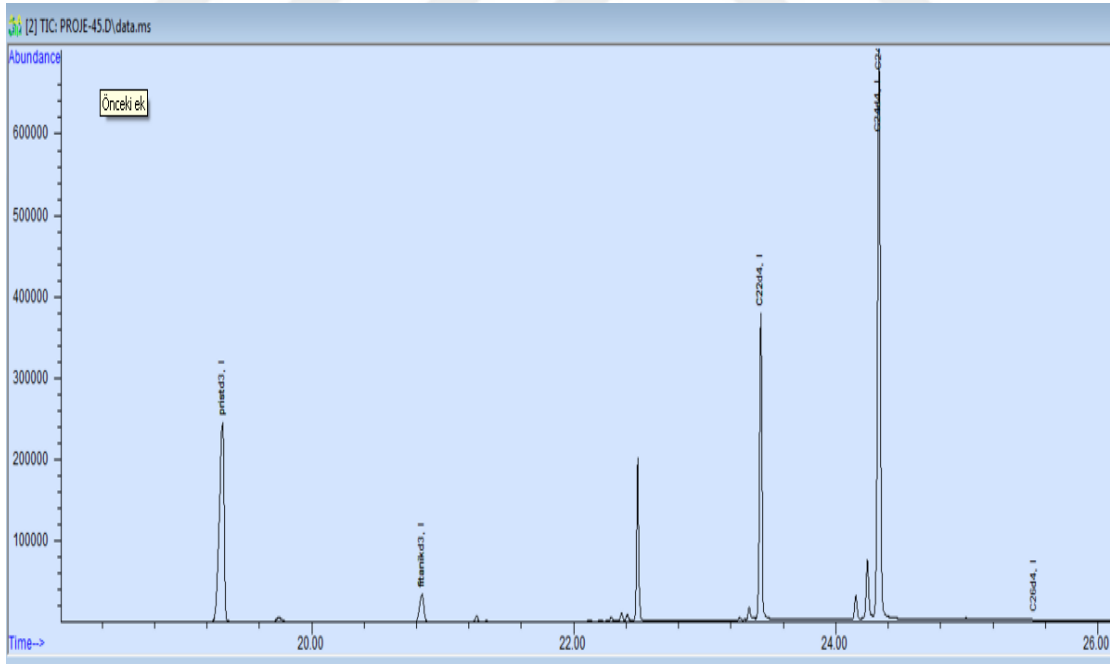
3.3.2. Enstrümental Analiz:

Rat plazma örneklerinde ÇUZYA, fitanik ve pristanik asit analizleri GC-MS yöntemiyle gerçekleştirildi. GC-MS sistemi çok bileşenli karışımlardaki elementlerin belirlenmesinde, gaz fazında bulunan ya da gazlaştırılabilen numunelerin kromatografik yöntemle ayrımı ve kütle spektrumlarının alınması aracılığıyla organik moleküler yapıya sahip maddelerin tayinlerinde, kalitatif ve kantitatif çalışmalar için kullanılan yüksek performanslı ve yüksek hızlı bir gaz kromatografisi/kütle spektrometresi sistemidir. Gaz kromatografisinde karışımdaki maddeler birbirinden ayrıldıktan sonra iyonlaştırarak kütle spektrometresinde karışımdaki maddelerin kütlelerine bağlı olarak elementler tayin edilir. Cihaz içerisinde bulunan kütüphaneler yardımı ile bilinmeyen maddeler tanımlanabilir. Çalışmamızda ÇUZYA’nin GC-MS ile analizi Agilent 6850 GC/Agilent 5977E MS (CA, ABD) cihazı kullanılarak Synlab Laboratuvarı tarafından (Ankara, Türkiye) gerçekleştirildi. GC-MS sisteminde kolon olarak Agilent HP5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) kullanılırken kolon fırını olarak Agilent 5890B kullanıldı.



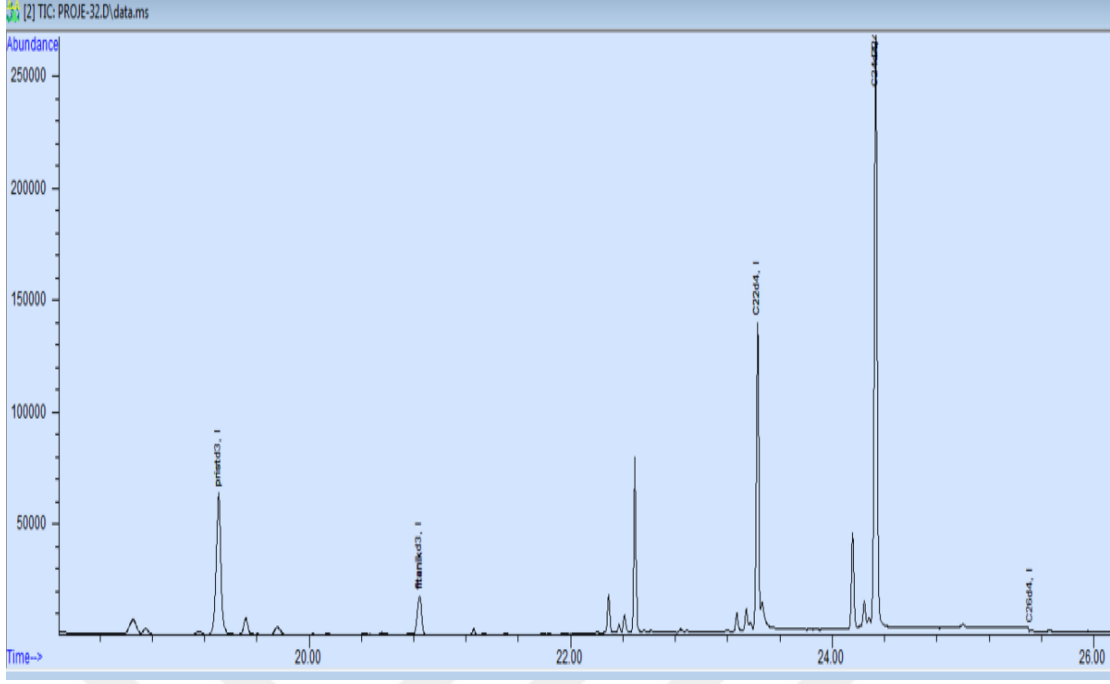
Şekil 3.1. Sürekli aydınlık grubu rat plazma numunesine ait ÇUZYA kromatogramı

Pristanik asit piki RT: 19.33, fitanik asit RT: 20.9, C22:0 RT: 23.46, C24:0 RT: 24.3, C26:0 RT: 25.52.



Şekil 3.2. Fenofibrat eklenen yemle beslenen grup rat plazma numunesine ait ÇUZYA kromatogramı

Pristanik asit piki RT. 19.41 dk, fitanik asit RT: 20.93 dk, C22:0 RT: 23.45 dk, C24:0 RT: 24.27 dk, C26:0 RT: 25.5 dk.



Şekil 3.3. Süre kısıtlı besleme grubu rat plazma numunesine ait ÇUZUYA kromatogramı

Pristanik asit piki RT: 19.34 dk, fitanik asit RT: 20.92 dk, C22:0 RT: 23.48 dk, C24:0 RT: 24.34 dk, C26:0 RT: 25.48 dk.

3.4. Melatonin Analizi

Plazma melatonin düzeylerinin tayini İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yöntemiyle gerçekleştirildi. HPLC; bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli fazı kullanır. Bu bileşenler ilk olarak çözgüde çözünürleştirilirler ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar. Çalışmamızda plazma numunelerinde melatonin seviyelerinin tayininde ters faz HPLC yöntemi kullanıldı. Analizde kullanılan HPLC cihazı Shimadzu DGU-20 A5 degazör (Japonya), Shimadzu SPD-M 20A floresan dedektör, Shimadzu CTO-10ASVP kolon Fırını, Shimadzu 20 ADXR dörtlü pompa ve Shimadzu SIL-20AXR otomatik örnekleme sisteminden oluşmaktadır. Analitik kolon olarak ise C18 hidrokarbon zincirine bağlı silika içeren, 5 µm olan partikül büyüklüğünde (250 x 4.6 mm boyutlarında) 150 A, ODS-2 ters faz kolon Kromasil-100-5 (İsveç) kullanıldı.

3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanışı

Mobil Faz Hazırlanışı: 75 mM sodyum asetat (Merck, Almanya) çözeltisi HPLC grade su ile hazırlandı. Bu çözeltilerden 720 mL alınarak asetonitril (Sigma-Aldrich, Almanya) ile 1000 mL'ye tamamlandı. Çözelti pH 5 olacak şekilde asetik asitle (BPH Limited Poole, İngiltere) ayarlandı. Akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde kullanıldı.

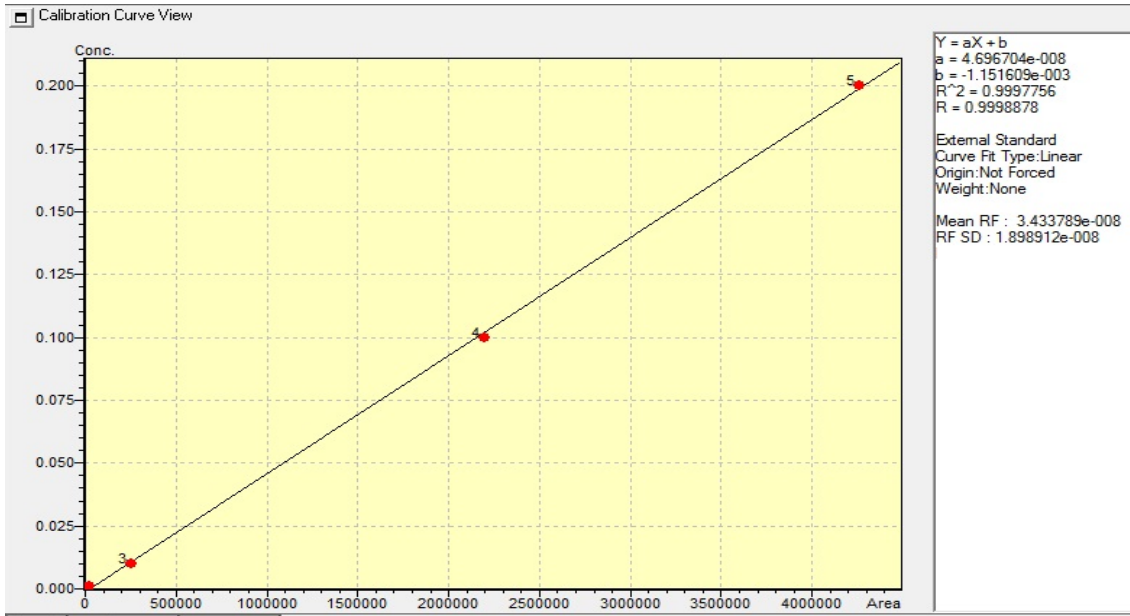
Melatonin Standardının Hazırlanışı: Analit için 1 mg/mL stok standart çözeltisi (Sigma-Aldrich, M5250-106, Çin) %50:50 metanol:su (v/v) karışımı ile hazırlandı ve kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi. Her örnek grubundaki analitlerin analizinde, stok çözeltilerden günlük olarak seyreltilerek hazırlandı.

Melatonin standardı eğrisi, stok standart çözeltisinden %50:50 metanol:su (v/v) ile seyreltilerek 0,2 pg/mL ile 200 pg/mL aralığında 5 farklı konsantrasyonda hazırlandı. Elde edilen pik alanları esas alınarak regresyon analizi yapıldı ve melatonin standart kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.4.). Elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak bilinmeyen örnekler için kromatogramlardan melatonin konsantrasyonları hesaplandı.

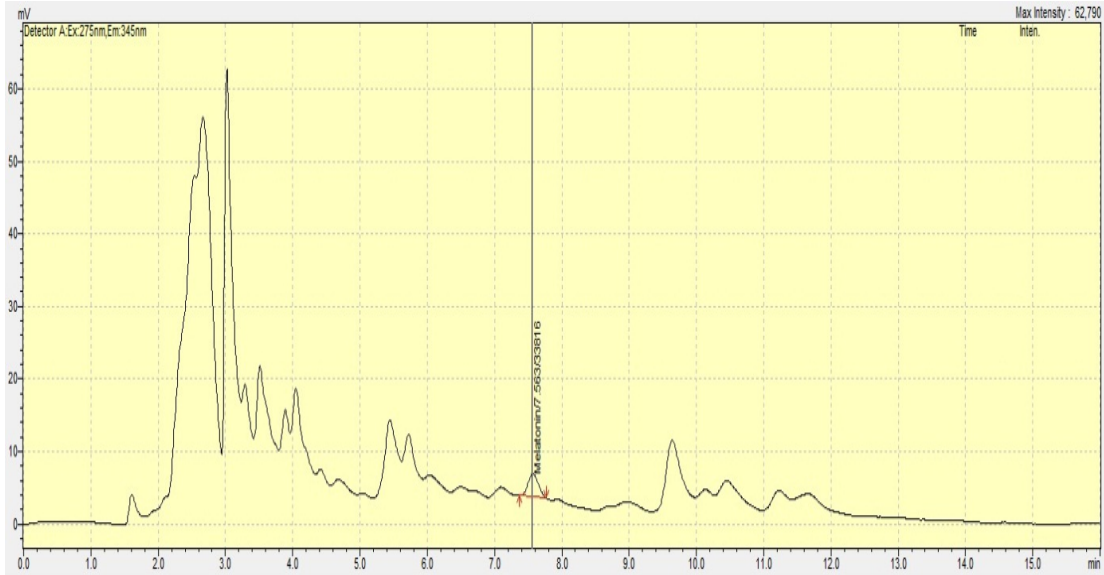
3.4.2. Enstrümental Analiz:

Çalışmada katı faz ekstraksiyonunda SPE (katı faz ekstraksiyon) kolonu (C18 dolgu maddeli, Supelco HLB 30 mg/1 mL SPE tube, ABD) ve SPE ekstraksiyon ünitesi kullanıldı. Katı faz ekstraksiyonu, plazmada pg/mL gibi düşük konsantrasyonda bulunan melatonin hatalı tespitine neden olabilecek matriks elemanlarının uzaklaştırılması ve yüksek geri kazanımı sağlamak amacıyla yapıldı. Maksimum ayırımın sağlanması amacıyla SPE kolonu şartlandırılarak çalışmaya başlandı. SPE ekstraksiyon ünitesine yerleştirilen kartuş kolonlardan akış oranı 1-2 mL/dk olacak şekilde vakum altında, 1 mL etanol (%100 saflıkta) geçirilerek kolonlar aktif hale getirildi. Plazma örnekleri her tüpte 1000'er µL olacak şekilde Eppendorf tüplere pipetlendi. Tüplere alınan plazma örnekleri 1 M NaOH ile pH 7.4 civarında ayarlandıktan sonra 5 saniye kadar vorteksenerek karışım homojen hale getirildi. Bu örnek karışımı önceden şartlandırılmış SPE ekstraksiyon kolonlarından geçirilerek numunelerdeki melatonin ekstraksiyon kolonlarına tutturulmuş oldu ve melatonin dışındaki tüm matriks bileşenleri elüe edildi. SPE kolonlardan 2 mL diklorometan (%100 saflıkta, Merck, Almanya) 2 kez geçirilerek reçinelere tutunmuş olan melatonin elüe edildi ve kartuşların altında bulunan cam deney tüplerinde biriktirildi. Cam tüplere biriktirilen diklorometan, solvent uzaklaştırma sisteminde, azot gazı altında 30 °C'de uçurularak uzaklaştırıldı. Uçurma işlemine tüplerde solvent kalmayana kadar devam edildi. Bu işlemin ardından tüplerde kalan rezidülerin üzerine 100 µL hacimdea

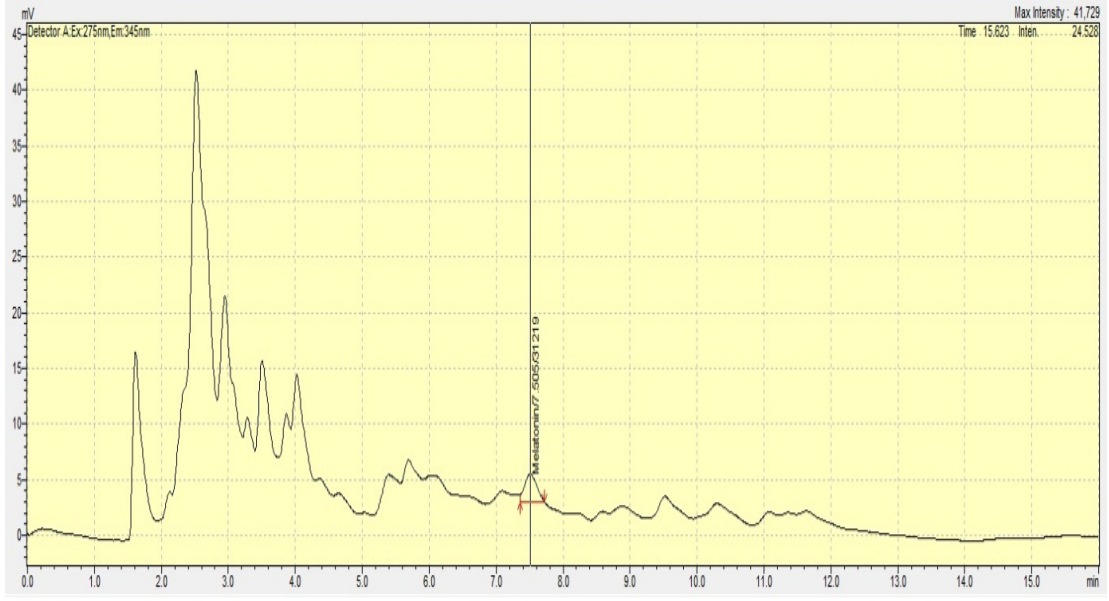
asetonitril: su karışımı (%50:50, V/V) eklenerek 30 saniye vorteksledi ve HPLC sistemine enjekte edildi. Çalışmada kullanılan floresan dedektörün eksitasyon dalga boyu 275 nm, emisyon dalga boyu ise 345 nm olacak şekilde ayarlandı. Numune enjeksiyon hacmi ise 40 µL idi. Total analiz zamanı 15 dakika olarak belirlendi. Eksternal standartlar kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.4.).



