



**İNSAN UYKU BOZUKLUKLARINDA ERİTROSİT  
O-ALKİL / O-ALK-1-ENİL GLİSEROLİPİD ORANLARININ  
İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE  
KANTİTATİF ANALİZİ**

**Emine KOÇ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR**

**Yüksek Lisans Tezi -2019**

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

**İNSAN UYKU BOZUKLUKLARINDA ERİTROSİT  
O-ALKİL / O-ALK-1-ENİL GLİSEROLİPİD ORANLARININ  
İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE  
KANTİTATİF ANALİZİ**

**Emine KOÇ**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

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

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
Tarafından TYL-2017-623 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2019**


## KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Emine KOÇ'un "İnsan Uyku Bozukluklarında Eritrosit O-Alkil O-Alk-1-Enil Gliserolipid Oranlarının İnce Tabaka Kromatografisi İle Kantitatif Analizi"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

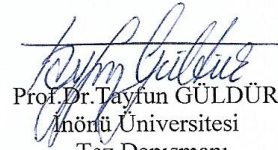
Tez Savunma Tarihi: 02/08/2019



Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
İnönü Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. İhsan HALİFEÖĞLU  
Fırat Üniversitesi  
Üye



Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR  
İnönü Üniversitesi  
Tez Danışmanı  
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 .....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Sirkadiyen Ritim .....	3
2.1.1. Sirkadiyen Ritmin Moleküler Mekanizması .....	4
2.2. Sirkadiyen Ritim ve Metabolizma .....	6
2.3. Sirkadiyen Ritim Bozukluğu.....	8
2.4. Uyku İle İlgili Genel Bilgiler .....	10
2.4.1. Sirkadiyen Ritme Bağlı Uyku Bozukluğu .....	12
2.4.2. Obstrüktif Uyku Apne Sendromu.....	15
2.5. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarında Değişim Gösteren Metabolitler .....	16
2.6. Lipidler İle İlgili Genel Bilgiler .....	18
2.7. Peroksizomal Lipidler .....	18
2.7.1. Eter Gliserofosfolipidler .....	19
2.7.1.1. Plazmalojenler .....	21
2.7.1.2. Plazmalojenlerin Biyosentezi .....	22
2.7.1.3. Plazmalojen Biyosentezinin Regülasyonu .....	24
2.7.1.4. Plazmalojenlerin Fonksiyonları .....	25
2.7.1.5. Plazmalojenleri Tespit Etmek İçin Analitik Yöntemler .....	27
3. MATERYAL METOT .....	29
3.1 Materyal .....	29
3.2. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması.....	30
3.3. Numunelerin Hazırlanışı .....	30
3.3.1. Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanışı .....	30
3.3.2. Eritrosit Lipidlerinin Ekstraksiyonu .....	31

3.3.3. Total Lipidlerin Fosfolipaz-C ile Hidrolizi .....	31
3.3.4. Açıl Gruplarının Saponifikasyonu.....	32
3.4. Standartların Hazırlanışı.....	33
3.5. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı .....	33
3.5.1. İnce Tabaka Kromatografisi Plakalarının Analize Hazırlanması.....	34
3.5.2. Numunelerin ve Standartların İnce Tabaka Kromatografi Plakasına Uygulanması.....	35
3.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi Plakalarının Yürütme İşlemi .....	36
3.5.4. Lipid Bantlarının Boyanması .....	37
3.5.5. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipid Bantlarının Fotodansitometrik Yoğunluk Analizi .....	37
3.6. Eritrosit ve Plazma Numunelerinin Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerinin İnce Tabaka Kromatografi İle Ayrımı .....	38
3.7. Standartların İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı .....	39
3.7.1 Alkil ve Alkenil Gliserolipid Standartlarının İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı.....	39
3.7.2. Alkil Gliserolipid Standartının İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı.....	40
3.7.3. Alkil Gliserolipid Standartı ve Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipid Bantlarının Rf Değerlerinin Hesaplanması .....	42
3.8. Alkil Gliserolipid Standartı ve Eritrosit Numunelerinin Alkil Gliserolipid Bantlarının Doğrulanması .....	43
3.9. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerinin İnce Tabaka Kromatografik ve Spektrofotometrik Analiz ile Doğrulanması .....	44
3.9.1. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerinin Periodat Oksidasyonu ve Asit Hidrolizi.....	44
3.9.2. Alkil Gliserolipid Standartının Periodat Oksidasyonu Sonucu Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması .....	47
3.10. İstatistiksel Analizler.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Bazı Özelliklerin Karşılaştırılması .....	49
4.2. Kontrol ve Hasta Grubu Eritrosit Alkil /Alkenil Gliserolipid Oranları .....	50
4.2.1. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipid Konsantrasyonları.....	57