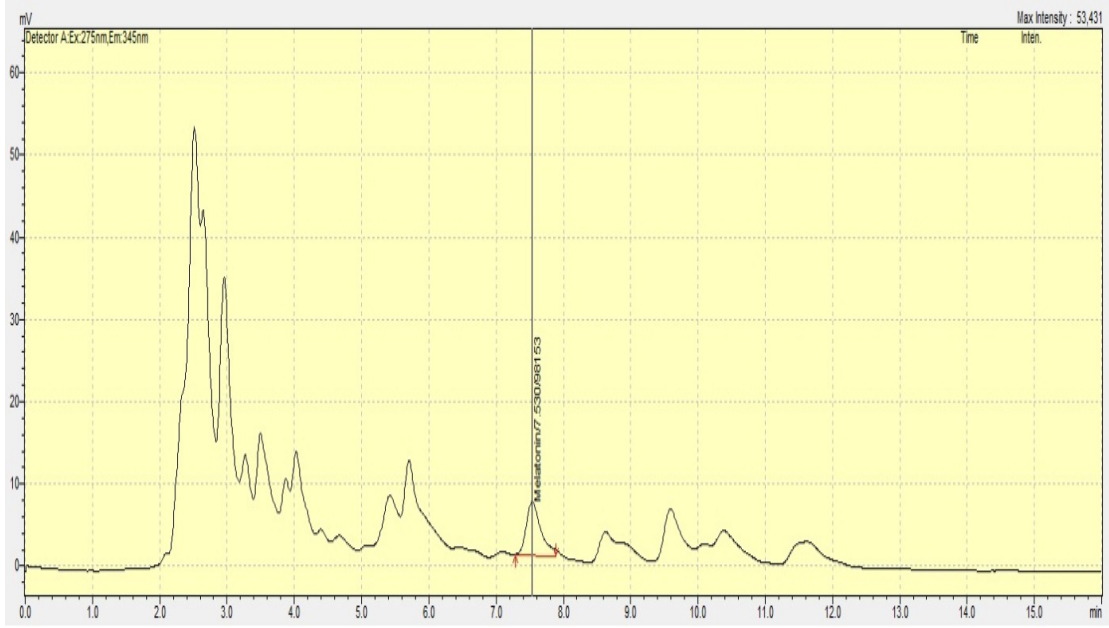
Şekil 3.4. Melatonin standart kalibrasyon grafiği



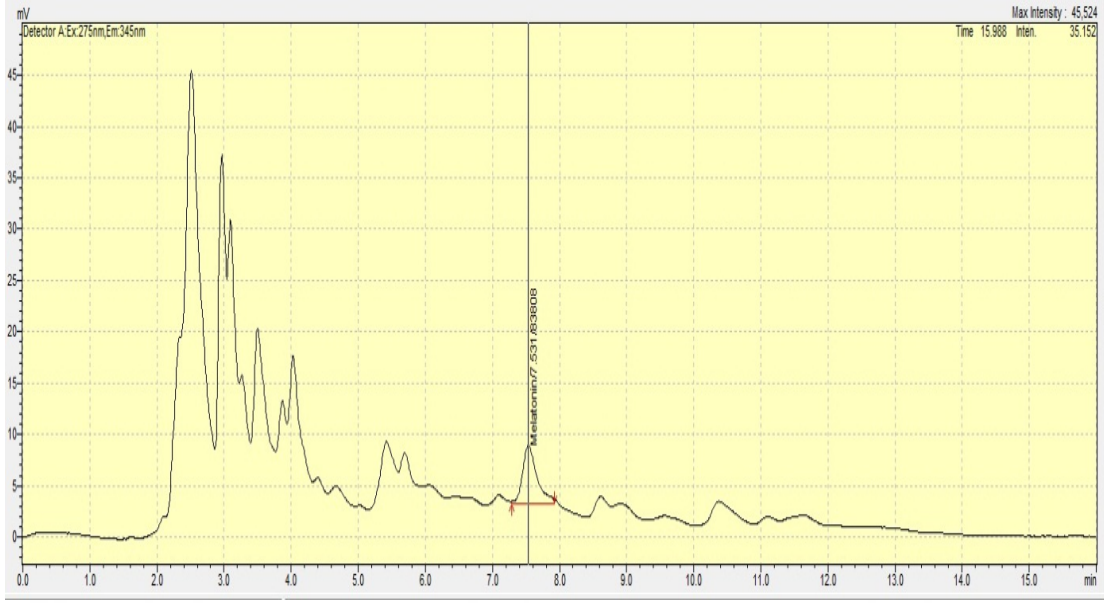
Şekil 3.5. Kontrol grubunu rat plazma numunesine ait melatonin kromatogramı



Şekil 3.6. Kalori kısıtlama grubu rat plazma numunesine ait plazma melatonin kromatogramı



Şekil 3.7. Süre kısıtlı besleme grubu rat plazma numunesine ait melatonin kromatogramı



Şekil 3.8. Süre kısıtlı besleme grubu rat plazma numunesine ait melatonin kromatogramı

3.4.3. Melatonin Ekstraksiyonu

Genel olarak kimyasal analizlerde, metot performansının değerlendirilmesi ve izlenmesine yönelik validasyon ve analitik kalite kontrol çalışmaları, geri kazanım çalışmaları üzerinden gerçekleştirilmektedir. Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığı ile belirlenir. Doğruluk için gerçek değer farklı yoldan elde edilebilir. Bunlardan biri de % geri kazanım çalışması yapmaktır.

Geri kazanım çalışmasında, bilinen miktarda (konsantrasyonda) analit örneğe ilave edilerek (spike) örnek analiz edilir ve tespit edilen analit miktarı (konsantrasyonu) ile ilave edilen miktar oranlanır. Yüzde geri kazanım formülü aşağıdaki şekildedir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \text{Geri Kazanım Konsantrasyonu} / \text{Eklenen Konsantrasyon} \times 100$$

$$\% \text{ Geri Kazanım} = 48,8 / 50 \times 100 = \% 97,6$$

Bu formül ile % Geri Kazanım hesaplandı ve % 97,6 olarak bulundu. Melatonin için kantitasyon limiti (LoQ) ise 0,2 pg/mL olarak tayin edildi.

3.5. Plazma Kortikosteron Analizi

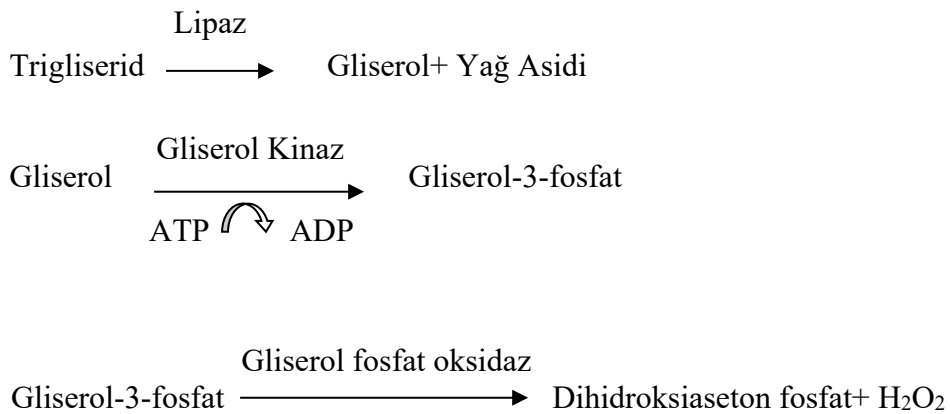
Plazma kortikosteron analizi ELISA yöntemiyle Elabscience Rat Kortikosteron ELISA (Çin) markalı kit kullanılarak kompetitif ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi. Micro-plate kuyucuklara rat kortikosteronuna spesifik anti-ratkortikosteron antikorları adsorbe edilmiştir. Numunedeki ve standarttaki kortikosteron kuyucuklara adsorbe olmuş

antikorlara bağlanır. Biotinle konjuge kortikosteron antikorları ilk antikorla konjuge olmuş kortikosterona bağlanır. Ardından yıkama işlemiyle bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır, ortama Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz (HRP) eklenir ve bu kompleks biotinle konjuge anti-rat kortikosteron antikorlarına bağlanır. Ortama substrat ve renk reaktifi eklendi. Substrat olarak H₂O₂, renk reaktifi olarak da 4-aminoantiprin ve fenol karışımı kullanıldı. Reaksiyon ortama asit eklenmesiyle sonlandırıldı ve oluşan renkli reaktifin 450 nm'de absorbanlarının ölçümüyle ilgili parametrenin seviyesi belirlendi. Kortikosteron düzeyi tayini için; 0, 78.13, 156.25, 312.5, 78.1, 625, 1250, 2500, 5000 pg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu. Ancak matriks interferansı nedeniyle numunelerin absorbanı en yüksek konsantrasyondaki (5000 pg/mL) standartın absorbanından daha yüksek absorban değerleri okunduğundan, ELISA sonuçları değerlendirmeye alınamadı. Bunun üzerine plazma kortikosteron düzeylerinin analizi için LC/MS-MS yöntemine başvuruldu.

Rat plazma kortikosteron analizi SEM laboratuvarında (İstanbul, Türkiye), JASEM Steroid Hormon Kiti kullanılarak, Agilent 1290 Infinity II UHPLC/ Agilent 6460 Triple Quadrupole (CA, ABD) cihazı kullanılarak LC-MS/MS yöntemiyle tayin edildi.

3.6. Trigliserid Analizi

Rat plazma numunelerinde trigliserid düzeyleri Abbott Architect c16000 (IL, ABD) markalı cihazda Abbott Trigliserid (IL, ABD) hazır kiti kullanılarak enzimatik olarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Trigliserid analitik metodolojisi Fossati ve ark. ile McGoowan ve ark. tarafından açıklanan reaksiyonu temel almaktadır. Bu reaksiyona göre:



Peroksidaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonla H₂O₂, 4-aminoantiprin ve 4-klorofenol ile reaksiyona girerek kırmızı renkli bir boya oluşturur, oluşan renkli çözeltinin

660 nm'de absorbansı ölçülür. Bu boyanın absorbansı örnekteki trigliserid konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Plazma trigliserid konsantrasyonunun tayini için 94 mg/dL ve 450 mg/dL konsantrasyonunda iki hazır standart solüsyonu (MCC, Architect, ABD) kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Örneklerdeki bilinmeyen trigliserid konsantrasyonları kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı.

3.7. Karaciğer Dokusu İmmünohistokimyasal Analizi

Deneklerden alınan karaciğer dokuları %10'luk formaldehit çözeltisi içerisinde tespit edildi. Bu işlemden sonra dokular sırayla dehidrasyon, parlatma işlemlerine tabi tutularak parafinle muamele edilip parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan parafin bloklar deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilerek genel histolojik değerlendirmeler için hematoxilen-eozin (H-E) kullanılarak boyandı.

H-E ile boyanan doku kesitlerinde, hepatositler hidropik değişikliklerin varlığı yönünden değerlendirildi. Buna göre; her kesitte 20 kat büyütmede 10 alan incelenerek hidropik değişiklikler, 0; yok, 1; hafif, 2; orta, 3; şiddetli değişiklik olacak şekilde skorlandı (118).

İmmünohistokimyasal analizler için kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilerek içinde 0.01 M sitrat tamponu (Thermo Scientific, ABD) bulunan düdüklü tencereye alınarak 15-20 dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz enzim aktivitesini bloke etmek amacıyla kesitlere 12 dakika boyunca %3'lük hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich, Almanya) uygulandı. PBS ile yıkanan bu kesitlere 5 dakika boyunca ultra V protein blok uygulaması yapıldı. Bu uygulamanın ardından kesitler 37 °C'de 60 dakika katalaz antikoru (Boster Katalog No: PB9925, Çin) ile inkübe edildi ve tekrar PBS ile yıkanarak 37 °C'de 20 dakika biyotinli sekonder antikor uygulandı. Ardından kesitler 37 °C'de 20 dakika streptavidin peroksidaz ile inkübe edildi. Peroksidaz enzimi ile inkübe edilen kesitlere kromojen uygulaması yapıldı. Bu işlem sonrasında hematoxilen ile boyanarak su bazlı kapatıcı ile kapatıldı.

Boyama, immünreaktivitenin yaygınlığı (0:0, 1:1-%25, 2:%26-50, 3:%51-75, 4:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +1: çok hafif, +2: hafif, +3: orta, 4: şiddetli) esas alınarak semikantitatif olarak skorlandı. Toplam boyama skoru; yaygınlık x şiddet hesaplanarak elde edildi (119).

3.8. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın immünohistokimyasal sonuçları, SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 17) kullanılarak analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluk gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bütün veriler median (min-max) olarak ifade edildi, $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Trigliserid, ÇUZYA, plazmalojen, kortikosteron ve melatonin analiz sonuçları ile deneklerin tartım sonuçlarının değerlendirilmesinde R version 3.5.0 yazılımı ile IBM SPSS Statistics 22.0 paket programı kullanıldı. Veriler ortanca, minimum, maksimum ve çeyreklikler arası genişlik (IQR) şeklinde özetlendi. Verilerin normal dağılıma uygunluk gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Değişkenler açısından bağımsız gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olup olmadığı parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Kruskal-Wallis H testi sonrası çoklu karşılaştırmaları Conover testi ile yapıldı. Bağımlı (eşli) gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olup olmadığı parametrik olmayan testlerden Wilcoxon testi ile incelendi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

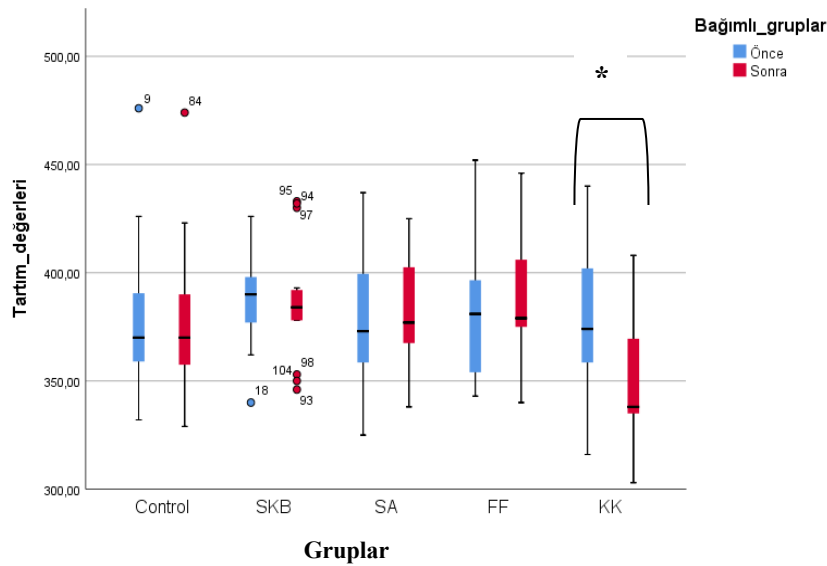
4.1. Ratların Canlı Ağırlık Değişimi

Ratların, deneye başlamadan önce ve deneyin bitimini takiben canlı ağırlıkları kaydedildi. Deney öncesi ve sonrası ratların ağırlıkları karşılaştırıldığında aradaki değişim sadece KK grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.1). KK grubundaki her rat, günlük ortalama yem tüketim miktarının %60'ı olan 16 g yemle beslendi ve bu gruptaki ratlar 15 günün sonunda ortalama %9,6 kilo kaybına uğrarken, diğer gruplarda belirgin bir ağırlık değişimi gözlenmedi (Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Ratların deney öncesi ve sonrası ortalama canlı ağırlık değişimleri

Ortalama Tartım Değerleri (g)						
Gruplar	Deney Öncesi (g)	IQR	Deney Sonrası (g)	Yüzde Değişim	IQR	p değeri
KN	370	31.5	370	%0	32.5	0.073
SKB	390	21	384	-%1.5	14	0.393
SA	373	41	377	+%1.1	35	0.551
FF	381	42.5	379	-%0.5	31	0.802
KK*	374	43.5	338	-%9.6	34.5	0.001

Sonuçlar median ve IQR (Çeyrekler Açıklığı) cinsinden verilmiştir. Deney öncesi-sonrası kıyaslamasında anlamlı karşılaştırmalar “*” işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05). (KN: Kontrol Grubu, SKB: Süre Kısıtlı Besleme Grubu, SA: Sürekli Aydınlık Grubu, FF: Fenofibrat Eklenen Yemle Besleme Grubu, KK: Kalori Kısıtlaması Grubu).



Şekil 4.1. Ratların deney öncesi ve sonrası ortalama canlı ağırlık değişimleri grafiği

4.2. Sirkadiyen Ritme Etki Eden Faktörlerin Rat Kan Lipid Parametreleri Üzerine Etkileri

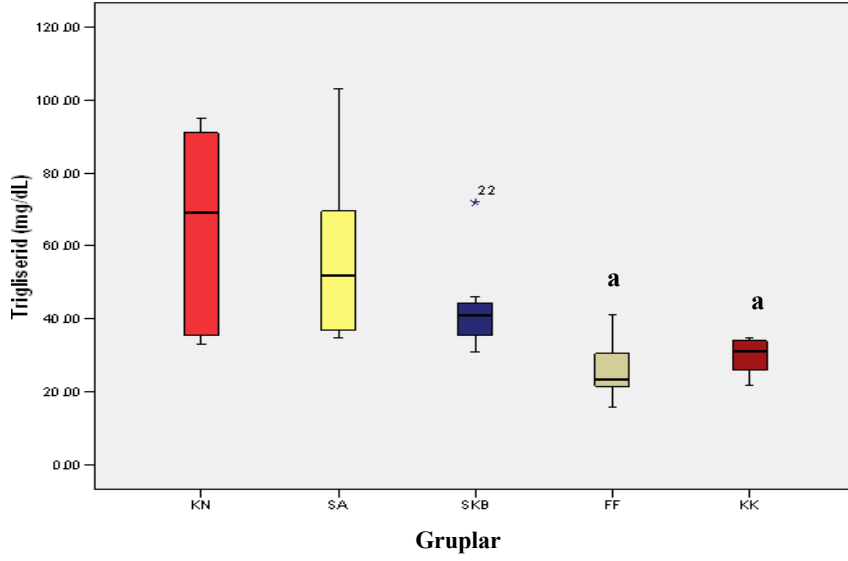
4.2.1. Sirkadiyen Ritim Değişimlerinin Rat Plazma Trigliserid Düzeylerine Etkisi

%0.1 oranında fibrat türevi bir ilaç olan ve fenofibrat içeren yemle beslenen FF grubunda plazma trigliserid (TG) düzeyleri kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p= 0.0001$). Bu durum fibratın bilinen hipotrigliserdemik etkisine bağlı olabilir (120). Bunun yanı sıra günlük kalori ihtiyacının %60 kadarı kadar yemle beslenerek kalorisi kısıtlanan ratlarda da plazma trigliserid seviyeleri kontrole göre düşük bulundu ($p= 0.0002$) (Şekil 4.2.). Bu gruplarda trigliserid konsantrasyonunun $KN>KK>FF$ şeklinde olduğu görülmektedir. SA ve SKB gruplarında da trigliserid düzeyleri kontrole göre düşüş gösterdi, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Sirkadiyen ritmi etkileyen faktörlerin rat plazma TG konsantrasyonuna etkilerinin karşılaştırılması

Gruplar (n=8)	Minimum	Trigliserid (mg/dL)			Çeyrekler Açıklığı	p
		Median	Maksimum			
KN	33	69	95	56,8	0,0003	
SA	35	52	103	39,3		
SKB	31	41	72	10,5		
FF ^a	16	23.5	41	12,5		
KK ^a	22	31	35	9,0		

Sonuçlar Tablo 4.1'deki gibi ifade edilmiştir. Kontrole göre anlamlı değişim gösterenler "a" ile gösterilmiştir ($*p < 0,05$).

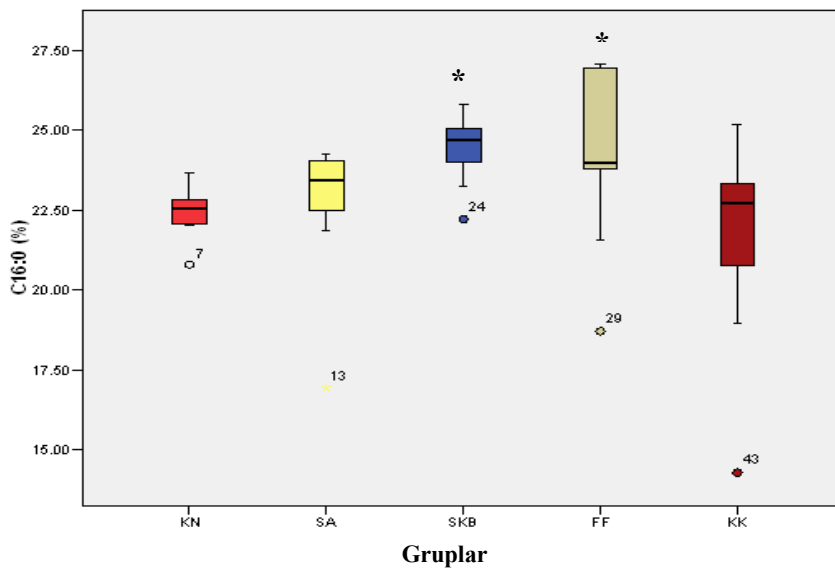


Şekil 4.2. Sirkadiyen ritmi etkileyen faktörlerin rat plazma TG konsantrasyonuna etkilerinin karşılaştırmalı grafiği

4.2.2. Sirkadiyen Ritim Değişikliklerinin Rat Eritrosit Membranı Plazmalojen Düzeylerine Etkileri

C16:0

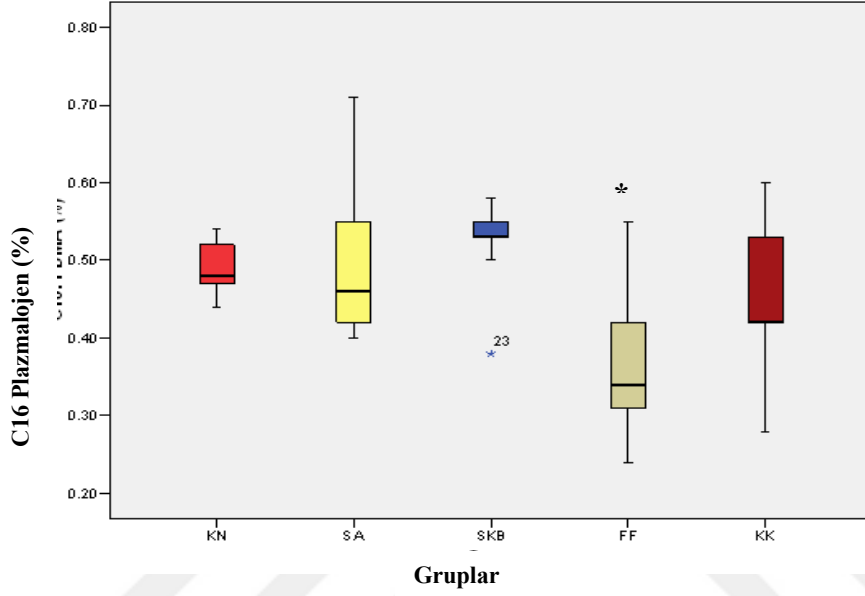
Eritrosit membranında tüm pik alanları içerisinde C16 pikinin yüzde alanı değerlendirildiğinde SKB ve FF grupları kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,0129$; $p=0,0061$) (Şekil 4.3.). Bunun yanı sıra SA ve KK gruplarında da kontrole göre yükseliş gözlenirken, bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.3.).



Şekil 4.3. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C16:0 yüzdesine etkileri

C16 Plazmalojen Düzeyleri

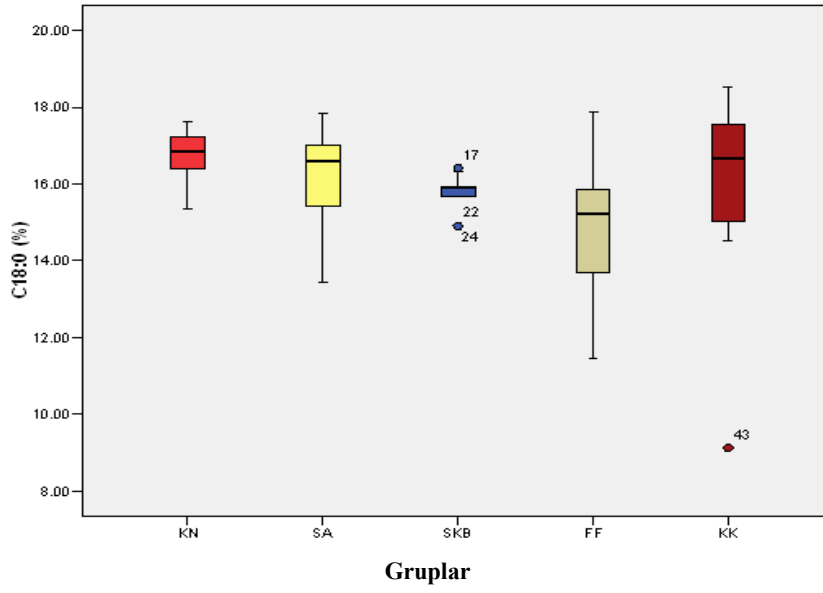
C16 plazmalojen seviyelerinde sadece FF grubunda kontrole göre anlamlı düşüş gözlenirken ($p=0,01$), diğer gruplarda kontrole göre fark bulunamadı (Tablo 4.3.) (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C16 plazmalojen yüzdesine etkileri

C18:0

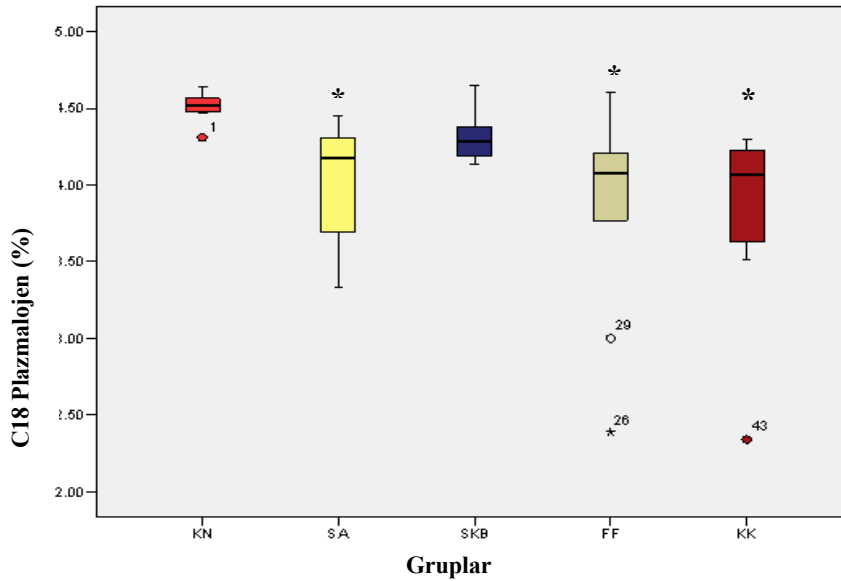
Eritrosit membranında C18:0 yüzdesi bakımından kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Şekil 4.5.). Fenofibrat uygulaması C16:0 seviyelerini yükseltirken, C18:0 yüzdesinde anlamlı değişime neden olmadı. Ratlara uygulanan kalori kısıtlamasında ise C16:0 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrole göre yükselmiş, C18:0 seviyesi ise düşüş göstermiştir.



Şekil 4.5. Sirkadiyen ritim değişikliğinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C18:0 yüzdesine etkileri

C18 Plazmalojen Düzeyleri

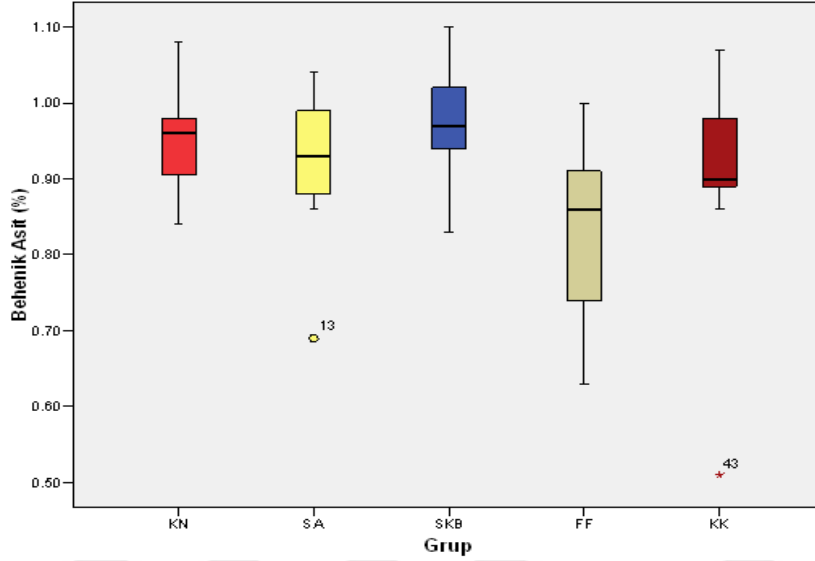
C18 plazmalojen seviyeleri analizi sonucu SA, FF, KK gruplarında kontrole göre anlamlı düşüş gözlemlendi ($p=0,0011$; $p=0,0003$; $p=0,0001$) SKB grubunda da kontrole kıyasla C18:1 DMA seviyeleri düşerken bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi. (Şekil 4.6.), (Tablo 4.3.).



Şekil 4.6. Sirkadiyen ritim değişikliğinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde C18 plazmalojen yüzdesine etkileri

Behenik Asit (C22:0)

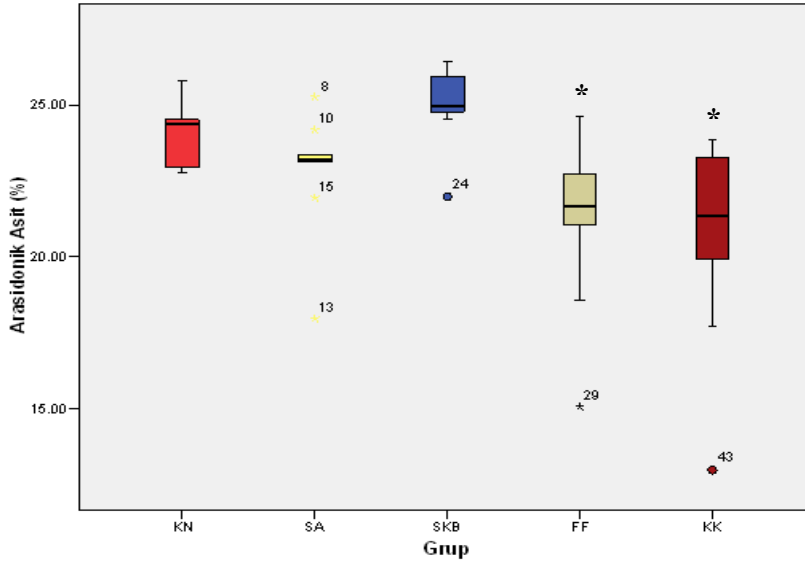
Eritrosit membranında plazmalojenlerin yapısında bulunan ve çok uzun zincirli bir yağ asidi olan C22:0 yağ asidi düzeyleri açısından gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.7.) (Tablo 4.3). Ancak FF ve KK gruplarında kontrole göre düşüş görülmektedir.



Şekil 4.7. Sirkadiyen ritim değişikliğinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde behenik asit yüzdesine etkileri

Araşidonik Asit (C20:4)

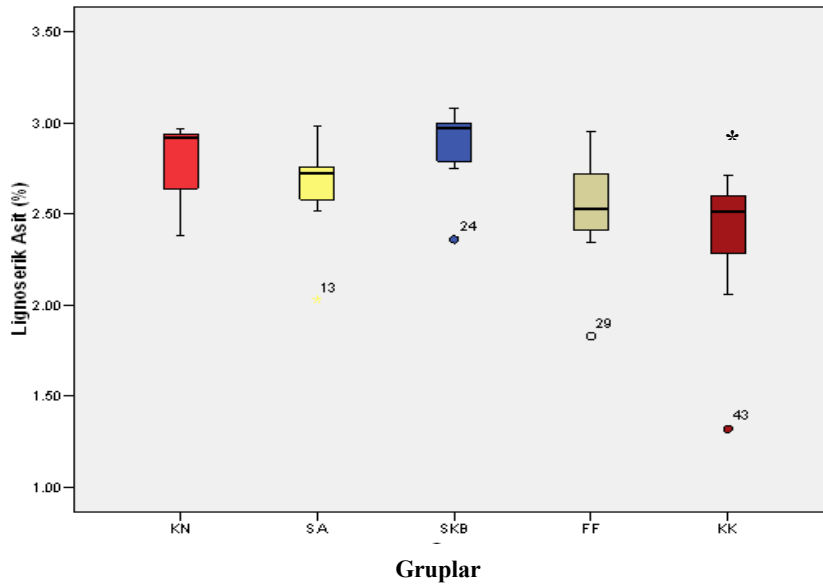
Plazmalojen lipidlerinin sn-2 pozisyonunda en çok bulunan ve eritrosit membran fosfolipidlerinin major bileşeni olan araşidonik asit seviyeleri FF ve KK gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p=0,0134$; $p=0,0127$).



Şekil 4.8. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde arasidonik asit yüzdesine etkileri

Lignoserik Asit (C24:0)

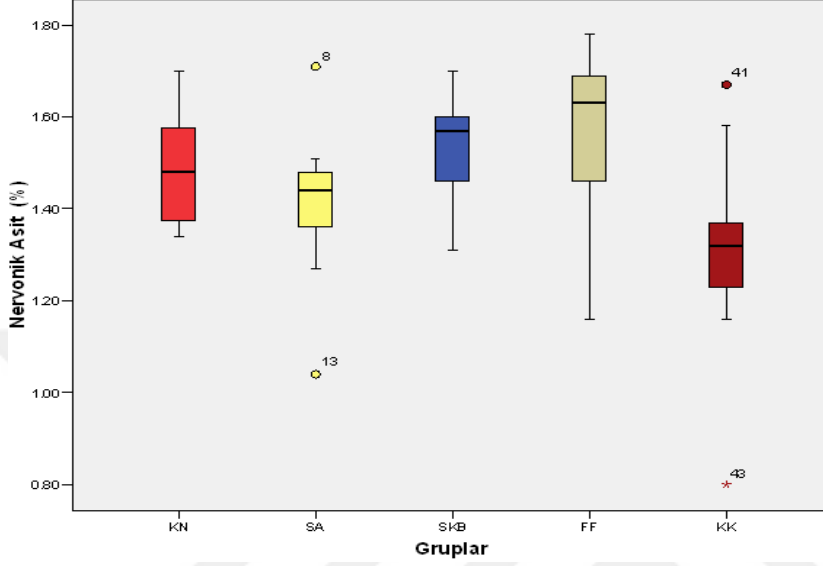
Peroksizomlarda metabolize edilen ve çok uzun zincirli doymuş bir yağ asidi olan lignoserik asit düzeyi, eritrosit membranında, KK grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüktü ($p=0,0148$). (Tablo 4.3.). Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı olmasa da FF grubunda da görülmektedir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde lignoserik asit yüzdesine etkileri

Nervonik Asit (C24:1)

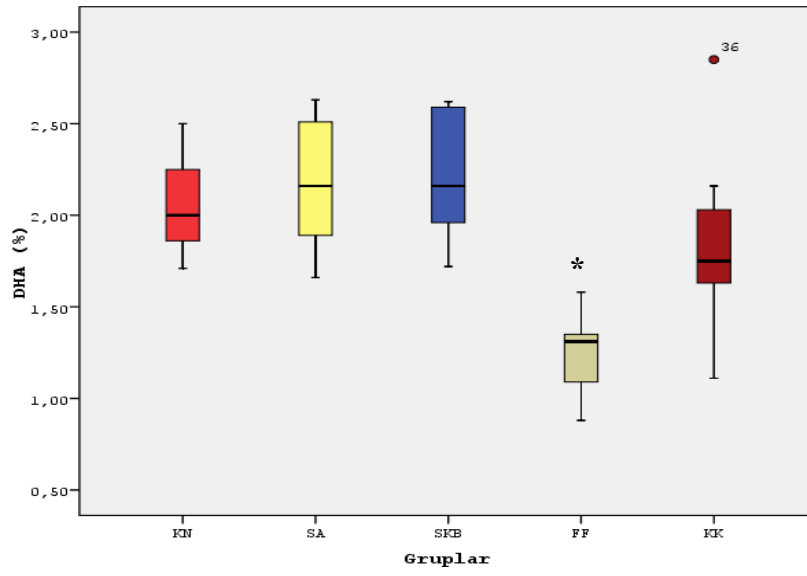
Eritrosit membranında monoansatüre çok uzun zincirli bir yağ asidi olan nervonik asit düzeylerinde kontrole göre anlamlı fark bulunamadı (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Sirkadiyen ritim değişikliğinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde nervonik asit yüzdesine etkileri

DHA (cis-4,7,10,13,16,19-dokosahekzanoik asit C22:6)

Çoklu doymamış, çok uzun zincirli bir yağ asidi olan DHA seviyelerinde eritrosit membranında sadece FF grubunda kontrole göre anlamlı düşüş belirlendi ($p=0,0001$). Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da KK grubunda DHA seviyeleri kontrole göre düşüktü. Genel olarak bakıldığında; ratlara fenofibrat ya da kalori kısıtlaması uygulanmasıyla DHA'ye benzer şekilde; lignoserik asit, behenik asit ve araşidonik asit seviyelerinde kontrole göre düşüş görülmektedir.