5. TARTIŞMA .....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR .....	73
EKLER.....	82
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	82
EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ .....	83
EK 3. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU .....	86



## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın başlangıcından bitimine kadar her aşamasında çok değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR'e, Çalışmanın hasta grubu numunelerinin toplanmasında yardımcı olan Turgut Özal Tıp Merkezi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Hilal ERMİŞ'e, Çalışmanın istatistiksel analizlerini gerçekleştiren Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Dr. Öğretim Üyesi Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ'a, Çalışmanın Fotodansitometrik analizlerinin yapılmasında laboratuvarına kullanıma açan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a ve analizleri gerçekleştiren Muhammed DÜNDAR'a, Numune toplama aşamasında yardımcı olan Turgut Özal Tıp Merkezi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı personeli Esra BAYDUZ, Sevil CİVAN ve Yeter BEDİR'e, Çalışmanın kontrol grubu için kan vererek katkı sağlayan Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez Biyokimya Laboratuvarı personeline ve hasta grubu için kan veren tüm gönüllü katılımcılara, Kan numunelerinin alınmasında yardımcı olan Turgut Özal Tıp Merkezi kan alma birimi personeline, Çalışmanın tüm aşamalarında bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. H.Gül OTLU'ya, Arş. Gör. Dr. Fatma BUDAK ve Arş. Gör. Nilüfer BULUT'a, Laboratuvar çalışmaları sırasında bana yardımcı olan Necmettin KELEŞ, Arş. Gör. Nuray ÜREMİŞ ve Arş. Gör. Muhammed ÜREMİŞ'e, Çalışmaya maddi yönden kaynak sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje Numarası: TYL-2017-623) ve birim personeli İhsan KOCA'ya,

Ayrıca benden desteklerini esirgemeyen değerli AİLEM'e

Teşekkür ederim.

**Emine KOÇ**

## ÖZET

### **İnsan Uyku Bozukluklarında Eritrosit O-Alkil / O-Alk-1-Enil Gliserolipid Oranlarının İnce Tabaka Kromatografisi İle Kantitatif Analizi**

**Amaç:** Uyku kısıtlaması sonucu sirkadiyen ritimlerin değişim gösterdiği bunun da obezite ve diyabet gibi metabolik hastalıklarla bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur. Sirkadiyen osilasyon gösteren bazı plazma lipidlerinin (özellikle gliserofosfolipidler) uyku kısıtlaması sonucu değiştiği gösterilmiştir. Ancak uyku bozukluğuna bağlı sirkadiyen ritim değişiminin peroksizomal lipid metabolizmasını nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bu çalışma ile uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu sonucu sirkadiyen ritim değişiminin peroksizomal lipid metabolizmasına etkisini araştırmak üzere uyku bozukluğu olan ve uyku bozukluğu olmayan iki grubun eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid oranlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal Metot:** Kan örnekleri uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanısı almış 30 hasta ve uyku bozukluğu tanısı olmayan 30 sağlıklı gönüllülerden toplandı. Kontrol ve hasta grubu her bir bireye ait eritrosit numuneleri TLC ile alkil ve alkenil gliserolipidlerine ayrıldı. Fotodansitometrik olarak alkil ve alkenil gliserolipid oranları belirlendi.

**Bulgular:** Kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranları anlamlı olmamakla beraber hasta grubunda kontrole göre daha düşük bulundu. Bu düşüş hasta grubunda alkenil gliserolipid yüzdesinin artışından kaynaklanabileceği değerlendirildi.

**Sonuç:** Mevcut sonuçlar uyku apnesinden etkilenen bireylerde eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranlarının yeniden araştırılmasını gerekli olduğunu göstermektedir. Çünkü sirkadiyen kontrol altındaki lipid parametrelerindeki bireysel farklılıkların eritrositlerin peroksizomal kökenli lipidler ile uyku apnesine bağlı uyku bozuklukları arasındaki bağlantıyı örtebileceğine inanıyoruz. Bunun üstesinden gelmek için aynı bireyden uyku apnesi tedavisi öncesi ve sonrasında numune alınmasını öneriyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Sirkadiyen Ritim, Plazmalojen, Peroksizom, İnce Tabaka Kromatografisi, Uyku bozukluğu



## ABSTRACT

### Quantitative Determination Of Erythrocyte O-Alkyl / O-Alk-1-Enyl Glycerolipid Ratios In Human Sleep Disorders

#### By Thin-Layer Chromatography

**Aim:** Previous studies indicate that sleep restriction causes alterations in circadian rhythm which is associated with metabolic diseases such as obesity and diabetes. Some plasma lipids exhibiting circadian oscillation were reported to display alterations caused by sleep restriction. However it is currently not clear how sleep disorder related alterations in circadian rhythm influences peroxisomal lipid metabolism. To this end comparison of erythrocyte alkyl-/alkenyl glycerolipid ratios between subjects with and without sleep disorders were made.