Şekil 4.11. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat eritrosit membranı yağ asidi kompozisyonu içinde DHA yüzdesine etkileri

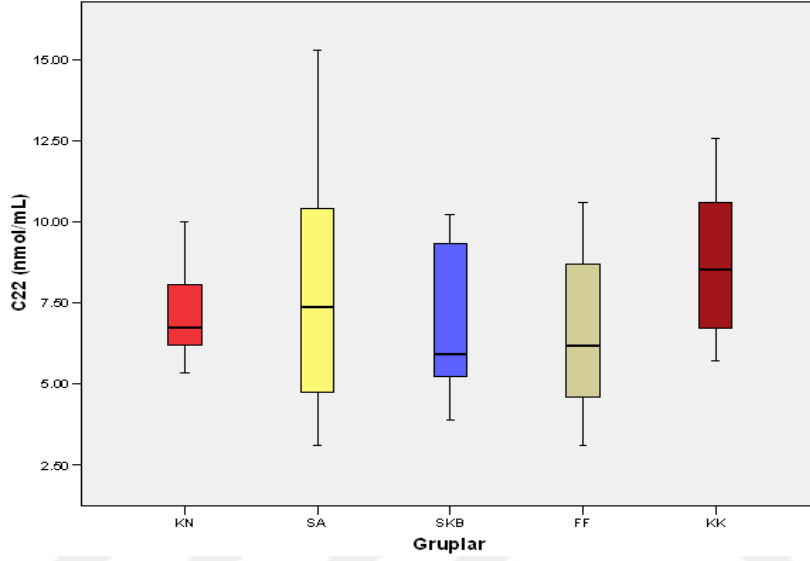
Tablo 4.3. Eritrosit membranı plazmalojen seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması

Eritrosit Membranı Plazmalojen		Minimum	Median	Maksimum	IQR	p değeri
C16:0 (n:10)	KN	20.8	22.55	23.67	0.85	0.018
	SA	16.95	23.42	24.28	1.95	
	SKB*	22.22	24.69	25.83	1.79	
	FF*	18.71	26.9	27.08	4.33	
	KK	14.28	22.71	25.19	3.55	
C16 plazmalojen (n:10)	KN	0.44	0.48	0.54	0.07	0.017
	SA	0.4	0.46	0.71	0.16	
	SKB	0.38	0.53	0.58	0.05	
	FF*	0.24	0.34	0.55	0.15	
	KK	0.28	0.42	0.6	0.16	
C18:0 (n:10)	KN	15.34	16.84	17.62	1.12	0.18
	SA	13.43	16.61	17.85	2.56	
	SKB	14.9	15.92	16.42	0.85	
	FF	11.45	15.22	17.88	3.77	
	KK	9.13	16.68	18.53	3.24	
C18 plazmalojen (n:10)	KN	4.31	4.52	4.64	0.1	0.0015
	SA*	3.33	4.18	4.45	0.69	
	SKB	4.14	4.28	4.65	0.33	
	FF*	2.39	4.08	4.6	0.88	
	KK*	2.34	4.07	4.3	0.67	
Behenik Asit (n:10)	KN	0.84	0.96	1.08	0.1	0.143
	SA	0.69	0.93	1.04	0.13	
	SKB	0.83	0.97	1.1	0.15	
	FF	0.63	0.86	1.0	0.18	
	KK	0.51	0.9	1.07	0.12	
Araşidonik Asit (n:10)	KN	22.78	24.39	25.79	1.64	0.0008
	SA	17.98	23.19	25.26	1.23	
	SKB	21.99	24.98	26.42	1.36	
	FF*	15.08	21.69	24.63	3.29	
	KK*	13	21.37	23.85	4.64	
Lignoserik Asit (n:10)	KN	2.38	2.92	2.97	0.51	0.006
	SA	2.03	2.72	2.98	0.29	
	SKB	2.36	2.97	3.08	0.27	
	FF	1.86	2.53	2.95	0.45	
	KK*	1.32	2.51	2.71	0.47	
Nervonik Asit (n:10)	KN	1.34	1.48	1.7	0.28	0.09
	SA	1.04	1.44	1.71	0.18	
	SKB	1.31	1.57	1.7	0.15	
	FF	1.16	1.63	1.78	0.39	
	KK	0.8	1.32	1.67	0.28	
DHA (n:10)	KN	1.71	2.0	2.5	0.51	0.0001
	SA	1.66	2.16	2.63	0.66	
	SKB	1.72	2.16	2.62	0.66	
	FF*	0.88	1.31	1.58	0.35	
	KK	1.11	1.75	2.85	0.55	

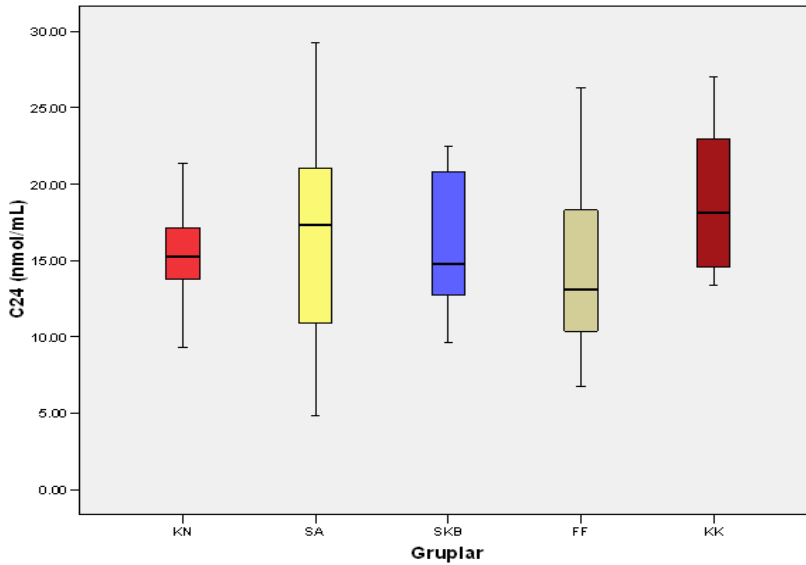
Sonuçlar Tablo 4.1'deki gibi ifade edilmiştir. Kontrole göre anlamlı değişim gösterenler “**” ile gösterilmiştir (*p <0,05).

4.2.3. Sirkadiyen Ritim Değişiklerinin Rat Plazma Çok Uzun Zincirli Yağ Asidi Düzeylerine Etkisi

Çok uzun zincirli yağ asitlerinden olan C22:0 yağ asidi seviyelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4.12.). Benzer şekilde, plazma numunelerinde C24:0 çok uzun zincirli yağ asidi seviyeleri açısından kontrole göre anlamlı fark yoktu (Tablo 4.4.) (Şekil 4.13).

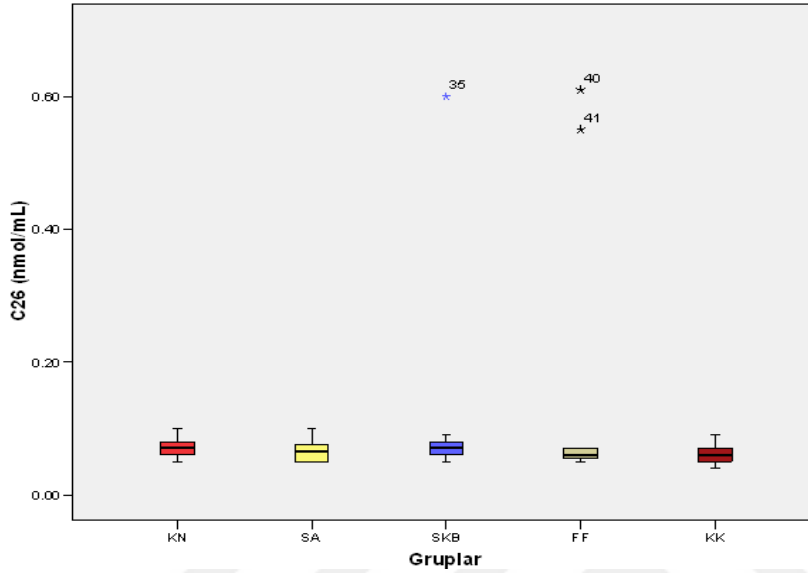


Şekil 4.12. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma C22 düzeylerine etkisi



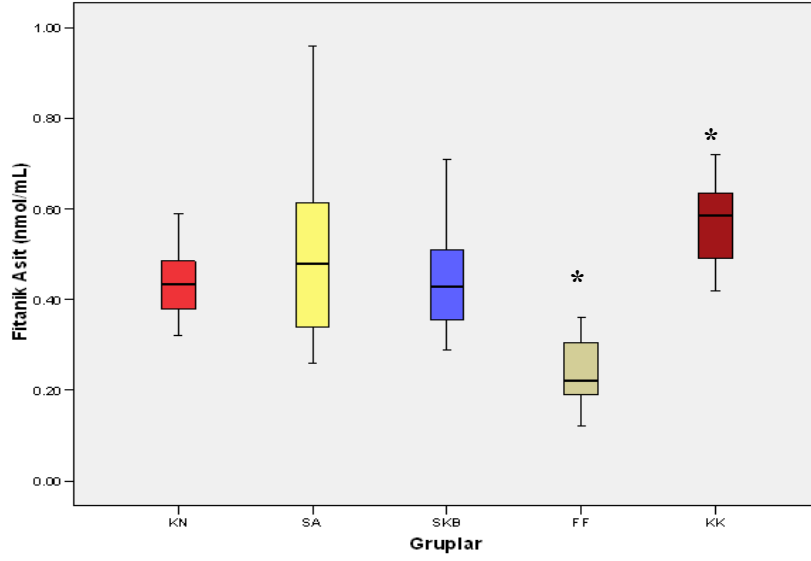
Şekil 4.13. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma C24 düzeylerine etkisi

Plazma C26:0 seviyelerinde de kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (Tablo 4.4.). Plazma C26:0 normal konsantrasyonu kontrol grubundaki ratlarda da çok düşük olup, kalori kısıtlaması veya fibrat uygulaması dramatik değişikliklere neden olmadı (Şekil 4.14.).



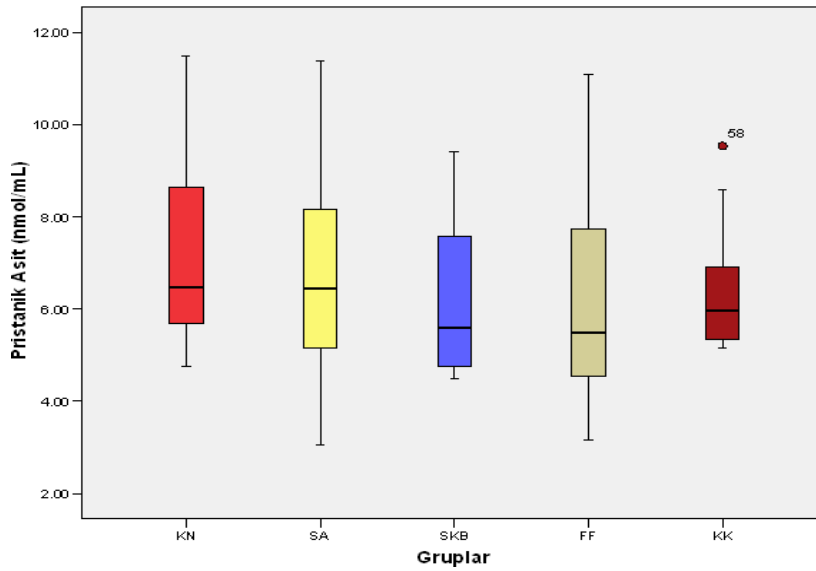
Şekil 4.14. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma C26 düzeylerine etkisi

Çok uzun zincirli yağ asitlerinden farklı olarak dallanmış hidrokarbon zincirine sahip fitanik asit (3,7,11,15-tetrametilheksadekanoinik asit) seviyelerinde FF ve KK gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak farklı bulundu (sırasıyla $p=0,00001$; $p=0,0063$) (Tablo 4.4.). C22:0 ve C24:0 yağ asitlerinde olduğu gibi fitanik asit seviyeleri de fibrat uygulaması ile azalırken, kalori kısıtlaması ile artış gösterdi. Ancak KK grubundaki bu artış C22:0 ve C24:0'daki artışın aksine istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma fitanik asit düzeylerine etkisi

Fitanik asidin α -oksidasyon ürünü olan plazma pristanik asit (2,6,10,14-tetrametilpentadekanoik asit) seviyelerinde kontrole göre gruplarda istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmedi (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma pristanik asit düzeylerine etkisi

Tablo 4.4. Plazma ÇUZYA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması

		Minimum	Median	Maksimum	IQR	<i>P</i> değeri
C22 (nmol/mL) (n=12)	KN	5,34	6,73	10,01	1,95	0,22
	SA	3,12	7,37	15,3	6,27	
	SKB	3,87	5,92	10,22	4,28	
	FF	3,12	6,17	10,6	4,60	
	KK	5,72	8,51	12,56	4,21	
C24:0 (nmol/mL) (n=12)	KN	9,32	15,28	21,37	3,50	0,275
	SA	4,84	17,3	29,3	10,9	
	SKB	9,59	14,74	22,46	8,61	
	FF	6,76	13,14	26,3	9,26	
	KK	13,36	18,13	27,05	9,17	
C26:0 (nmol/mL) (n=12)	KN	0,05	0,07	0,1	0,02	0,49
	SA	0,05	0,06	0,1	0,03	
	SKB	0,05	0,07	0,6	0,02	
	FF	0,05	0,06	0,61	0,02	
	KK	0,04	0,06	0,09	0,02	
Fitanik Asit (nmol/mL) (n=12)	KN	0,32	0,44	0,59	0,12	0,000 1
	SA	0,26	0,48	0,96	0,30	
	SKB	0,29	0,43	0,71	0,16	
	FF*	0,12	0,22	0,36	0,13	
	KK*	0,42	0,58	0,72	0,16	
Pristanik Asit (nmol/mL) (n=12)	KN	4,76	6,46	11,5	3,41	0,571
	SA	3,05	6,45	11,38	3,23	
	SKB	4,5	5,59	9,42	2,88	
	FF	3,16	5,49	11,1	3,50	
	KK	5,15	5,97	9,54	1,64	

Sonuçlar Tablo 4.1'deki gibi ifade edilmiştir. Kontrole göre anlamlı değişim gösterenler “*” ile gösterilmiştir (*p <0,05).

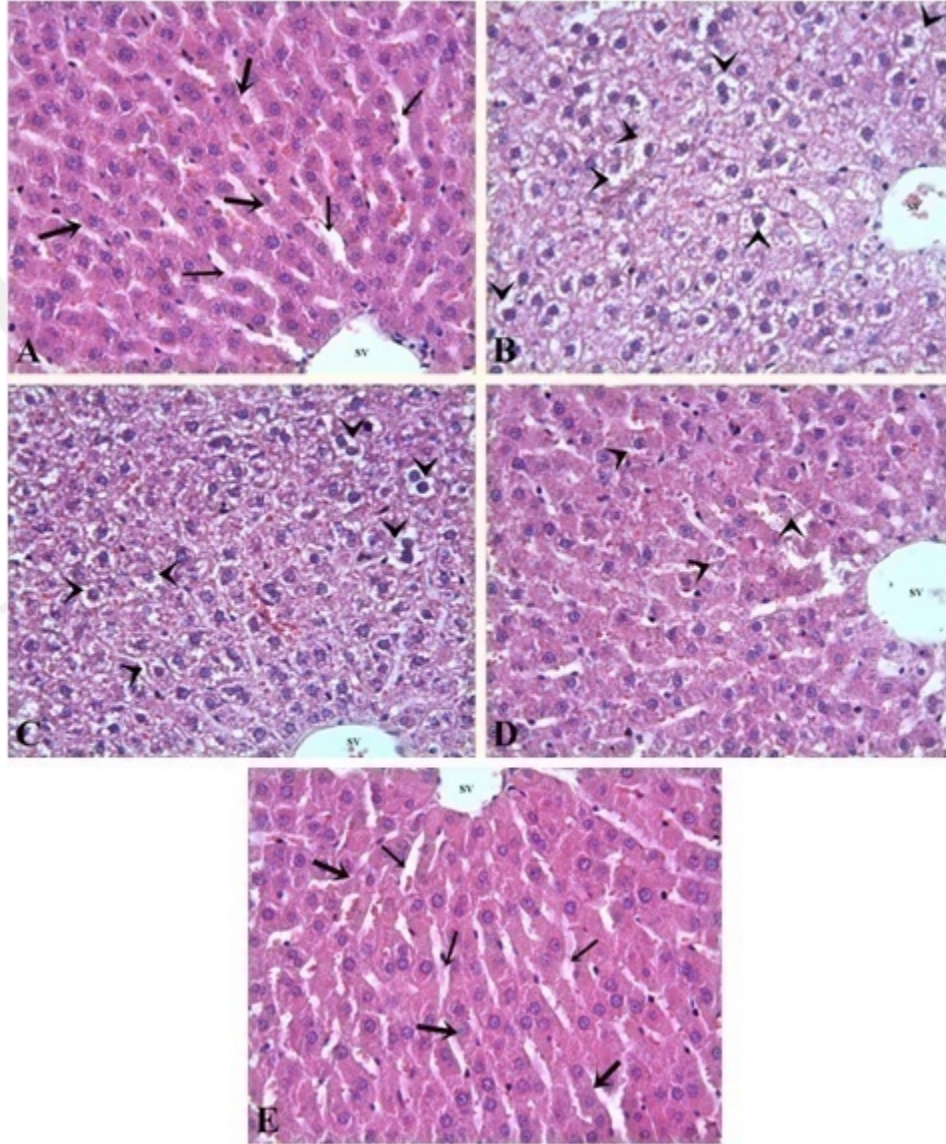
4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. Karaciğerin Genel Morfolojisi

Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama metodunun uygulandığı kesitlerde, KN grubunda karaciğer normal histolojik görünümüne sahipti. Bu grupta, hepatosit kordonları santral ven çevresinde düzenli ve ışınal bir yerleşim göstermekteydi. Hepatosit kordonları arasında yer alan sinüzoidler açık olarak izlendi. Karaciğer lobüllerinin periferinde bulunan portal alanlarda arter, ven ve safra kanalikül yapıları belirgindi. Hepatositlerin sitoplazmaları eozinofilik, nükleusları yuvarlak ve ökromatik olarak gözlemlendi (Şekil 4.17. A).

KK ve SKB grupları, KN grubu ile karşılaştırıldığında, hepatositlerde belirgin şekilde hidropik değişiklikler gözlenirken (p=0.001) (Şekil 4.17. B ve C); SA grubuna ait

kesitlerde, hafif düzeyde hidropik değişiklikler gözlemlendi (Şekil 4.17. D). KK, SKB ve SA grupları ile KN grupları arasındaki bu değişim istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. ($p=0.001$). FF grubunda ise karaciğerin, KN grubunda olduğu gibi normal histolojik görünümüne sahip olduğu izlendi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$) (Şekil 4.17. E). Hepatositlerde hidropik değişikliklerin skor sonuçları Tablo 4.5'de görülmektedir.



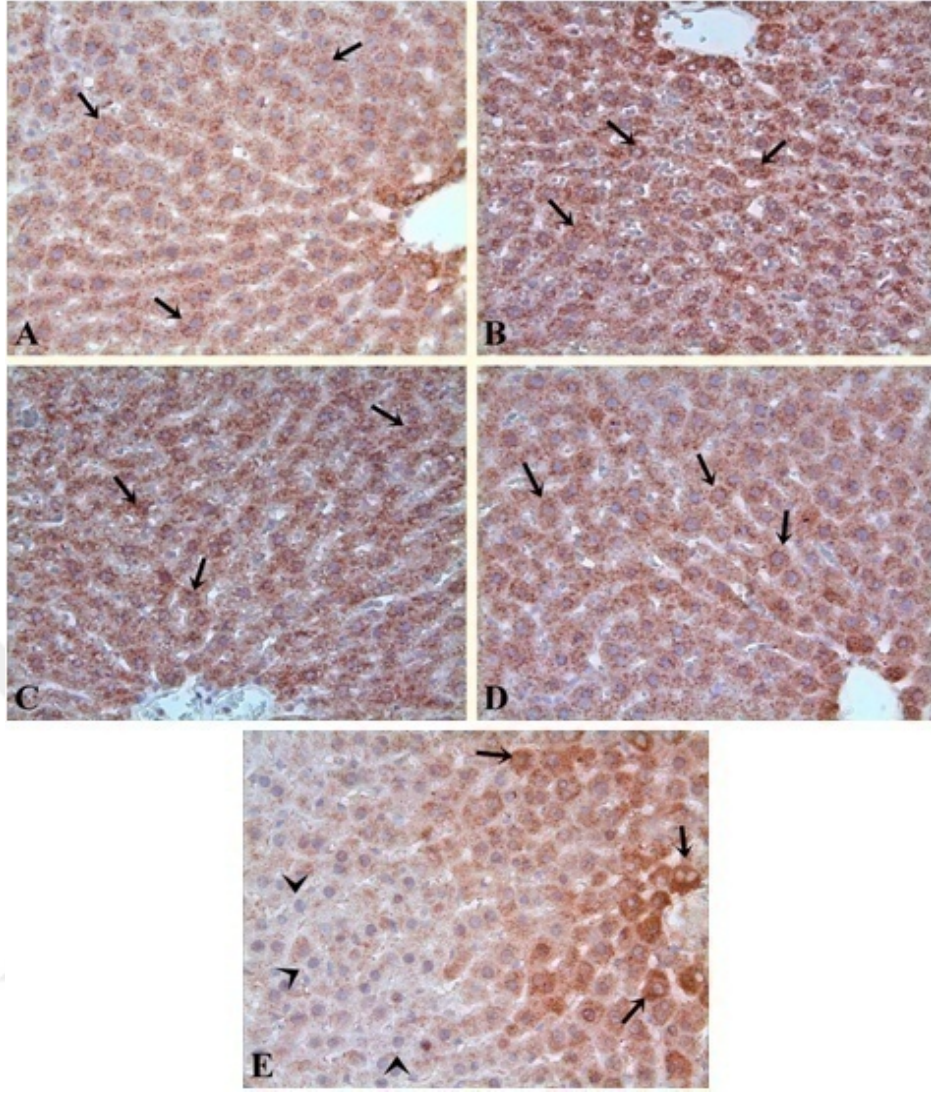
Şekil 4.17. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat karaciğer hepatositlerine etkileri

KN grubunda (A) karaciğerin normal histolojik görünümüne sahip olduğu izlenmektedir. KK (B) ve SKB (C) gruplarında hepatositlerde şiddetli hidropik değişiklikler izlenirken SA grubunda (D), hafif düzeyde hidropik değişiklikler dikkat çekmektedir. FF grubunda (E) karaciğerin görünümü KN grubuna benzerdir. SV santral veni, kalın oklar hepatosit kordonlarına, ince oklar sinüzoidlere, ok başları hidropik değişikliklere işaret etmektedir (H-E x40).