**Material and Method:** Blood samples were obtained from 30 healthy and 30 subjects diagnosed as having sleep apnea associated sleep disorders. The separation of erythrocyte alkyl-/alkenyl-glycerolipids was conducted by t.l.c. Alkyl-/alkenyl-glycerolipid ratios were determined photodensitometrically.

**Results:** Comparison of alkyl-/alkenyl glycerolipid ratios in erythrocytes of healthy controls and subjects with sleep disorders yielded no statistically significant differences. However, though insignificant, the glycerolipid ratios in erythrocytes was found to be lower in sleep disorder affected subjects compared to controls. It was considered that this could be attributed to an increase in the percentage of alkenyl glycerolipids due to sleep disorders.

**Conclusion:** The current results warrants reinvestigation of erythrocyte alkyl-/alkenyl-glycerolipid ratios in subjects with sleep apnea affected subjects since we believe that individual variations in lipid parameters under circadian control could obscures the possible link between the peroxisomal lipids of erythrocytes and sleep apnea related sleep disorders. In order to overcome this we suggest that samples of the same individual before and after the treatment of apnea should be compared.

**Key Words:** Circadian rhythm, Sleep disorders, Plasmalogen, Peroxisome, Thin Layer Chromatography

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AKS</b>	: Açıl-KoA sentetaz
<b>ADHAFS</b>	: Alkil-Dihidroksiaseton Fosfat Sentaz
<b>BHT</b>	:2,6-di-terciyer-butil-4-hidroksitoluen
<b>BMAL1</b>	:Beyin ve Kas ARNT-Benzeri 1
<b>CLOCK</b>	: Sirkadiyen Lokomotor Çıkış Çevrimleri Kaput
<b>CRY1/2</b>	:Kriptokrom geni 1/2
<b>CYP7</b>	:Kolesterol 7 $\alpha$ -hidroksilaz
<b>CYP7A1</b>	:aile 7 alt aile a, polipeptit 1
<b>DHAF</b>	: Dihidroksaseton Fosfat
<b>DHAFAT</b>	: Dihidroksiaseton Fosfat Açıl Transferaz
<b>EGL</b>	:Eter Gliserofosfolipid
<b>ER</b>	:Endoplazmik Retikulum
<b>FA</b>	:Fosfatidik Asit
<b>FC</b>	:Fosfatidilkolin
<b>FE</b>	: Fosfatidiletanolamin
<b>FG</b>	:Fosfatidilgliserol
<b>FG</b>	:Gliserofosfolipid
<b>FI</b>	:Fosfatidilinositol
<b>FL</b>	:Fosfolipid
<b>FLPT</b>	: Fosfolipid Transfer Protein
<b>FS</b>	:Fosfatidilserin
<b>G3F</b>	: Gliserol-3-Fosfat
<b>GC-MS</b>	:Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
<b>HDL</b>	:Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<b>HIF</b>	:Hipoksiye Bağlı Faktör
<b>TLC</b>	:İnce Tabaka Kromatografisi

<b>LC-MS</b>	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
<b>LDL</b>	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>Lizo FC</b>	:Lizofosfotidilkolin
<b>NPAS2</b>	:Nöral PAS Domain İçeren Protein 2
<b>NREM</b>	:Hızlı Olmayan Göz Hareketi (Non rapid eye movement)
<b>PER</b>	:Periyot geni
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Co-activator
<b>PPAR<math>\alpha</math>,</b>	: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
<b>PSG</b>	: Polisomnografi
<b>PUFA</b>	:Çoklu Doymamış Yağ Asiti
<b>REM</b>	:Hızlı Göz Hareketleri (Rapid Eye Movement)
<b>ROS</b>	:Reaktif Oksijen Türleri
<b>SCD-1</b>	:Stearoil-KoA desatüraz-1
<b>SCN</b>	:Suprakiazmatik Nükleus
<b>SM</b>	:Sfingomiyelin
<b>SREBP 1a</b>	:Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1 a
<b>SREBP 1c</b>	:Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1 c
<b>TAG</b>	:Triaçilgliserol
<b>YAR1</b>	:Yağ açıl-KoA redüktaz 1
<b>YAR2</b>	:YAğ açıl-KoA redüktaz 2
<b>YAS</b>	:Yağ Asidi Sentaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2. 1. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması.....	6
Şekil 2. 2 Sirkadiyen saatin ışık ve besinlerle uyarımı.....	10
Şekil 2. 3. Memelilerde uyku ve sirkadiyen sistem döngüsü .....	12
Şekil 2. 4. Eter ve vinil eter yapısı.....	20
Şekil 2. 5. Diaçil gliserolipid ve eter gliserolipid yapısı .....	20
Şekil 2. 6. Plazmalojen biyosentez basamakları.....	23
Şekil 2. 7. Plazmalojen biyosentezinin regülasyonu. ....	25
Şekil 3. 1. TLC plağının analiz öncesi numune uygulama noktalarının belirlenmesi....	35
Şekil 3. 2. Eritrosit ve plazma numunelerinin alkil ve alkenil gliserolipidlerin TLC ayırımının karşılaştırılmasına ait ince tabaka kromatogramı.....	39
Şekil 3. 3. Alkil gliserolipid ve alkenil gliserolipidin üç şekildeki TLC kromatogramı	40
Şekil 3. 4. Alkil gliserolipid standartına ait TLC kromatogramı.....	41
Şekil 3. 5. Alkil gliserolipid standartının fotodansitometrik yoğunluk konsantrasyon eğrisi.....	42
Şekil 3. 6. Alkil gliserolipid standartı ve eritrosit numuneleri alkil gliserolipid bantlarının üst üste çakışmasına ait ince tabaka kromatogramı.....	44
Şekil 3. 7. Periodar oksidasyonu ve asit hidrolizi TLC plağı şeması .....	46
Şekil 3. 8. Alkil gliserolipid standartının periodat oksidasyonu sonucu kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4. 1. TLC ile ayrılmış olan alkil gliserolipid standartı, kontrol ve hasta gruplarına ait eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid bantlarına ait kromatogram .....	52