4.3.2. Katalaz İmmünreaktivitesi

İmmünohistokimya boyama metodu ile katalaz lokalizasyonu hepatositlerin sitoplazmasında gözlendi (Şekil 4.18.). Gruplar arasında, en yüksek katalaz immünreaktivitesi KK grubunda izlenirken, en düşük immünreaktivite FF grubunda tespit edildi.

KN grubunda hepatositlerde katalaz, homojen bir dağılım göstermekteydi. Bu grupta, katalaz immünreaktivitesi 8.0 (4.0-12.0) olarak tespit edildi. KK, SKB ve SA gruplarında immünreaktivitenin (sırasıyla 12.0 (12.0-16.0), 12.0 (4.0-16.0), 10.0 (4.0-12.0)), KN grubuna göre belirgin şekilde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0.001$). Bununla birlikte, katalaz, KN grubuna benzer şekilde homojen bir dağılıma sahipti. Diğer yandan, FF grubunda katalaz immünreaktivitesinde (3.0 (1.0-6.0)), KN grubu ile karşılaştırıldığında, belirgin bir azalma gözlendi ($p=0.001$). Ayrıca, bu grupta katalazın heterojen bir dağılım gösterdiği dikkat çekti. Bu gruba ait örneklerde, bazı hepatositlerin şiddetli bir immünreaktiviteye sahip olduğu izlenirken, çoğu hepatositte ise immünreaktivitenin çok az olduğu veya hiç olmadığı gözlendi. Hepatositlerde katalaz immünreaktivitesi skor sonuçları Tablo 4.5.'de görülmektedir.



Şekil 4.18. Sirkadiyen ritim değişiklerinin rat karaciğer hepatositlerinde katalaz immünreaktivitesine etkileri

A; KN, B; KK, C; SKB, D; SA, E; FF grubu. İmmünohistokimya boyama metodu ile hepatositlerde katalaz immünreaktivitesi (oklar) izlenmektedir. FF grubunda katalaz immünreaktivitesi göstermeyen hepatositler (ok başları) dikkat çekmektedir (Katalaz x40).

Tablo 4.5. Hepatositlerde hidropik değişiklikler ve katalaz immünreaktivite skor sonuçları

Gruplar (n=10)	Hidropik Değişiklikler			Katalaz İmmünreaktivitesi		
	Median	Minimum	Maksimum	Median	Minimum	Maksimum
KN	0.0	0.0	0.0	8.0	4.0	12.0
SA ^{a,b}	1.0	0.0	3.0	10.0	4.0	12.0
SKB ^{a,b}	3.0	0.0	3.0	12.0	4.0	16.0
FF ^b	0.0	0.0	0.0	3.0	1.0	6.0
KK ^{a,b}	2.5	1.0	3.0	12.0	12.0	16.0

Sonuçlar minimum, maksimum, median olarak ifade edilmiştir. ^ap ≤0.001 hidropik değişiklikler açısından KN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark; ^bp≤0.001 katalaz immünreaktivitesi açısından KN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir.

4.4. Merkezi Sirkadiyen Ritimle İlgili Plazma Parametreleri

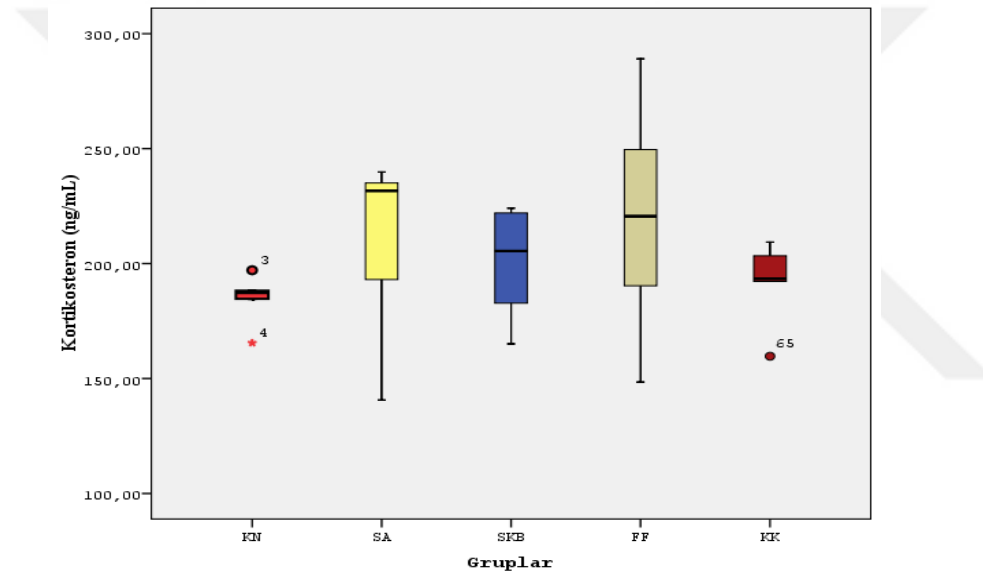
4.4.1. Rat Plazma Kortikosteron ve Melatonin Düzeyleri

Rat plazma örneklerinde günlük ritmi, merkezi sirkadiyen ritme tabii olan kortikosteron ve melatonin seviyelerinin sonuçları sırasıyla Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.'de gösterilmektedir. Sürekli aydınlık, süre kısıtlı besleme, kalori kısıtlaması ve fibrat uygulaması gibi merkezi ve/veya periferik ritmi bozmaya ya da peroksizom aktivasyonunu sağlamaya yönelik uygulamalar plazma kortikosteron düzeylerinde kontrole göre anlamlı değişiklik sağlamadı (Tablo 4.6.). Benzer şekilde melatonin düzeylerindeki değişim de kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak fibrat uygulaması, plazma melatonin seviyelerini, sürekli aydınlık, süre kısıtlı besleme ve kalori kısıtlamasına göre anlamlı derecede düşürdü (Tablo 4.7.).

Tablo 4.6. Sirkadiyen ritim değişikliklerinde rat plazma kortikosteron seviyelerinin kontrole göre değişimi

Kortikosteron (ng/mL)					
Gruplar (n:5)	Minimum	Median	Maksimum	IQR	<i>p</i> değeri
KN	165.50	187.20	197.10	17,5	0.498
SA	165.07	205.45	224.09	70.6	
SKB	140.67	231.66	239.86	49.1	
FF	148.50	220.56	249.60	0.0	
KK	159.70	193.36	209.32	30.4	

Sonuçlar Tablo 4.1'deki gibi ifade edilmiştir. Kontrole göre anlamlı değişim gösterenler “**” ile gösterilmiştir (**p* <0,05).

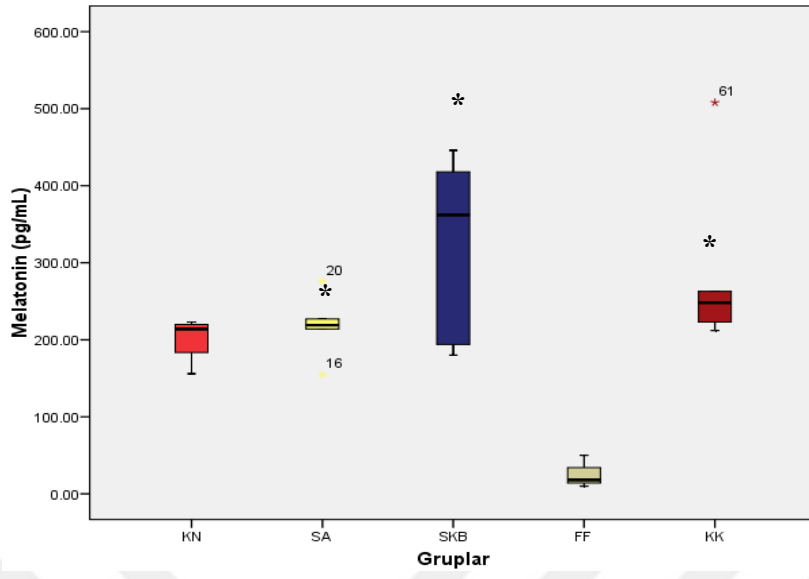


Şekil 4.19. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma kortikosteron düzeylerine etkisi

Tablo 4.7. Sirkadiyen ritim değişikliklerinde rat plazma melatonin seviyelerinin fenofibratlı yemle beslenen gruba göre kıyaslanması

Melatonin (pg/mL)					
Gruplar	Minimum	Median	Maksimum	IQR	<i>p</i> değeri
KN (n:5)	156	214	223	51,8	0.0314
SA* (n:6)	155	219.5	276	245	
SKB*(n:6)	180	362	446	67	
FF (n:7)	10	18	50	0,0	
KK*(n:7)	212	248	508	168	

Sonuçlar Tablo 4.1'deki gibi ifade edilmiştir. FF grubuna göre anlamlı değişim gösterenler “**” ile gösterilmiştir (**p* <0,05).



Şekil 4.20. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin rat plazma melatonin düzeylerine etkisi

4.5. Sirkadiyen Ritim Değişikliklerinde Melatonin Referansında Bazı Lipid Parametrelerinin Oranları

Tablo 4.8.1. Melatonin/yağ asidi veya plazmalojen oranlarının kontrole göre değişim şeması

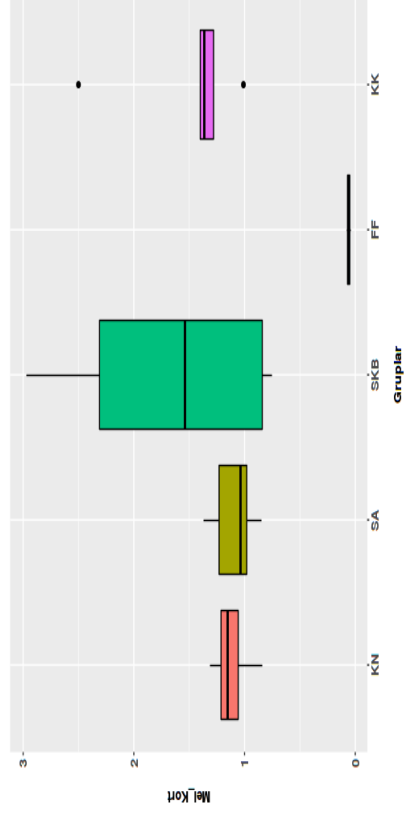
Mel/C16:0 (ng/mL/%) n=5	Mel/C16 Plz (ng/mL/%) n=5	Mel/C18:0 (ng/mL/%) n=5	Mel/C18 Plz (ng/mL/%) n=5	Mel/Behenik asit (ng/mL/%) n=5	Mel/Araşidonik asit(ng/mL/%) n=5	Mel/Lignoserik asit (ng/mL/%) n=5	Mel/Nervonik asit (ng/mL/%) n=5	Mel/DHA (ng/mL/%) n=5	Mel/C22:0 (ng/mL/nmol/mL) n=4	Mel/C26:0 (ng/mL/nmol/mL) n=4	Mel/Fitanik asit (ng/mL/nmol/mL) n=4	Mel/Pristanik asit(ng/mL/nmol/mL) n=4
SA↑ p=0,119	SA↑ p=0,32	SA↑ p=0,14	SA↑ p=0,01	SA↓ p>0,05	SA↑ p=0,03	SA↑ p=0,05	SA↑ p=0,06	SA↑ p=0,66	SA↑ p=0,26	SA↑ p=0,28	SA↑ p>0,05	SA↑ p=0,11
SKB↑ p=0,0002	SKB↑ p=0,12	SKB↑ p=0,04	SKB↑ p=0,004	SKB↑ p>0,05	SKB↑ p=0,02	SKB↑ p=0,03	SKB↑ p=0,02	SKB↑ p=0,28	SKB↑ p=0,16	SKB↑ p=0,74	SKB↑ p>0,05	SKB↑ p=0,09
FF↓ p=0,007	FF↓ p=0,01	FF↓ p=0,02	FF↓ p=0,03	FF↓ p>0,05	FF↓ p=0,03	FF↓ p=0,03	FF↓ p=0,03	FF↓ p=0,01	FF↓ p=0,06	FF↓ p=0,05	FF↓ p>0,05	FF↓ p=0,13
KK↑ p=0,026	KK↑ p=0,35	KK↑ p=0,12	KK↑ p=0,01	KK↓ p>0,05	KK↑ p=0,01	KK↑ p=0,03	KK↑ p=0,03	KK↑ p=0,14	KK↑ p=0,56	KK↑ p=0,07	KK↑ p>0,05	KK↑ p=0,06

Kontrolde göre istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırılmalar koyu yazılmıştır. Her bir grupta melatonin/yağ asidi veya plazmalojen oranları aynı rata ait değerler kullanılarak elde edilmiştir.

Tablo 4.8.2. Grupların melatonin/yağ asidi veya plazmalojen oranları sayısal değişim şeması

	Mel/C22 (pg/mL/ nmol/mL)	Mel/C24 (pg/mL/ nmol/mL)	Mel/C26 (pg/mL/ nmol/mL)	Mel/Fitanik asit (pg/mL/ nmol/mL)	Mel/Pristanik asit (pg/mL/ nmol/mL)	Mel/C16:0 (pg/mL/%)	Mel/C16 Pz (pg/mL/%)	Mel/C18:0 (pg/mL/%)	Mel/C18 Pz (pg/mL/%)	Mel/Behnik asit (pg/mL/%)	Mel/Araşidonik asit (pg/mL/%)	Mel/Lignoserik asit (pg/mL/%)	Mel/Nervonik asit (pg/mL/%)	Mel/DHA (pg/mL/%)	Mel/Kortikosteron (pg/mL/ng/mL)
KN	27.2	11.2	3120	452.1	24.3	9.2	425.1	13.2	47.2	0.98	8.8	75.1	132.1	101.9	1.15
SA	41.1	18.04	4280	630.6	40.5	10.69	546.5	15.8	61.4	0.94	10.7	95.5	169.3	105.5	1.04
SKB	49.1	21.6	3160.7	539.5	50.8	61	599.7	20.4	75.5	1.02	12.7	111.9	219.2	148.9	1.54
FF	2.5	1.01	170	59.9	2.6	0.42	31.2	0.6	2.4	0.88	0.5	4.01	6.3	7.2	0.06
KK	34.4	15.3	4400	504.8	39.6	10.75	447.3	14.5	58.8	0.94	11.2	98.3	179.5	142.1	1.36

Tablo 4.8.1. 'de gösterilen oranlara ait sayısal veriler şemasıdır.



Şekil 4.21. Sirkadiyen ritim değişikliklerinin melatonin/kortikosteron düzeylerine etkisi

Tablo 4.9. ÇUZUYA, plazmalojen düzeyleri ile karaciğer immunohistokimyasal analiz sonuçlarındaki kontrole göre anlamlı değişimler şeması

ÇUZUYA (Plazma)	PLAZMALOJEN (Eritrosit)	HİSTOLOJİK İNCELEME (Karaciğer)
Fitanik asit FF↓ KK↑	C16:0 FF↑ ve SKB↑	Hidropik Değişiklik KK↑ SA↑ ve SKB↑ (SKB>KK>SA)
C16 Plz	FF↓	Katalaz İmmünreaktivitesi KK↑ SA↑ ve SKB↑; FF↓
C18 Plz	SA↓ FF↓ ve KK↓	
Araşidonik Asit	FF↓ ve KK↓	
Lignoserik asit	KK↓	
DHA	FF↓	

5. TARTIŞMA

Sirkadiyen ritim bozukluklarının metabolik sonuçlarının merkezi ve periferel sirkadiyen saatler arasındaki senkronizasyon bozukluğundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Merkezi sirkadiyen saat; kortikosteron, melatonin gibi hormonların günlük osilasyonunu sağlayarak periferel saati senkronize etmektedir. Uyku sınırlandırmasının bir sonucunun sirkadiyen senkronizasyondaki bozulmalar olması sebebiyle, uyku sınırlandırılması yapılmış rat ve insanlarda detaylı metabolik profil çalışmaları yapılmıştır. Değişen metabolitler arasında, okzalik asit ve diaçilgliserolün (36:3) her iki türde de önemli oranda azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, daha kısa zincirli triaçilgliserollerin birikiminin işaret ettiği uzun zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyonlarındaki azalma ve bazı fosfolipidlerdeki oksidasyon ile bağlantılı metabolitlerdeki artış PPAR yoluyla peroksizomal aktivasyona işaret etmektedir (15).

İnsanlarda akut uyku sınırlandırılmalarında yapılan metabolik profil çalışmalarında, 27 metabolitin önemli oranlarda artış gösterdiği, bu 27 metabolitin 13 ünün gliserofosfolipid olduğu ortaya konulmuştur. Bunlar arasında lizoPC (C14:0), lizoPC (C18:1), PC (C32:0, 32:1, 32:3, 34:4, 36:6, 38:4, 40:5, 40:6) gibi fosfolipidler bulunmaktadır (57). Fare plazmasında sirkadiyen osilasyon gösteren lipidler arasında çeşitli tipte lizofosfatidil kolinler (18:1, 22:4, 22:6, 22:5, 20:4, 20:3, 20:2) LC-MS analizleri ile tespit edilmiştir (58). İnsan kanında ise sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitler arasında PG (18:1, gliserofosfolipid) ve lizofosfolipid (LysoPC (16:1) gösterilmiştir (59). Sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitler ile sirkadiyen ritim bozukluklarında düzeyleri değişen metabolitler fosfolipidler üzerinde kesişmektedir. Peroksizomların diaçilgliserol ve eter bağlı fosfolipidler ürettiği göz önüne alındığında sirkadiyen ritim bozuklukları ve peroksizomal metabolizma arasındaki bağlantı düşünülebilir. Ancak sirkadiyen ritim bozukluklarının peroksizomal lipid metabolizmasını nasıl etkilediği bilinmemektedir. Plazmalojenler ağırlıklı olarak peroksizomlarda sentezlendiğinden, mevcut tez çalışmasında sirkadiyen ritim bozukluklarının (gerek merkezi gerekse periferel) peroksizomal lipid metabolizmasını etkileyip etkilemediğinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda ratlar, sirkadiyen ritmi etkilediği bilinen kalori kısıtlaması, süre kısıtlı besleme ve sürekli aydınlık gibi sirkadiyen ritmi etkilediği bilinen üç farklı duruma maruz bırakılmıştır. Bu üç durumdan kalori kısıtlaması hem merkezi hem de periferel sirkadiyen ritmi değiştirirken, süre

kısıtlamalı besleme yalnız periferik ritmi, sürekli aydınlık ise merkezi sirkadiyen ritmi değiştirmektedir (36, 121). Ayrıca peroksizomların aktivasyonu sonucunda plazmalojen kökenli kan lipid parametrelerindeki değişimin diğer sirkadiyen ritim bozukluğu oluşturulan grup ile karşılaştırılması amacıyla yönelik olarak PPAR α agonisti olan fenofibrat verilen bir rat grubu da oluşturulmuştur. Böylece peroksizomların uyarılması ile sirkadiyen ritim bozuklukları arasında peroksizomal kökenli bazı kan lipid parametreleri arasında bir karşılaştırma yapılması amaçlanmıştır. Sirkadiyen ritim bozukluklarının peroksizomal lipid metabolizmasını etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi ve peroksizom kaynaklı lipidlerin sirkadiyen ritim bozukluklarının belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı test edilmiştir.