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2. 1.</b> Sirkadiyen ritme bağlı uyku bozuklukları .....	13
<b>Tablo 3. 1</b> Alkil gliserolipid standartı ve kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipidlerin $R_f$ değerleri .....	43
<b>Tablo 3. 2.</b> Eritrosit alkil ve alkenil gliserolipidlerin spektrofotometrik analizi.....	46
<b>Tablo 4. 1.</b> Hasta ve kontrol grubuna ait bazı özellikler .....	50
<b>Tablo 4. 2.</b> Fotodansitometrik yoğunluk analizi sonucu kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil, alkenil gliserolipid oranları .....	53
<b>Tablo 4. 3.</b> Fotodansitometrik yoğunluk analizi sonucu kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid yüzdeleri.....	54
<b>Tablo 4. 4.</b> Eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid yüzde değerleri ve oranlarının kontrole göre karşılaştırılması.....	55
<b>Tablo 4. 5.</b> Eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranlarının kontrol ve hasta gruplarında cinsiyet, sigara kullanımı ve hasta grubu ilaç kullanımına ve AHİ değerlerine göre karşılaştırılması.....	57
<b>Tablo 4. 6.</b> Eritrosit süspansiyonunda tespit edilen kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid konsantrasyonları .....	58
<b>Tablo 4. 7.</b> TLC ile ayrılan kontrol grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid spotlarına ait fotodansitometrik yoğunluk analizi bulguları .....	59
<b>Tablo 4. 8.</b> TLC ile ayrılan hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid spotlarına ait fotodansitometrik yoğunluk analizi bulguları.....	60

# 1. GİRİŞ

Organizmalar davranışlarını ve fizyolojilerini düzenleyen bir iç zamanlama sistemine sahiptir (1). İşlevsel bir zamanlama sistemi, organizmanın çevresinde meydana gelen düzenli değişiklikleri tahmin etmesini ve bu değişikliklere hazırlık yapmasını sağlar böylece bir avantaj elde eder (2). Bu sistem hemen hemen tüm hücrelerde bulunan sirkadiyen saatlerden oluşmaktadır. Memelilerde merkezi ve periferal olmak üzere iki sirkadiyen saat bulunmaktadır. Merkezi ana saat hipotalamustaki suprakiazmatik nükleusta (SCN) bulunur. Periferal saatin ise farklı periferal doku ve organlarda olduğu kabul edilmektedir. Hipotalamustaki ana saat ışık ile periferal dokulardaki saat ise besin ve diğer faktörlerle ayarlanmaktadır (3,4). Bir organ içindeki hücreler arasında ve vücudun organ sistemleri arasındaki ritimlerin koordinasyonu SCN'den gelen sinyallerle sağlanır. SCN aynı zamanda vücudun 24 saat olan ritmik aktivitesini dış ortamın 24 saatlik döngüsüne göre senkronize eder (5). Uyku-uyanıklık döngüsü, hormon salgılanması, kardiyovasküler aktivite, vücut ısısı, endokrinoloji ve lipid metabolizması gibi memeli fizyolojisinin birçok yönü sirkadiyen sistemi tarafından düzenlenmektedir (6,7).