Çalışmamızda FF grubunda plazma fitanik asit ve TG seviyelerinin düşüşü peroksizomal aktivasyonu işaret etmektedir. Plazma fitanik asit ve TG konsantrasyonu kontrole göre düşerken karaciğer kesitlerinde bu grupta katalaz immün reaktivitesinde heterojen bir değişim söz konusudur. Hücrelerin besin durumu ve ksenobiyotik uyarılarına göre peroksizom sayısı ve fonksiyonlarını ayarladığı bilinmektedir (122). Peroksizomal bir belirteç olan katalaz genel olarak organel bazında peroksizomlara lokalize olmuştur (123). Hem içeren tetramer yapıdaki bu protein doku bazında ise en yüksek oranda karaciğer olmak üzere, böbrek, kırmızı kan hücresinde, en düşük oranda ise beyinde bulunur (124). Katalazın temel fonksiyonu ise çok uzun zincirli yağ asitlerinin b-oksidasyonu sonucu açığa çıkan H₂O₂'i detoksifiye etmektir. Çalışmada incelediğimiz karaciğer kesitlerinde katalaz immünreaktivitesi heterojen bir görünüme sahipti. Karaciğerdeki değişimler ilk olarak santral ven etrafındaki hepatositlerde başladığından buradaki peroksizomlarda katalaz şiddetli boyanırken periferdekiler daha az boyanmıştı. Bu durum yeme katılan fibratin dozunun yeterli olduğunu ancak, 2 haftalık fibratlı yem uygulamasının akut etki yarattığını ve uygulama periyodunun kısa geldiğini göstermektedir. Bununla birlikte katalaz miktarının FF grubunda kontrole göre düşük bulunmasının iki nedeni olabilir. Bunlardan birincisi fenofibratlı yemle beslenen bu grupta ikinci haftanın sonunda aşırı miktarda H₂O₂ açığa çıkmış olması, diğeri ise katalaz aktivasyonunu gerçekleştiremeyecek kadar az H₂O₂ açığa çıkmış olmasıdır. Analiz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 3 hafta süreyle %0,23 (ağırlık/ağırlık diyet) oranında fenofibrat içeren yemle beslenen ratlarda katalaz, ürikaz ve açil CoA oksidaz enzim aktivitelerinde artış gözlenirken, H₂O₂ konsantrasyonu daha 2. haftada %89 oranında artış göstermiştir (125). Ancak bu çalışmada gerek yemdeki fibrat oranı ve gerekse ratların bu yemle beslenme süresi bizim uygulamamızdan daha fazladır. Bu

farklılık göz önüne alındığında FF grubunda karaciğerde hidropik değişikliğin olmaması ve katalaz miktarındaki düşüş, %0.1 oranında fenofibrat içeren yemle 2 hafta beslemenin H₂O₂ seviyelerinde önemli artışa neden olmadığını göstermektedir. Nitekim yapılan çalışmalar katalazın aktiflenmesi için H₂O₂'in belli bir konsantrasyonda olması gerektiğini, düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında katalazın aktif hale geçmediğini, peroksidaz gibi davrandığını ve bazı substratların oksidasyonunu katalizlediğini göstermiştir (126). Böyle bir durumda katalazın görevini GPx ve peroksiredoksin adında bir protein üstlenmektedir (124). Çalışmamızda, katalaz immün reaktivitesinin kontrole göre düşüş göstermesinin diğer bir nedeni fibratlı yemin aşırı miktarda H₂O₂ açığa çıkarmış olması ihtimalidir. Açığa çıkan yüksek miktardaki H₂O₂ katalazın kataliz sınırını aşmış ve metabolize edilemeyen kısmı da peroksizomlara penetre olmuş olabilir. Nitekim rodentlerde peroksizom proliferatörlerinin uzun süre kullanımının karaciğerde oksidatif stresi ve katalaz aktivitesini arttırmaksızın H₂O₂ üreten pek çok enzimi indüklediğini göstermiştir. Aşırı miktarda H₂O₂ meydana geldiğinde katalaz belli tip durumlarda sitozole veya nükleusa göç edebilmektedir (127). Katalazın yüksek H₂O₂ konsantrasyonlarındaki sitozole göçü çalışmamızın karaciğer imminohistokimyasal analizinde peroksizomlardaki katalaz immünreaktivitesinin FF grubundaki düşüşünün olası nedenlerinden biridir. Ayrıca ratlarda PPAR α reseptörleri uyarımının kalp ve iskelet kasında beta oksidasyonu ve oksidatif stresi uyarıp kas hasarına neden olduğu gösterilmiştir (128). Bunun yanı sıra PPAR α 'nın yağ asidi ya da fibratla aktivasyonu PEX11 α 'nın ifadesinde artışa neden olmaktadır. PEX11 α peroksizom proliferasyonunda görevli bir proteindir, bu yolla peroksizom sayısı artmakta ve farklı dokularda yağ asidi oksidasyonu gerçekleşmektedir (122). PPAR α 'nın hem mitokondriyel ve hem de peroksizomal β -oksidasyon sistemini aktive etmesi rodentlerde aşırı miktarda enerji yıkımına yol açmakta bu da oksidatif hasar meydana getirebilmektedir (129). PPAR- α yalnız karaciğerde değil pek çok ekstrahepatik dokuda ifade edilen ve lipid metabolizmasında kilit öneme sahip bir regülatör moleküldür. Hepatik PPAR- α açığa yanıt olarak lipid mobilizasyonunu ve oksidasyonunu sağlamaktadır. Hepatik PPAR- α ifadesindeki kusur ya da yetmezlik durumlarında yağ asidi oksidasyonunu ekstrahepatik dokulardaki PPAR- α gerçekleştirmektedir. Bu durumunun karaciğerde steatoza neden olduğu ve nonalkolik karaciğer hastalığı gibi hastalıklara yol açtığı bildirilmiştir. Böyle bir durumda PPAR- α takviyesinin, stetozu azaltabileceği yönünde veriler mevcuttur (130). Bunun yanında son yapılan çalışmalar PPAR agonisti ilaçların kesilmesiyle peroksizom yıkımının arttığını bildirilmiştir. Peroksizomların yıkımı ile ilgili öne sürülen

hipotezlerden en önemlisi ise otofajidir (peksifaji). Otofaji, lizozomal enzimlerle peroksizomların parçalanması ve yıkımını ifade eder. Peroksizom proliferatörleri gibi ilaçların kullanımının kesilmesiyle etkileri tersine dönmekte ve otofaji yoğun bir şekilde aktiflenmektedir (131). 2 hafta süreyle bir peroksizom proliferatörü olan %2 oranında di-(2-etilhekzil) ftalat ile beslenen farelerde ilacın kesilmesiyle yoğun bir otofaji gözlenmiştir. Mikroskopik ve morfolojik analizlerde 1 hafta sonunda ftalat tarafından indüklenen peroksizomların yaklaşık %70-80'inin bu yolla yıkıldığı belirlenmiştir (132). Bunun yanında yine ratlarda yapılan araştırmalar, açıl CoA oksidaz enziminden zengin peroksizomların otofajiye daha dirençli olduğunu ve yıkımın peroksizomun yaşıyla doğru orantılı olarak artış gösterdiğini ifade etmiştir (133). Çalışmamızda karaciğerin immünohistokimyasal analizinde FF grubunda peroksizom sayısının göstergesi olarak kullandığımız katalazın az boyanmasının olası diğer bir nedeni de fibratlar tarafından indüksiyonun ardından özellikle yaşlı peroksizomların yoğun yıkımıdır. Peroksizomal enzimlerin yarı ömürlerinin 1,3- 2,1 gün arası olduğu düşünüldüğünde bu hipotez biraz daha güç kazanmaktadır. Fareler üzerinde yapılan bazı çalışmalar ise fenofibratın karaciğerde antioksidan enzim seviyelerini arttırdığını göstermiştir. Ancak fibratlar gibi PPAR agonisti ilaçlar katalaz aktivitesinde dramatik yükselişlere neden olmamaktadır (134). Bu agonist ilaçlar peroksizom β -oksidasyonunda görev alan açıl CoA oksidaz gibi genlerin ifadelerini ilacın dozuna ve yapısına bağlı olarak 10-30 kat arttırırken, katalaz aktivitesini ise sadece 1-2 kat arttırmaktadır (135).

PPAR- α temel olarak yağ asidi ve kolesterol metabolizmasında görevli genlerin ifadelerini düzenleyerek, TG sentezini ve bunların karaciğerden salınımını inhibe etmekte, yağ asidi oksidasyonunu ise aktiflemektedir (136, 137). Fibratın bu etkilerinin yanında lipoprotein lipaz aktivitesini ve ters kolesterol taşınımını arttırdığı yönünde de bilgiler mevcuttur (138). Nitekim çalışmamızda fenofibratlı yemle beslenen grupta TG seviyeleri kontrole ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. Bunların yanı sıra sadece peroksizomlarda metabolize edilebilen plazma fitanik asit seviyeleri çalışmamızda kontrole göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. FF grubundaki bu düşüş peroksizomal aktivasyonla açıklanabilmektedir. Çünkü fenofibratlı yemle beslenen FF grubunda peroksizomal aktivasyon sonucunda α -oksidasyon uyarılmış ve fitanik asit oksidasyonu sağlanmıştır. Fibratların etkisine benzer şekilde açlık gibi besinsel modifikasyonların da peroksizomal ve mitokondriyel yağ asidi oksidasyonunu kontrol ettiği ileri sürülmektedir (139). Nitekim; ratlar üzerinde akut kalori kısıtlaması uygulanan çalışmalarda, lipoliz ve β -oksidasyon artarken pek çok

plazmalojen türünde özellikle de kolin plazmalojenlerde düşüş gözlenmiş olup, dallı zincirli yağ asidi konsantrasyonunun ise arttığı rapor edilmiştir (140). Bu durum çalışmamızda KK grubunda fitanik asit seviyelerinin artışını açıklamaktadır. KK grubundaki bu yağ asidinin artışının diğer bir nedeni de peroksizomal aktivasyonun yavaşlaması olabilir.

Çalışmamızda KK ve SKB gruplarında katalaz immünreaktivitesinde artış ve karaciğerde belirgin hidropik değişiklikler gözlenmiştir. KK ve SKB gruplarında kalori kısıtlaması ratların günlük ihtiyacı olan gerek yağda çözünen vitaminler gerekse eser element ve esansiyel beslenme faktörlerinin azalmasına sebep olmaktadır. Esansiyel beslenme faktörlerinin bu gruplardaki deneklerce az alınması kontrole göre karaciğerde belirgin hidropik değişikliğe neden olmaktadır. Bunun yanında açlık adipoz dokudan trigliserid mobilizasyonunu ve β -oksidasyonunu arttırmaktadır. Yağ asidi oksidasyonunda flavoprotein bağımlı dehidrogenaz enzim katalizi sonucu H_2O_2 açığa çıkar. Bu H_2O_2 de katalazı aktifleyerek KK ve SKB gibi kalori alımı kısıtlanmış gruplarda peroksizomal katalaz miktarının artmasına neden olmuş olabilir. Benzer şekilde besin kısıtlaması modeli oluşturulan ratlarda karaciğerde katalaz aktivitesi %53 oranında artış göstermiştir. Besin kısıtlamasının zaten pek çok türde yaşam süresini uzattığı ve çeşitli hastalıklara karşı koruyucu rolü olduğu bilinmektedir. Bu etkisini oksidatif stresi azaltarak ve/veya antioksidan enzim ifadelerini arttırarak yaptığı ileri sürülmektedir (141). Rotiferler (*Bachionus plicatilis*) üzerinde yapılan çalışmalar kalorisi kısıtlanan annelerin çocuklarında antioksidan enzim seviyelerinin normal rotiferlere göre daha yüksek bulmuştur (142). Yine farelerde kalori kısıtlamasının vücut total yağ kütlelerini, insulin ve glukoz seviyelerini düşürdüğü ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (143). Bunun sebebi de antioksidan enzim miktarının artması olabilir. Nitekim kalori kısıtlaması uygulanan ratlarda plazma MDA seviyeleri düşerken, katalaz, SOD, GSH ve GPx seviyelerinin arttığı belirlenmiş benzer sonuçlar hemolize eritrosit örneklerinde de elde edilmiştir (144, 145).

Ratlarda melatonin ve kortikosteron sirkadiyen ritim göstermektedir. Merkezi sirkadiyen saatin, kortikosteronun ve melatoninin günlük osilasyonunu sağlayarak periferel saati senkronize ettiği bilinmektedir. Çalışmamızda plazma kortikosteron seviyeleri açısından kontrole göre anlamlı fark bulunamadı. Plazma melatonin seviyeleri ise FF grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede daha düşük bulundu. Bu durum merkezi sirkadiyen ritimde bir faz kaymasına işaret etmekte ve fibratin biyolojik saati etkilediğini göstermektedir. PPAR'lar metabolizma ile sirkadiyen saat arasındaki irtibatı

sağlayan önemli bir nükleer reseptörlerdir. Aynı ratın değişik sirkadiyen saat dilimlerinde bu iki parametre açısından takibi daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

Çalışmamızda, SKB hariç tüm gruplarda eritrosit membranında plazmalojen düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrole göre düşük bulunmuştur. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrole göre SKB grubunda da plazmalojen seviyeleri düşüş göstermiştir. FF grubunda ise hem C16 plazmalojen hem de C18 plazmalojen seviyeleri düşüş gösterirken, diğer gruplarda sadece C18 plazmalojen seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Bu metabolitlerin seviyelerinin kontrolü temel olarak peroksizomlarla ilişkilidir. Bu durum plazmalojen sentezindeki azalma ya da yıkımındaki artıştan kaynaklanabilir. Ayrıca eritrosit membranının plazma lipoproteinleriyle etkileşim içinde olduğu bilinmektedir. Fosfolipid transfer proteini (FLTP) nonspesifik bir lipid taşıyıcısıdır ve baskın olarak karaciğerde ifade edilmektedir. Çalışmalar bu taşıyıcı proteinin tüm fosfolipid türlerinin transferini gerçekleştirdiğini ayrıca, transfer hızının *sn-1* ve *sn-2* pozisyonlarına bağlı yağ açil zincirinden bağımsız olduğunu göstermiştir. (146). Bu proteinin primer görevlerinden biri de dolaşımda HDL'ye bağlanarak fosfolipid ve kolesterolü ApoB içeren lipoproteinlerden HDL'ye aktararak lipoproteinler arası fosfolipid değişimini katalizlemektir (147, 148). FLTP'nin promotor bölgesinde PPAR için tanıma bölgeleri bulunmakta ve transkripsiyonu büyük oranda PPAR- α ile düzenlenmektedir. Nitekim, fenofibratla beslenen fosfotidilkolin fosfotransferaz knockout (FKFT)^{-/-} farelerde lipid ve glukoz metabolizmasının bozulduğu bildirilmiştir (146, 149). Bu dinamik fosfolipid değişimi eritrosit membranındaki fosfolipidlerin düşüşünü açıklamaktadır. Plazmalojen sentezinde dihidroksiaseton fosfat açil transferaz (DHAF-AT) plazmalojen sentezinin ilk basamağını katalizleyen regülatör bir enzimdir ve rat karaciğerinde peroksizomlara lokalize olmuştur (150, 151). DHAF-AT aktif bölgesi peroksizomların iç yüzeyinde yer alır (152). Rat karaciğeri üzerinde yapılan çalışmalar fenofibrat gibi potent etkisi yüksek, fibrat türevi bir ilacın peroksizomal yağ açil CoA oksidaz enzim aktivitesini arttırırken, DHAF-AT enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir indükleyici aktivitesinin olmadığını göstermiştir (153). Klofibrat gibi daha az potent fibrat türevi ilaç yine rat karaciğerinde peroksizomal yağ açil CoA oksidaz enzim aktivitesini arttırırken, DHAF-AT enzim aktivitesini değiştirmemiştir (154). Bu durumda fibrat uygulamasının plazmalojen sentezini arttırmamış olma ihtimali yüksektir. FF grubundaki plazmalojen seviyelerinin düşüşüne istinaden peroksizomal uyarımın ve sirkadiyen ritim desenkronizasyonunun membran fosfolipidlerini aynı yönde etkilediğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda FF grubuna benzer

olarak KK grubunda da plazmalojen seviyeleri kontrole göre düşük bulunmuştur. Plazmalojen sentezinin lipogenezele bağlantılı bir yolak olduğu bilinmektedir. Bu durum lipogenezin baskılandığını metabolizmanın yağ asidi oksidasyonuna yöneldiğine işaret etmektedir. Açlıkla uyarılan yağ asidi oksidasyonu sonucu plazmalojen sentezi için gerekli yağ alkolü azalmış bu da plazmalojen seviyelerinde düşüşe yol açmış olabilir. Bunula birlikte diyet ve yaşam şeklinin hem serum lipidlerini hem de eritrosit membranı lipid profilini etkilediği bilinmektedir (155). Ayrıca sitokrom c'nin plazmalojenaz aktivitesi olduğu bilinmektedir. Oksijen varlığında sitokrom c plazmalojenlerdeki vinil eter bağı okside ederek lizofosfolipid oluşumunu katalizlemektedir (156, 157). Kalori kısıtlamasının ratlarda oluşturacağı oksidatif stres düşünüldüğünde sitokrom c aktivasyonu ile birlikte plazmalojenlerin yıkımı da artış göstermiş olabilir. Ancak KK aynı zamanda yağ asidi oksidasyonunu arttıracığından bu uygulama ritim bozukluğunun yaratacağı etkiyi gölgelemekte ve ritim değişikliğinin etkisini değerlendirmeye engel olmaktadır. Bunların yanı sıra, plazmalojenlerin yarı ömürlerinin oldukça kısa olduğu rapor edilmiş ve farklı dokularda farklı yarı ömre sahip oldukları belirtilmiştir. Kolin plazmalojenlerin yarı ömrü 30 dakika iken, etonolamin plazmalojenlerin yarı ömrü 3 saat kadardır (63). Bu metabolitin yarı ömrünün az frekansının yüksek olması peroksizomal bozukluklarda akut cevabın değerlendirilmesi açısından değerlidir. Plazmalojen sentezindeki ana regülatör enzim ise yağ açıl CoA redüktaz (Far1) olup eter lipid sentezi için yağ alkolü üretimini sağlayan esansiyel regülatör enzimdir. Bu enzim hücrede plazmalojen seviyesine duyarlı olup negatif feed-back mekanizmasıyla regüle edilmektedir (158, 159). Güvelerde feromon sentezinde de görevli olan bu enzimin 24 saatlik osilasyon gösterdiği ve gen ifadesinin saat 15:00 gibi pik yaptığını gösterilmiştir (160).