Sirkadiyen saat ve insan yaşamı ile arasındaki ilişki son iki yüzyılda radikal olarak değişme uğramıştır. Çalışmalar genetik mutasyon veya yaşam tarzımızdaki değişiklikler nedeniyle sirkadiyen ritimlerin bozulduğunu göstermektedir (8). Özellikle modern yaşam için geleneksel hale gelen elektrik ışıklarının yaygınlaşması, geç saatte yenen yemekler, gece atıştırmaları ve denizaşırı seyahatler sirkadiyen bozulmalara neden olmaktadır. Yine gece vardiyası çalışmaları, elektromanyetik dalgalar, düzensiz beslenme ve düzensiz uyku gibi birçok çevresel faktör sirkadiyen ritimde bozulmaya neden olmaktadır. Bu tip durumlarda ya iç saatin zamanlamalarındaki düzen bozulmakta veya iç saat ile çevresel döngü arasındaki ilişki bozulmaktadır (9). Yapılan çalışmalar özellikle vardiya tipi ve gece çalışmalarının sağlığa ilişkin uzun süreli etkilere neden olabileceğini ve dolayısıyla hem birey hem de toplum açısından yüksek ekonomik ve sosyal maliyet getireceğini göstermektedir (10). Yine yaş artışı, körlük ve diğer bazı nedenlerle sirkadiyen ritim işlevlerinde aksamalar olduğu ve buna bağlı olarak uyku zamanlamasında bozukluk, uyku bölünmeleri, erken uyanma ve gün içi aşırı uyku hali gibi semptomlara neden olabilmektedir (5). Epidemiyolojik veriler uyku süresinin azalmasına paralel olarak obezite, diyabet, hipertansiyon, metabolik sendrom,

prostat kanseri (11) ve kardiyovasküler hastalık, gibi bozukluklarda artışlar olduğunu göstermektedir (12). Birçok çalışma depresyon ve bipolar bozuklukta sirkadiyen ritimlerin bozulduğunu göstermektedir. Özellikle, duygudurum bozukluklarında duygudurumla ilişkili beyin bölgelerinde moleküler ritimlerin bozulduğunu gösteren kanıtlar vardır (13).

Uyku sınırlandırması veya uyku bozukluğunun bir sonucu sirkadiyen senkronizasyondaki bozulmalar olması sebebiyle uyku sınırlandırması yapılmış rat ve insanlarda detaylı metabolik profil çalışmaları yapılmıştır. İnsanlarda akut uyku sınırlandırmalarında yapılan metabolik profil çalışmalarında 27 metabolitin önemli oranlarda artış gösterdiği ve bu 27 metabolitten 13'nün gliserofosfolipid olduğu ortaya konmuştur (14). Uyku yoksunluğuna maruz bırakılmış bireylerde yapılan başka bir çalışmada kolin plazmalojen seviyelerinin azaldığı, fosfatidilkolin (FC) ve çoklu doymamış yağ asitlerini taşıyan birkaç triaçilgliserolün (TAG) ise arttığı bildirilmiştir (15). Yapılan çalışmalar kısmi günlük uyku kaybı veya total uyku yoksunluğuna maruz kalmanın plazmada lipid konsantrasyonlarını (örneğin, fosfatidilkolin, kolesterol ve yağ asitleri) etkilediğini göstermektedir. Bu kanıtlar, uykunun lipid homeostazında modülatör bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Uyku bozukluğuna bağlı sirkadiyen ritim bozukluklarının tespitine yönelik bir belirteç bulmayı amaçlayan önceki çalışmaların detaylı metabolik profil çalışmaları Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) indüksiyonuna ve peroksizomal lipid metabolizmasındaki değişimlere işaret etmektedir (16). Ancak uyku bozukluğuna bağlı sirkadiyen ritim değişiminin peroksizomal lipid metabolizmasını nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bu çalışma ile uyku kısıtlaması ve uyku kaybı sonucu meydana gelen sirkadiyen ritim bozukluklarında değişim gösterdiği bilinen bir metabolit olan plazmalojen düzeylerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olan ve uyku bozukluğu olmayan iki grubun karşılaştırmalı olarak eritrosit O-alkil (alkil) ve O-alk-1-enil (alkenil) gliserolipid oranları İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography (TLC)) ile tespit edilerek uyku apnesine bağlı uyku bozukluklarının tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı test edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sirkadiyen Ritim