Olgun eritrositler yağ asidi, kolesterol, fosfolipidler de dahil olmak üzere *de novo* lipid sentezi yapamadıklarından membran fosfolipidlerinin yenilenmesi ve onarımı, plazma eritrosit membranı ile plazma lipoproteinleri arasında lipid değişimi yoluyla gerçekleşmektedir (161, 162). Eritrosit membranı da tıpkı hücre membranı gibi asimetric fosfolipid dağılımına sahiptir. Kolin içeren fosfolipidler (fosfotidilkolin ve sfingomiyelin) büyük oranda eritrosit membranının dış yüzeyine lokalize olmuşken, fosfotidilserin, fosfotidiletanolamin gibi amin içeren fosfolipidler ve fosfotidilinozitol daha ziyade iç yüzeye yerleşmiştir. Bu asimetrinin korunmasını ise bazı özel enzimlerle sağlanmaktadır. Örneğin flipaz adı verilen enzimler fosfotidiletanolamin ve fosfotidilserinin içten dışa transferini sağlarken; flopazlar, fosfotidilkolin ve

sfingomiyelin gibi membran fosfolipidlerinin dış yüzeyden iç yüzeye transferini katalizlemektedir. Scramblase adı verilen diğer bir enzim ise membranın iç ve dış yüzeyi arasında iki yönlü fosfolipid transferini sağlamaktadır. Bu enzimlerin katalizlediği yer değiştirme reaksiyonları 37 °C'de yaklaşık 1-5 dakika gibi kısa bir zaman periyodunda gerçekleşirken, diyetle değişen lipid içeriğinin eritrosit membranına yansması ve eşitlenmesi insanda yaklaşık 30 günde tamamlanmaktadır (162). Membran üzerindeki bu fosfolipidlerin in vivo turnoverlarının ise genel olarak içerdikleri polar baş grubun yapısına, yağ asidi kompozisyonuna ve sıcaklığa bağlı olduğu rapor edilmiştir (163). Nitekim fosfotidilserin ve fosfotidiletanolamin türleri daha stabilken fosfotidilkolin daha kısa süre içinde daha yüksek değişim hızı göstermektedir (164). Diyetle değişen lipid içeriğinin eritrosit membranına yansması ve eşitlenmesi insanda yaklaşık 30 günde tamamlanırken literatürde ratlarda bu değişimin tamamlanma süresi hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle yapmış olduğumuz 14 günlük beslenme periyodu sonunda diyetle değişen lipid içeriğinin eritrosit membranına ne kadar yansıdığı hakkında net bilgiler alınamamıştır.

Araşidonik asit, DHA (sn-2) ve palmitik asit (sn-1) ağırlıklı olarak fosfolipidlerin bünyesinde yer alan yağ asitleridir (165). Çalışmamızda araşidonik asit düzeyi FF ve KK gruplarında kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Eritrosit membran fosfolipidlerdeki DHA düzeyi ise FF ve KK grubunda kontrole göre düşüş gösterirken bu düşüş KK grubunda istatistiksel olarak anlamsızdır. Palmitat düzeyleri ise genel olarak kontrole göre artış gösterirken, bu artış sadece SKB ve FF gruplarında istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca, membran fosfolipidlerindeki SAFA (doymuş yağ asitleri)/PUFA oranında artış görülmektedir. Bu durumun membran akışkanlığı gibi membranın fiziksel özelliklerinde ve buna bağlı olarak sinyal iletim mekanizmalarında önemli sonuçları olabileceği öngörülebilir. Nitekim membran akışkanlığının bozulmasının çeşitli hastalık durumları ile (örneğin obezite, kardiyovasküler hastalıklar, diabetes, yaşlanma, kanser) ilgili olabileceği bildirilmiştir (166). Eritrosit membranındaki değişimin önemli bir özelliği de hücre içi lipid sentezi olmadığı için sadece eritrositlerin sentez sürecindeki faktörlerden ve membran lipid kompozisyonundaki değişime yol açabilen eksternal faktörlerden (PLTP, fosfolipaz vs.) etkilenmesidir. Bu değişim salgısal fosfolipaz A2, lesitin kolesterol açıl transferaz ve PLPT gibi membran-HDL lipid değişimini sağlayan proteinlerin fonksiyonu sonucunda gerçekleşmektedir (148, 167-170).

Çalışmamızda SA grubunda melatonin/lipid oranları kontrole göre yüksektir. Ancak SA grubunda analiz edilen numune sayısı bazı parameterlerde 4 iken (mel/

ÇUZYA) bazılarında beştir (mel/plz). Her ne kadar aynı ratlara ait değerler oranlansa da örnek sayısının az olması net bir değerlendirme yapmayı güçleştirmektedir. Aslında; SA grubunun besin değişikliğinden bağımsız olması sirkadiyen ritim bozukluğunun değerlendirilmesinde bu grubu diğer gruplardan daha değerli kılmaktadır.

Çalışma sonuçlarını genel olarak değerlendirdiğimizde:

Eritrosit C16 plazmalojen düzeyi sadece FF'de düşerken C18 plazmalojen FF, SA ve KK'da (SKB'de de düşük ama anlamsız) düşmektedir. Peroksizomlarda metabolize edilebilen plazma fitanik asit düzeyi FF'de anlamlı olarak düşükken (yüksek peroksizomal aktivitenin göstergesi), KK grubunda anlamlı olarak yüksektir (düşük peroksizomal aktivite). Buna ilaveten C22 ve C24 yağ asidi düzeyleri KK grubunda anlamlı olmasa da diğer gruplara göre yüksek bulundu. Bu ÇUZYA'lar peroksizomlar tarafından metabolize edildiği için plazmadaki seviyelerinin artması peroksizomal aktivitede düşüklüğe işaret edebilir.

Karaciğer histopatolojisi üzerine etkileri karşılaştırıldığında KK grubunda daha belirgin olmak üzere KK, SKB ve SA gruplarında hidropik dejeneratif değişiklikler gözlenirken FF grubunda bu tür bir dejenerasyon gözlenmedi. Karaciğer dokularında katalaz immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında ise gittikçe artan düzeylerde SA<SKB<KK gruplarında kontrole göre homojen bir artış belirlendi. FF grubunda ise bu artış özellikle santral ven çevresinde çok belirgin olan heterojen bir artış bulundu.

Genel olarak sirkadiyen ritim bozukluğuna neden olan durumlarda SA ve SKB gruplarında çoğu lipid metaboliti için kontrole göre güçlü değişim görülmedi. Gruplara bakıldığında en büyük fark FF ve KK'da görüldü. Bu durum KK uygulamasının hem periferik hem de merkezi ritmi etkilemesinden ileri gelebilir.

KK grubunda yaklaşık %10 luk bir vücut ağırlığındaki azalma dikkate alındığında bu grupta açlığın sebep olduğu yağ asidi mobilizasyonuna bağlı olarak karaciğerde başlangıç safhasında karaciğer yağlanması, inflamasyon veya oksidatif strese bağlı patolojik bulgu olarak değerlendirilebilir. Bu durum daha az belirgin olmak üzere SKB ve SA gruplarında da gözlenmektedir. Nitekim katalaz immunoreaktivitesinin artmış olması da bu yönde paralel bir bulgu olarak değerlendirilebilir. Oysa FF grubunda bu tür hidropik bir değişim tespit edilemedi. Katalaz immunoreaktivitesi santral ven çevresi ile sınırlı olup daha çok peroksizomal biogenezindeki artışa bağlı olabilir. FF ve KK arasında peroksizomal aktivite açısından bir karşılaştırma yapıldığında FF grubunda peroksizomal aktivitede artış görülürken, KK grubunda peroksizomal lipid metabolizmasında azalma ve karaciğer katalaz aktivitesinde bir artış görülmektedir. Plazmalojen düzeylerinde,

ayrıca ağırlıklı olarak fosfolipidlerde yer alan doymamış yağ asitlerinden DHA ve araşidonik asit düzeylerinde azalma, doymuş yağ asiti olan palmitik asit düzeylerinde ise artış gözlemlendi. Gerek KK, SKB ve SA ve gerekse FF gruplara uygulanan şartlar sirkadiyen ritim bozukluklarına sebep olduğu bilinen durumlardır. Ritmi etkileyen bu değişimlerin, eritrosit membranına ve peroksizomlar üzerine etkilerinin farklı mekanizmalarla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu durum özellikle membran fosfolipid homeostazisini etkileyebilecek mekanizmalar ile sirkadiyen ritim bozuklukları arasındaki bağlantının önemini ortaya çıkarmaktadır. Dolayısıyla sirkadiyen ritim bozukluklarında membran fosfolipid kompozisyonunun takibi önemli bir belirteç olabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda eritrosit membranında FF grubunda C16 plazmalojen düzeyi, FF, SA ve KK gruplarında ise C18 plazmalojen düzeyleri kontrole göre düşük bulundu. Yüksek peroksizomal aktivitenin göstergesi olarak, plazma fitanik asit seviyeleri FF grubunda anlamlı bir düşüş gösterirken KK grubunda ise kontrole göre belirgin bir yükseliş göstermiştir. Buna ilaveten C22 ve C24 yağ asitleri düzeyleri KK grubunda anlamlı olmasa da diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur. Karaciğer histopatolojisi üzerine etkileri karşılaştırıldığında KK grubunda daha belirgin olmak üzere KK, SKB ve SA gruplarında hidropik dejeneratif değişiklikler gözlenirken FF grubunda bu tür bir dejenerasyon gözlenmemiştir. Karaciğer kesitlerinde katalaz immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında ise gittikçe artan düzeylerde SA<SKB<KK gruplarında kontrole göre homojen bir artış belirlendi. FF grubunda ise özellikle santral ven çevresinde çok belirgin olan heterojen bir artış gözlemlendi.

Eritrosit membranı plazmalojen düzeylerinde, fosfolipidlerde yer alan doymamış yağ asitlerinden DHA ve araşidonik asit düzeylerinde azalma, doymuş yağ asiti olan palmitik asit düzeylerinde ise artış gözlemlendi. Bu durum, FF ve diğer gruplar arasında peroksizomal etki açısından belirgin bir fark olmamasına karşın hemen hemen tüm gruplarda eritrosit membranında plazmalojen, DHA ve araşidonik asit düzeylerinde bir azalış, buna karşın palmitat düzeyinde bir artış gözlenmiştir.

Çalışmamızda yaptığımız analizler neticesinde sirkadiyen ritim bozukluklarının peroksizomal aktivasyon üzerindeki etkisinin, membran fosfolipid kompozisyonu üzerindeki etkisinden farklı bir mekanizmayla meydana geldiği söylenebilir. Bu durum membran akışkanlığı gibi membranın fiziksel özelliklerinde ve buna bağlı olarak sinyal iletim mekanizmalarında önemli sonuçları olabileceği öngörülebilir ki bu değişimlerin çeşitli hastalık durumları ile (örneğin obezite, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, yaşlanma, kanser) ilgili olabileceği bildirilmiştir. Dolayısıyla sirkadiyen ritim bozukluklarında eritrosit membran fosfolipid kompozisyonlarının analizinin, bu bozuklukların teşhis ve tedavisinde önemli bir ilave vasıta sağlayabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Alloy LB, Ng TH, Titone MK, Boland EM. Circadian rhythm dysregulation in bipolar spectrum disorders. *Curr Psychiatry Rep* 2017, 19(4): 21.
2. Gaudet AD, Fonken LK, Ayala MT, Bateman EM, Schleicher WE, Smith EJ, Dangelo HM, Maier SF, Watkins LR. Spinal cord injury in rats disrupts the circadian system. *eNeuro* 2018, 5(6):1-18.
3. Reschke L, McCarthy R, Herzog ED, Fay JC, Jungheim ES, England SK. Chronodisruption: An untimely cause of preterm birth? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018, 52: 60-7.
4. Poggiogalle E, Jamshed H, Peterson CM. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metabolism* 2018, 84: 11-27.
5. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Adv Drug Deliv Rev* 2010, 62(9-10): 967-78.
6. Ruppert E, Kilic-Huck U. Diagnosis and comorbidities of Circadian Rhythm Sleep Disorder. *Presse* 2018, 47(11-12 Pt 1): 969-76.
7. McCarthy MJ. Missing a beat: assessment of circadian rhythm abnormalities in bipolar disorder in the genomic era. *Psychiatr Genet* 2019, 29(2): 29-36.
8. Samuelsson LB, Bovbjerg DH, Roecklein KA, Hall MH. Sleep and circadian disruption and incident breast cancer risk: An evidence-based and theoretical review. *Neurosci Biobehav Rev* 2018, 84: 35-48.
9. Duncan MJ. Interacting influences of aging and Alzheimer's disease on circadian rhythms. *Eur J Neurosci* 2019, 2019:1-16.
10. Hittle BM, Gillespie GL. Identifying shift worker chronotype: implications for health. *Ind Health* 2018, 56(6): 512-23.
11. Haraguchi A, Fukuzawa M, Iwami S, Nishimura Y, Motohashi H, Tahara Y, Shibata S. Night eating model shows time-specific depression-like behavior in the forced swimming test. *Sci Rep* 2018, 8(1): 1081.
12. Castro C, Briggs W, Paschos GK, FitzGerald GA, Griffin JL. A metabolomic study of adipose tissue in mice with a disruption of the circadian system. *Mol Biosyst* 2015, 11(7): 1897-906.
13. Song C, Wang J, Kim B, Lu C, Zhang Z, Liu H, Kang H, Sun Y, Guan H, Fang Z, Li F. Insights into the role of circadian rhythms in bone metabolism: a promising intervention target? *Biomed Res Int* 2018, 2018: 1-11.

14. Pevet P, Klosen P, Felder-Schmittbuhl MP. The hormone melatonin: Animal studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2017, 31(6): 547-59.
15. Weljie AM, Meerlo P, Goel N, Sengupta A, Kayser MS, Abel T, Bimbaum MJ, Dinges DF, Sehgal A. Oxalic acid and diacylglycerol 36:3 are cross-species markers of sleep debt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112(8): 2569-74.
16. Hida A, Kitamura S, Katayose Y, Kato M, Ono H, Kadotani H, Uchiyama M, Ebisawa T, Inoue Y, Kamei Y, Okawa M, Takahashi K, Mishima K. Screening of clock gene polymorphisms demonstrates association of a PER3 polymorphism with morningness-eveningness preference and circadian rhythm sleep disorder. *Sci Rep* 2014, 4: 6309.
17. Reilly DF, Westgate EJ, FitzGerald GA. Peripheral circadian clocks in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27(8): 1694-705.
18. Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* 2006, 126(4): 801-10.
19. Duez H, Staels B. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diab Vasc Dis Res* 2008, 5(2): 82-8.
20. Langmesser S, Albrecht U. Life time-circadian clocks, mitochondria and metabolism. *Chronobiol Int* 2006, 23(1-2): 151-7.
21. Mistlberger RE. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav* 2011, 104(4): 535-45.
22. Orozco-Solis R, Sassone-Corsi P. Epigenetic control and the circadian clock: linking metabolism to neuronal responses. *Neuroscience* 2014, 264: 76-87.
23. Cermakian N, Boivin DB. A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2003, 42(3): 204-20.
24. Logan RW, McClung CA. Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nat Rev Neurosci* 2019, 20(1): 49-65.
25. Jagannath A, Taylor L, Wakaf Z, Vasudevan SR, Foster RG. The genetics of circadian rhythms, sleep and health. *Hum Mol Genet* 2017, 26(2): 128-38.
26. Bass J. Circadian topology of metabolism. *Nature* 2012, 491(7424): 348-56.
27. Maury E, Ramsey KM, Bass J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ Res* 2010, 106(3): 447-62.
28. Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci* 2018, 19(8): 453-69.

29. Takahashi JS. Molecular Architecture of the Circadian Clock in Mammals. In: Sassone-Corsi P, Christen Y (eds). *A Time for Metabolism and Hormones*, 1st ed. Cham, Springer, 2016: 13-24.
30. Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 2010, 90(3): 1063-102.
31. Fisk AS, Tam SKE, Brown LA, Vyazovskiy VV, Bannerman DM, Peirson SN. Light and Cognition: Roles for Circadian Rhythms, Sleep, and Arousal. *Front Neurol* 2018, 9: 56.
32. Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. *J Physiol Sci* 2018, 68(3): 207-19.
33. Jones JR, Simon T, Lones L, Herzog ED. SCN VIP neurons are essential for normal light-mediated resetting of the circadian system. *J Neurosci* 2018, 38(37): 7986-95.
34. LeGates TA, Fernandez DC, Hattar S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat Rev Neurosci* 2014, 15(7): 443-54.
35. Nyberg CH, Leonard WR, Tanner S, McDade T, Huanca T, Godoy RA. Diurnal cortisol rhythms and child growth: exploring the life history consequences of HPA activation among the Tsimane'. *Am J Hum Biol* 2012, 24(6): 730-8.
36. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 2011, 121(6): 2133-41.
37. Potter GD, Cade JE, Grant PJ, Hardie LJ. Nutrition and the circadian system. *Br J Nutr* 2016, 116(3): 434-42.
38. Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2007, 18(1): 4-11.
39. Sehgal A. *Molecular Biology of Circadian Rhythms*, 1st ed. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2004: 1374-8.
40. Quera Salva MA, Hartley S, Leger D, Dauvilliers YA. Non-24-Hour Sleep-Wake Rhythm Disorder in the Totally Blind: Diagnosis and Management. *Front Neurol* 2017, 8: 686.
41. Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian rhythm abnormalities. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2013, 19(1): 132-47.
42. Delezie J, Dumont S, Sandu C, Reibel S, Pevet P, Challet E. Rev-erb α in the brain is essential for circadian food entrainment. *Sci Rep* 2016, 6: 29386.

43. Temelli HG. Ratlarda Farklı Besinsel Yağların Postprandial İnflamasyon Etkilerinin Sirkadiyen Ritme Göre Karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2013.
44. Vadnie CA, McClung CA. Circadian Rhythm Disturbances in Mood Disorders: Insights into the Role of the Suprachiasmatic Nucleus. *Neural Plast* 2017, 2017: 1504507.
45. Zhan S, Wu Y, Sun P, Lin H, Zhu Y, Han X. Decrease in Circulating Fatty Acids Is Associated with Islet Dysfunction in Chronically Sleep-Restricted Rats. *Int J Mol Sci* 2016, 17(12).
46. Gooley JJ. Treatment of circadian rhythm sleep disorders with light. *Ann Acad Med Singapore* 2008, 37(8): 669-76.
47. Akıncı E. OFÖ. Sirkadiyen Ritim Uyku Bozuklukları. *Current Approaches in Psychiatry* 2016, 8(2): 178-89.
48. Özen M SM, Yılmaz A, Özen Ş. Acil Servise Başvuran Akut Koroner Sendrom Tanılı Hastaların Sosyodemografik ve Klinik Özellikleri. *Turk J Emerg Med* 2012, 12(3): 117-22.
49. Circadian Sleep Disorders Network. What are circadian rhythm sleep disorders? <https://www.circadiansleepdisorders.org/defs.php> 13 Ekim 2017
50. Froy O. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr Rev* 2010, 31(1): 1-24.
51. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 2007, 6(5): 414-21.
52. Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 2007, 28(2-3): 61-71.
53. Froy O, Miskin R. The interrelations among feeding, circadian rhythms and ageing. *Prog Neurobiol* 2007, 82(3): 142-50.
54. Adamovich Y, Aviram R, Asher G. The emerging roles of lipids in circadian control. *Biochim Biophys Acta* 2015, 1851(8): 1017-25.
55. Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 2005, 8(3): 267-9.
56. Chen R, Seo DO, Bell E, von Gall C, Lee C. Strong resetting of the mammalian clock by constant light followed by constant darkness. *J Neurosci* 2008, 28(46): 11839-47.