Canlıların dış dünyada tekrar eden fiziksel etkenlere karşı gösterdikleri biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal yanıtlara biyolojik ritimler denilmektedir. Biyolojik ritimlerin fonksiyonu organizmanın çevresinde meydana gelen düzenli değişiklikleri tahmin etmesini ve bu değişikliklere hazırlık yapmasını, adapte olmasını sağlar, böylece canlı bir avantaj elde eder (1). Biyolojik zamanlama sistemlerinin bir başka önemli fonksiyonu kimyasal olarak uyumsuz reaksiyonların zamansal olarak ayrılmasıdır. Bazı önemli biyokimyasal reaksiyonlar, zararlı yan ürünler üretebilir ve bu tür faaliyetlerin ihtiyaç duyulduğu bir zaman dilimi ile sınırlandırılması avantaj sağlamaktadır. Örneğin, memeli karaciğer hücrelerinde bulunan sirkadiyen osilatörler, zamanla glikojen sentezinin ve parçalanmasının farklı zamanlarda yapılarak birbirinden ayrılmasına yardımcı olabilirler (17). Biyolojik ritimler saliseler (membran iyon kanal değişiklikleri), dakikalar (enzimatik reaksiyonlar) veya saatler içerisinde değişiklik gösterirler. Günlük (gece-gündüz), haftalık, aylık (menstrual döngü), mevsimsel (ör. kış uykusu) veya daha uzun süreli pek çok ritim mevcuttur. Biyolojik ritimler periyot, faz ve büyüklük gibi belirli özelliklere sahiptirler. Periyot, ritmin tek bir döngüsü için geçen zaman dilimi iken, ritme ait başlangıç ve sonlanma gibi özellikler faz olarak tanımlanır (18). Ritmin tek bir tekrarını tamamlayabilmesi için belli bir süre gereklidir. Eğer bu süre yaklaşık olarak 24 saat ise sirkadiyen, 24 saatten kısa ise ultradian, 24 saatten uzun ise infradiyen olarak adlandırılır (17).

Sirkadiyen ritim: Canlı organizmalarda fizyolojik mekanizmalardaki günlük düzenli değişimleri kapsamaktadır. Bu ritmik değişimler organizmanın çevresindeki aydınlık karanlık değişimlerine paralel olarak meydana gelmekte olan değişimleri öngörmesine imkan sağlar. Çeşitli canlı formları bu şekilde metabolizmalarını değişen çevre şartlarına uydurarak bu faaliyetlerini günün kendileri için en uygun zamanında gerçekleştirebilir (3, 4). Sirkadiyen ritmin periyodu yaklaşık 24 saattir. Bir sirkadiyen saatin iç çalışma zaman standardı geleneksel olarak, günlük organizmalarda aktivite başlangıcı sirkadiyen sıfır zamanı (CT 0) genellikle sabah 6, gece organizmalarında aktivite başlangıcı (CT 12) gece 12 olarak kabul edilmektedir (2). Sirkadiyen saatler endojendir ve kendi kendine devam eder, bu da sürekli aydınlık sürekli karanlık gibi koşullarda devam eden ritimlere yol açar (1). Sirkadiyen osilatörler organizmanın günlük gündüz/gece, etkinlik/dinlenme döngüleri ve yiyecek bulunabilirliği gibi



değişiklikleri tahmin etmesini ve bu değişikliklere adapte olmak için metabolizmasını düzenlemesine izin verir (5). Zeitgeber (çevresel uyaranlar) bu değişiklikleri senkronize eden parametrelerdir. Işık, uyku programı, aktivite, sıcaklık, besin, çalar saat gibi sosyal sinyaller sirkadiyen saati düzenleyen zeitgeberlerdir. (18).

Memelilerde iki sirkadiyen saat bulunmaktadır. Bu saatler merkezi ve periferel saatlerdir. Merkezi saat hipotalamustaki suprakiazmatik nükleusta (SCN) bulunur (19). SCN hücrel saatleri senkronize etmek için gereken “merkezi ana saattir. Hipotalamustaki bu ana saat zeitgeber denilen ekzojen uyaranlarla uyarılmaktadır. En güçlü zeitgeber ışık olup, uykuyu getiren melatonin hormonun pineal bezden salınımını inhibe ederek, retinadaki fotoresptörleri aktive eder (20). 24 saatlik biyolojik ritimlere yardımcı olan diğer eksojen faktörler yemek öğünleri ve çalar saat alarmı gibi günlük rutinlerdir. SCN aktivitesinin düzenlenmesinde, melatonin ile beraber serotonin, Gamma Aminobütirik Asit (GABA) ve glutamat gibi nöromodülatör maddelerin görev aldığı düşünülmektedir (5).

Sirkadiyen saatler belki de en iyi karakterize edilmiş biyolojik osilatörlerdir ve bunlar neredeyse tüm ışığa duyarlı organizmalarda bulunurken bunlardan bazıları ise dış zaman işaretlerinin (zeitgeber) yokluğunda devam eden kendi kendine yeten osilatörler tarafından kontrol edilir (17). Bu saatler periferel saatler olarak adlandırılır. Memeli periferel sirkadiyen saati karaciğer, kalp, kas, akciğer (21), böbrek, gibi organlarda ve beyaz yağ dokusunda bulunur (22). Periferel doku ve organlar besinlerle uyarılabilen sirkadiyen osilatörler içerirler. Bu saat kolesterol, lipid, glukoz, amino asit metabolizması ve detoksifikasyon gibi farklı metabolik olaylardan sorumludur. Periferel saatlerden bazıları kendi periyotlarını kendileri belirleyebilseler de genelde SCN’den gelen sinyale göre çalışırlar. Ritim üretimi için merkezi pacemaker (SCN) gereklidir. Merkezi sirkadiyen saat periferel saati hormonal ve nöral sinyaller yollarla kontrol eder (4).