57. Davies SK, Ang JE, Revell VL, Holmes B, Mann A, Robertson FP, Cui N, Middleton B, Ackermann K, Kayser M, Thumser AE, Raynaud FI, Skene DJ. Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111(29): 10761-6.
58. Minami Y, Kasukawa T, Kakazu Y, Iigo M, Sugimoto M, Ikeda S, Yasui A, van der Horst GT, Soga T, Ueda HR. Measurement of internal body time by blood metabolomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(24): 9890-5.
59. Kasukawa T, Sugimoto M, Hida A, Minami Y, Mori M, Honma S, Honma K, Mishima K, Soga T, Ueda HR. Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109(37): 15036-41.
60. Sengupta A, Rhoades SD, Kim EJ, Nayak S, Grant GR, Meerlo P, Weljie M. Sleep restriction induced energy, methylation and lipogenesis metabolic switches in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2017, 93: 129-35.
61. Moller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, Lo JC, Santhi N, von Schantz M, Smith CP, Dijk DJ. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(12): 1132-41.
62. Gnocchi D, Pedrelli M, Hurt-Camejo E, Parini P. Lipids around the Clock: Focus on Circadian Rhythms and Lipid Metabolism. *Biology (Basel)* 2015, 4(1): 104-32.
63. Gooley JJ, Chua EC. Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics. *J Genet Genomics* 2014, 41(5): 231-50.
64. Asher G, Sassone-Corsi P. Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell* 2015, 161(1): 84-92.
65. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1812(5): 581-91.
66. Cermakian N, Boivin DB. The regulation of central and peripheral circadian clocks in humans. *Obes Rev* 2009, 10(2): 25-36.
67. Baez-Ruiz A, Guerrero-Vargas NN, Cazarez-Marquez F, Sabath E, Basualdo MDC, Salgado-Delgado R, Escobar C, Buijs RM. Food in synchrony with melatonin and corticosterone relieves constant light disturbed metabolism. *Journal of endocrinology* 2017, 235(3): 167-78.
68. Woodruff ER, Chun LE, Hinds LR, Spencer RL. Diurnal Corticosterone Presence and Phase Modulate Clock Gene Expression in the Male Rat Prefrontal Cortex. *Endocrinology* 2016, 157(4): 1522-34.

69. da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK, Carvalho-Sousa CE, Rocha VA, Pinato L, Fernandes PAC, Regina PM. Daily corticosterone rhythm modulates pineal function through NFkappaB-related gene transcriptional program. *Sci Rep* 2017, 7(1): 2091.
70. Feillet CA, Mendoza J, Pevet P, Challet E. Restricted feeding restores rhythmicity in the pineal gland of arrhythmic suprachiasmatic-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 2008, 28(12): 2451-8.
71. Cingi C, Emre IE, Muluk NB. Jetlag related sleep problems and their management: A review. *Travel Med Infect Dis* 2018, 24: 59-64.
72. Mukherjee S, Maitra SK. Effects of starvation, re-feeding and timing of food supply on daily rhythm features of gut melatonin in carp (*Catla catla*). *Chronobiol Int* 2015, 32(9): 1264-77.
73. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielska-Kopacz N. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormone secretion in rats under physiological conditions. *Neuro Endocrinol Lett* 2002, 23(5-6): 417-25.
74. Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab* 2014, 19(3): 380-92.
75. Joshi AS, Zhang H, Prinz WA. Organelle biogenesis in the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 2017, 19(8): 876-82.
76. Fujiki Y. Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2016, 92(10): 463-77.
77. Rosensweig C, Green CB. Periodicity, repression, and the molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 2018, 2018:1-27.
78. Cipolla CM, Lodhi IJ. Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2017, 28(4): 297-308.
79. Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. Peroxisomal beta-oxidation-a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1763(12): 1413-26.
80. Masters CJ, Crane DI. On the role of the peroxisome in ontogeny, ageing and degenerative disease. *Mech Ageing Dev* 1995, 80(2): 69-83.
81. Sassa T, Kihara A. Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther* 2014, 22(2): 83-92.

82. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, 281(6): 1333-9.
83. Maeba R, Nishimukai M, Sakasegawa S, Sugimori D, Hara H. Plasma/Serum Plasmalogens: Methods of Analysis and Clinical Significance. *Adv Clin Chem* 2015, 70: 31-94.
84. Brites P, Ferreira AS, da Silva TF, Sousa VF, Malheiro AR, Duran M, Waterham HR, Baes M, Wanders RJ. Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. *PLoS One* 2011, 6(12): 1-11.
85. Mawatari S, Katafuchi T, Miake K, Fujino T. Dietary plasmalogen increases erythrocyte membrane plasmalogen in rats. *Lipids Health Dis* 2012, 11: 161.
86. Fujino T, Yamada T, Asada T, Tsuboi Y, Wakana C, Mawatari S, Kono S. Efficacy and blood plasmalogen changes by oral administration of plasmalogen in patients with mild alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *EBioMedicine* 2017, 17: 199-205.
87. Brites P, Mooyer PA, El Mrabet L, Waterham HR, Wanders RJ. Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology. *Brain* 2009, 132(2): 482-92.
88. Lee TC. Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1394(2-3): 129-45.
89. Honsho M, Fujiki Y. Plasmalogen homeostasis - regulation of plasmalogen biosynthesis and its physiological consequence in mammals. *FEBS Lett* 2017, 591(18): 2720-9.
90. Dean JM, Lodhi IJ. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell* 2018, 9(2): 196-206.
91. Wanders RJ, Waterham HR, Ferdinandusse S. Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Front Cell Dev Biol* 2015, 3: 83.
92. Ferdinandusse S, Jimenez-Sanchez G, Koster J, Denis S, Van Roermund CW, Silva-Zolezzi I, Moser AB, Visser WF, Gulluoglu M, Durmaz O, Demirkol M, Waterham HR, Gökçay G, Wanders RJ, Valle D. A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum Mol Genet* 2015, 24(2): 361-70.
93. Johnson DW, ten Brink HJ, Schuit RC, Jakobs C. Rapid and quantitative analysis of unconjugated C(27) bile acids in plasma and blood samples by tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 2001, 42(1): 9-16.

94. Courillon F, Gerhardt MF, Myara A, Rocchiccioli F, Trivin F. The optimized use of gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography to analyse the serum bile acids of patients with metabolic cholestasis and peroxisomal disorders. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997, 35(12): 919-22.
95. Ferdinandusse S, Houten SM. Peroxisomes and bile acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1763(12): 1427-40.
96. Roca-Saavedra P, Marino-Lorenzo P, Miranda JM, Porto-Arias JJ, Lamas A, Vazquez BI, Franco CM, Cepada A. Phytanic acid consumption and human health, risks, benefits and future trends: A review. *Food Chem* 2017, 221: 237-47.
97. Herzog K, van Lenthe H, Wanders RJA, Vaz FM, Waterham HR, Ferdinandusse S. Identification and diagnostic value of phytanoyl- and pristanoyl-carnitine in plasma from patients with peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab* 2017, 121(3): 279-82.
98. Verhoeven NM, Jakobs C. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Prog Lipid Res* 2001, 40(6): 453-66.
99. Coşkun T, Yurdakök M. *Yenidoğanda Kalıtsal Bozukluklar*, 1. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2014: 118.
100. Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 2006, 75: 295-332.
101. Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, 5(3): a016709.
102. Yang X, Lamia KA, Evans RM. Nuclear receptors, metabolism, and the circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007, 72: 387-94.
103. Yang X, Downes M., Yu R. T., Bookout A. L., He W., Straume M., Mangelsdorf D. J., Evans R. M. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* 2006, 126(4): 801-10.
104. Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res* 2010, 20(2): 124-37.
105. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003, 27(3): 41-5.
106. Oishi K, Shirai H, Ishida N. CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* 2005, 386(3): 575-81.

107. Chikahisa S, Tominaga K, Kawai T, Kitaoka K, Oishi K, Ishida N, Rokutan K, Sei H. Bezafibrate, a peroxisome proliferator-activated receptors agonist, decreases body temperature and enhances electroencephalogram delta-oscillation during sleep in mice. *Endocrinology* 2008, 149(10): 5262-71.
108. Lee JM, Kim SS, Cho YS. The Role of PPAR gamma in Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinogenesis. *PPAR Res* 2012, 2012: 1-6.
109. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 2009, 7: 1-32.
110. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004, 86(11): 839-48.
111. Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Lo Sasso G, Moschetta A, Shibli U. REV-ERBalpha participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol* 2009, 7(9): 1-12.
112. Yin L, Wu N, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erbalpha: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *Nucl Recept Signal* 2010, 8: 1-16.
113. Zhang Y, Papazyan R, Damle M, Fang B, Jager J, Feng D, Peed LC, Guan D, Sun Z, Lazar MA. The hepatic circadian clock fine-tunes the lipogenic response to feeding through RORalpha/gamma. *Genes Dev* 2017, 31(12): 1202-11.
114. Kashdan TB, Young KC, McKnight PE. When is rumination an adaptive mood repair strategy? Day-to-day rhythms of life in combat veterans with and without posttraumatic stress disorder. *J Anxiety Disord* 2012, 26(7): 762-8.
115. Doane LD, Mineka S, Zinbarg RE, Craske M, Griffith JW, Adam EK. Are flatter diurnal cortisol rhythms associated with major depression and anxiety disorders in late adolescence? The role of life stress and daily negative emotion. *Dev Psychopathol* 2013, 25(3): 629-42.
116. Stokkan KA, van Oort BE, Tyler NJ, Loudon AS. Adaptations for life in the Arctic: evidence that melatonin rhythms in reindeer are not driven by a circadian oscillator but remain acutely sensitive to environmental photoperiod. *J Pineal Res* 2007, 43(3): 289-93.
117. Duran M, Wanders RJA. Plasmalogens and Polyunsaturated Fatty Acids. In: Blau NDM, Gibson KM (eds). *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, 1st ed. Berlin, Springer, 2008: 207-20.

118. Taslidere E, Dogan Z, Elbe H, Vardi N, Cetin A, Turkoz Y. Quercetin protection against ciprofloxacin induced liver damage in rats. *Biotech Histochem* 2016, 91(2): 116-21.
119. Ozbek E, Simsek A, Ozbek M, Somay A. Caloric restriction increases internal iliac artery and penil nitric oxide synthase expression in rat: comparison of aged and adult rats. *Arch Ital Urol Androl* 2013, 85(3): 113-7.
120. Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer JC, Perttunen-Nio H, Taskinen MR. Fenofibrate lowers plasma triglycerides and increases LDL particle diameter in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002, 25(3): 627-8.
121. Bellet MM, Sassone-Corsi P. Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. *J Cell Sci* 2010, 123(22): 3837-48.
122. Farr RL, Lismont C, Terlecky SR, Fransen M. Peroxisome biogenesis in mammalian cells: The impact of genes and environment. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1863(5): 1049-60.
123. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med* 2015, 87: 84-97.
124. Kodydkova J, Vavrova L, Kocik M, Zak A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol* 2014, 60(4): 153-67.
125. Arnaiz SL, Travacio M, Llesuy S, Boveris A. Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1272(3): 175-80.
126. Dai DF, Martin GM, Marcinek DJ, Basisty N, Quarles EK, Rabinovitch. PS. Mitochondrial-Targeted Catalase: Extended Longevity and the Roles in Various Disease Models. In: Reddy PH (ed). *Molecular Biology of Aging*, 1st ed. Cambridge, Academic Press, 2017: 203-41.
127. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1822(9): 1363-73.
128. Pettersen JC, Pruijboom-Brees I, Francone OL, Amacher DE, Boldt SE, Kerlin RL. The PPARalpha agonists fenofibrate and CP-778875 cause increased beta-oxidation, leading to oxidative injury in skeletal and cardiac muscle in the rat. *Toxicol Pathol* 2012, 40(3): 435-47.

129. Misra P, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and excess energy burning in hepatocarcinogenesis. *Biochimie* 2014, 98: 63-74.
130. Brocker CN, Patel DP, Velenosi TJ, Kim D, Yan T, Yue J, Li G, Krausz KW, Gonzalez FJ. Extrahepatic PPARalpha modulates fatty acid oxidation and attenuates fasting-induced hepatosteatosis in mice. *J Lipid Res* 2018, 59(11): 2140-52.
131. Ezaki J, Kominami E, Ueno T. Peroxisome degradation in mammals. *IUBMB Life* 2011, 63(11): 1001-8.
132. Yokota S, Dariush Fahimi H. Degradation of excess peroxisomes in mammalian liver cells by autophagy and other mechanisms. *Histochem Cell Biol* 2009, 131(4): 455-8.
133. Cavallini G, Donati A, Taddei M, Bergamini E. Peroxisomes proliferation and pharmacological stimulation of autophagy in rat liver: evidence to support that autophagy may remove the "older" peroxisomes. *Mol Cell Biochem* 2017, 431(1-2): 97-102.
134. Harano Y, Yasui K, Toyama T, Nakajima T, Mitsuyoshi H, Mimani M, Hirasawa T, Itoh Y, Okanoue T. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver Int* 2006, 26(5): 613-20.
135. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2016: 1-44.
136. Forcheron F, Cachefo A, Thevenon S, Pinteur C, Beylot M. Mechanisms of the triglyceride- and cholesterol-lowering effect of fenofibrate in hyperlipidemic type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2002, 51(12): 3486-91.
137. Noonan JE, Jenkins AJ, Ma JX, Keech AC, Wang JJ, Lamoureux EL. An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes. *Diabetes* 2013, 62(12): 3968-75.
138. Shepherd J. Mechanism of action of fibrates. *Postgrad Med J* 1993, 69 (1): 34-41.
139. Du ZY, Clouet P, Degrace P, Zheng WH, Froyland L, Tian LX, Liu YJ. Hypolipidaemic effects of fenofibrate and fasting in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed a high-fat diet. *Br J Nutr* 2008, 100(6): 1200-12.
140. Collet TH, Sonoyama T, Henning E, Keogh JM, Ingram B, Kelway S, Guo L, Farooqi IS. A Metabolomic Signature of Acute Caloric Restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2017, 102(12): 4486-95.

141. Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radic Biol Med* 2014, 66: 88-99.
142. Giordano CR, Terlecky SR. Peroxisomes, cell senescence, and rates of aging. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1822(9): 1358-62.
143. Mitchell SE, Delville C, Konstantopelos P, Deros D, Green CL, Chen L, Han JD, Wang Y, Promislow DE, Douglas A, Lusseau D, Speakman JR. The effects of graded levels of calorie restriction: III. Impact of short term calorie and protein restriction on mean daily body temperature and torpor use in the C57BL/6 mouse. *Oncotarget* 2015, 6(21): 18314-37.
144. He XY, Zhao XL, Gu Q, Shen JP, Hu Y, Hu RM. Calorie restriction from a young age preserves the functions of pancreatic beta cells in aging rats. *Tohoku J Exp Med* 2012, 227(4): 245-52.
145. Doğuç D.K. NY, Vural H, Kara Y. Effect of calorie restriction on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats. *Sakarya Tıp Dergisi* 2013, 3(1): 19-24.
146. Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001, 155(2): 269-81.
147. Liu R, Iqbal J, Yeang C, Wang DQ, Hussain MM, Jiang XC. Phospholipid transfer protein-deficient mice absorb less cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27(9): 2014-21.
148. Jiang XC. Phospholipid transfer protein: its impact on lipoprotein homeostasis and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2018, 59(5): 764-71.
149. Kang HW, Kanno K, Scapa EF, Cohen DE. Regulatory role for phosphatidylcholine transfer protein/StarD2 in the metabolic response to peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha). *Biochim Biophys Acta* 2010, 1801(4): 496-502.
150. Hajra AK, Burke CL, Jones CL. Subcellular localization of acyl coenzyme A: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase in rat liver peroxisomes (microbodies). *J Biol Chem* 1979, 254(21): 10896-900.
151. Acar N, Gregoire S, Andre A, Juaneda P, Joffre C, Bron AM, Creuzot-Garcher CP, Bretillon L. Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT) the first enzyme involved in their biosynthesis and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. *Exp Eye Res* 2007, 84(1): 143-51.

152. Hardeman D, van den Bosch H. Rat liver dihydroxyacetone-phosphate acyltransferase: enzyme characteristics and localization studies. *Biochim Biophys Acta* 1988, 963(1): 1-9.
153. Causeret C, Bentejac M, Clemencet MC, Bugaut M. Effects of two peroxisome proliferators (ciprofibrate and fenofibrate) on peroxisomal membrane proteins and dihydroxyacetone-phosphate acyl-transferase activity in rat liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1993, 39(1): 65-80.
154. Van Veldhoven P, Mannaerts GP. Comparison of the activities of some peroxisomal and extraperoxisomal lipid-metabolizing enzymes in liver and extrahepatic tissues of the rat. *Biochem J* 1985, 227(3): 737-41.
155. Aoun M, Corsetto PA, Nogue G, Montorfano G, Ciusani E, Cruzier D, Hogarth P, Gregory A, Hayflick S, Zorzi G, Rizzo AM, Tiranti V. Changes in Red Blood Cell membrane lipid composition: A new perspective into the pathogenesis of PKAN. *Mol Genet Metab* 2017, 121(2): 180-9.
156. Goldfine H. Cytochrome c takes on plasmalogen catabolism. *J Biol Chem* 2018, 293(22): 8710-1.
157. Jenkins CM, Yang K, Liu G, Moon SH, Dilthey BG, Gross RW. Cytochrome c is an oxidative stress-activated plasmalogenase that cleaves plasmenylcholine and plasmenylethanolamine at the sn-1 vinyl ether linkage. *J Biol Chem* 2018, 293(22): 8693-709.
158. Honsho M, Asaoku S, Fujiki Y. Posttranslational regulation of fatty acyl-CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. *J Biol Chem* 2010, 285(12): 8537-42.
159. Honsho M, Asaoku S, Fukumoto K, Fujiki Y. Topogenesis and homeostasis of fatty acyl-CoA reductase 1. *J Biol Chem* 2013, 288(48): 34588-98.
160. Lienard MA, Hagstrom AK, Lassance JM, Lofstedt C. Evolution of multicomponent pheromone signals in small ermine moths involves a single fatty-acyl reductase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(24): 10955-60.
161. Perkiner BD. Fatty acid composition of red blood cell membrane phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine in rat, rabbit human and dog. *J Fac Pharm* 2002, 31 (3): 169-82.
162. Dunham B. Transport through Red Cell Membranes. In: Surgenor DM (ed). *The Red Blood Cell*, 2nd ed. New York, Academic Press, 1975: 613-703

163. van den Boom MA, Wassink MG, Westerman J, de Fouw NJ, Roelofsen B, Op den Kamp JA, van Deenen LL. In vivo turnover of phospholipids in rabbit erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1215(3): 314-20.
164. Reed CF. Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog. *J Clin Invest* 1968, 47(4): 749-60.
165. Morandat S, Bortolato M, Anker G, Doutheau A, Lagarde M, Chauvet JP, Roux B. Plasmalogens protect unsaturated lipids against UV-induced oxidation in monolayer. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1616(2): 137-46.
166. Carta G, Murru E, Banni S, Manca C. Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications. *Front Physiol* 2017, 8: 902.
167. Kunnen S, Van Eck M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J Lipid Res* 2012, 53(9): 1783-99.
168. Yasuda T, Ishida T, Rader DJ. Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J* 2010, 74(11): 2263-70.
169. Yu JE, Han SY, Wolfson B, Zhou Q. The role of endothelial lipase in lipid metabolism, inflammation, and cancer. *Histol Histopathol* 2018, 33(1): 1-10.
170. Murakami M, Taketomi Y. Secreted phospholipase A2 and mast cells. *Allergol Int* 2015, 64(1): 4-10.

EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

13.03.1987 Beyođlu doğumluyum. 2010 yılında Ege Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Biyokimya Bölümü'nden mezun oldum ve aynı yıl İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya AD'da lisansüstü eğitimime başladım. 2011 yılından bu yana aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.



EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 13-04-2017
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2017/A-29
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar Albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 60 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 300-350 gr.

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Tayfun Güldür'ün yürütücüsü olduğu "Sirkadiyen Ritim Bozukluklarının Peroksizomal Lipid Metabolizmasına Etkisi isimli 2017/A-29 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	<i>Araştırmacı</i> Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye	 Doç. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
 Vet.Hek.Özge ÖZYALIN Üye	<i>Katılımcı</i> Akın ÖZ Sivil Üye	<i>Katılımcı</i> Dr.Mehmet DENİZ Sivil Üye