### **2.1.1. Sirkadiyen Ritmin Moleküler Mekanizması**

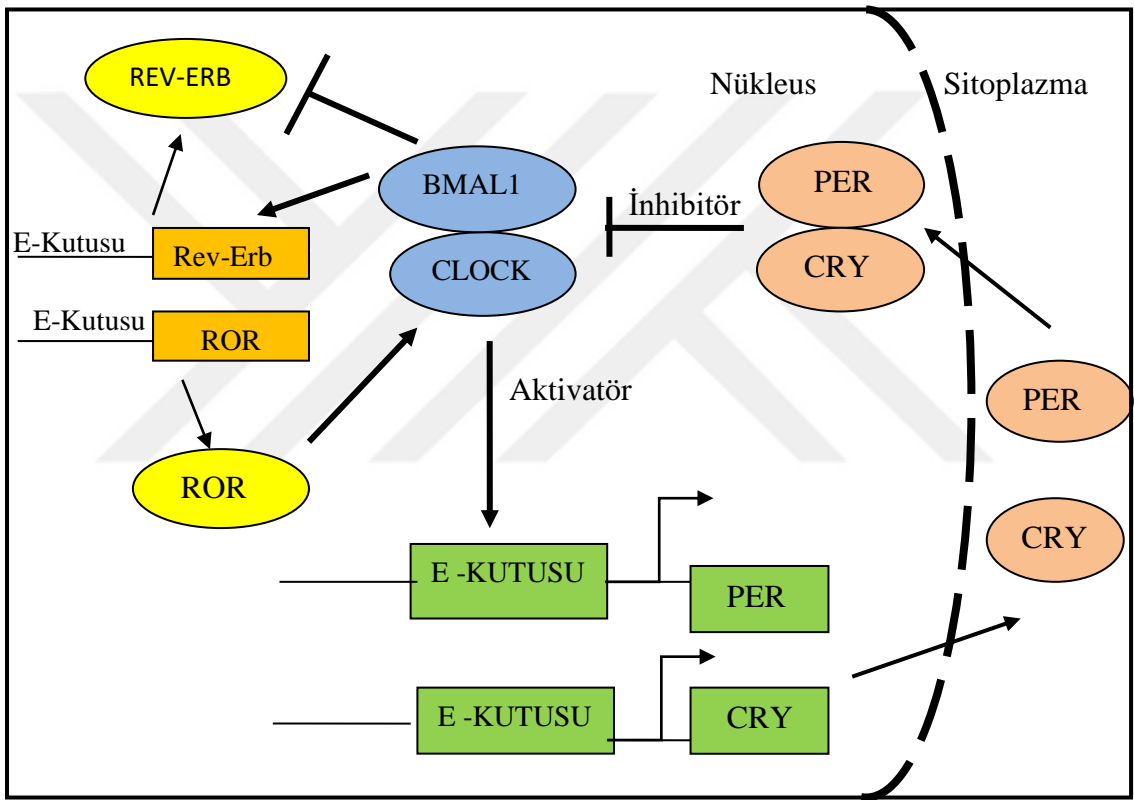
Memeli sirkadiyen saati birbirine kenetlenmiş transkripsiyon, translasyon ve postranslasyonel mekanizmaları içeren feed back (negatif) ve feed forward (pozitif) döngülerle düzenlenmektedir (19). Memelilerde sirkadiyen lokomotor çıkış çevrimleri kaput (CLOCK), Beyin ve as ARNT-Benzeri 1 (BMAL1) ve Nöral PAS Domain İçeren Protein 2 (NPAS2) transkripsiyon faktörleridir (23). Bu faktörler Periyot geni (PER, PER2 ve PER3 proteini), Kriptokrom geni (CRY1 / 2) ve üç nükleer reseptörü; nükleer

reseptör ailesi alt sınıfı grup 1, üye 1 (NR1DR1), Rev-Erb $\alpha$  ve Ror- $\alpha$  genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir (24). Bu faktörlerin lokalizasyonunu ve stabilitesini düzenleyen kinazlar (CKI $\alpha$ , CKI $\delta$  ve CKI $\epsilon$ ;) ve fosfatazlar (PP1, PP5) bulunmaktadır (2). Saat kontrollü genler CLOCK ve BMAL1 pozitif geri bildirim (aktivatör) kısmını, CRY, PER ve Rev- Erb $\alpha$  negatif geri bildirim (inhibitör) kısmını oluşturmaktadır (9). Saatin zamanı D bölgesi albümin promotörü bağlayıcı protein (DBP) ve sitokrom P450, aile 7 alt aile a, polipeptit 1 (CYP7A1) gibi saat kontrollü genler tarafından yönetilir.

Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizmasında CLOCK, BMAL1 transkripsiyon faktörü ile bir heterodimer oluşturur ve PER1 gen promotörünün E-kutusuna bağlanır, PER1 gen transkripsiyonu artırır. Translasyondan sonra PER ve CRY nükleustan sitoplazmaya geçerek heterodimerize olup CLOCK/BMAL1 tarafından indüklenmiş olan gen ekspresyonunu inhibe ederler (Şekil 2.1.) PER1 proteinleri kendi transkripsiyonunu inhibe ederek otomatik feedback (geri besleme) döngüsünün oluşturulmasını sağlar (25). Diğer döngüde BMAL1, CLOCK ile birlikte transkripsiyonel faktörler olarak hareket eder. Per ve Cry genlerinin yanı sıra CLOCK/BMAL1 kompleksi ayrıca nükleer reseptörleri olan Rev-Erb $\alpha$  ve Ror- $\alpha$ 'nın tarafından aktive edilmektedir. CLOCK/BMAL1 Rev-Erb $\alpha$  ve Ror- $\alpha$ 'nın genlerinin E-kutularında bulunan promotörlere bağlanır ve transkripsiyonu aktive eder (Şekil 2.1.). REV-ERB $\alpha$ , BMAL1 ve CLOCK genlerinin ekspresyonlarını baskılanırken ROR $\alpha$  BMAL1'in transkripsiyonunu aktive etmektedir (26)

Rev-erb $\alpha$  ve ROR $\alpha$  nükleer reseptörleri Lipid ve lipoprotein metabolizması, adipogenez ve vasküler inflamasyonda görev alırlar (6). Diğer bazı metabolik olarak aktif nükleer reseptörler ve ko-aktivatörler (PPAR $\gamma$  ve PGC1 $\alpha$ ); BMAL1 ve CLOCK'ların modülatörü olarak tanımlanmışlardır. Nükleer reseptör PPAR ve onun nükleer koregülatörü (PGC1 $\alpha$ ) birçok dokuda güçlü sirkadiyen ritim gösterirler. PPAR farklı dokularda lokalize farklı transkriptleri kodlayan üç gen, (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  ve PPAR  $\gamma/\delta$ ) içerir (27). İşlevleri ve doku dağılımı sayesinde, PPAR'lar transkripsiyonel seviyede enerji metabolizmasının birçok yönünü düzenler (28). PPAR ailesinin üç üyesi de glukoz, lipid metabolizması ve enerji homeostazisinin sağlanmasında önemli rol üstlenirler (9). PPAR $\alpha$  açlığa cevap olarak hepatik yağ asidi oksidasyonunu ve ketogenezisi başlatmaktadır. PPAR $\delta$ , karanlıkta lipojenik genlerin günlük ifadesini kontrol eder. Ayrıca, PPAR $\gamma$ , yağ asitlerinin peroksizomal beta oksidasyonu, yağ depolaması, lipogenez, adipokin üretimi ve termogenez dahil çeşitli adiposit aktivitesinin transkripsiyonel kontrolü ile tüm vücut lipid metabolizmasını ve insülin

duyarlılığını düzenler. Farelerde ve hücre kültüründe yapılan çalışmalar, adiposit farklılaşması için PPAR $\gamma$ 'ın gerekli olduğunu ortaya koymuştur (29). PPAR'ın koaktivatörü olan PGC-1 $\alpha$  ise beyin, kahverengi yağ dokusu, iskelet kası, kalp ve karaciğer gibi birçok dokuda mitokondriyal ve metabolik fonksiyonları düzenleyen birkaç nükleer genin ekspresyonunun kontrolünde merkezi bir rol oynamaktadır (22). Yine hepatik lipogenezi düzenleyen sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1 (SREBP 1a, SREBP 1c) birçok dokuda sirkadiyen ifade göstermektedir (3). Bu reseptörlerin fonksiyon bozukluğu veya düzensizliğinin, çeşitli metabolik hastalıklara yol açtığı bildirilmiştir (28).



**Şekil 2. 1.** Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması  
(25) nolu kaynaktan yararlanılarak yeniden çizilmiştir.

## 2.2. Sirkadiyen Ritim ve Metabolizma

İnsanlarda sirkadiyen ritimler ve metabolizma arasındaki etkileşimi gösteren birçok durum mevcuttur. Lipid ve karbonhidrat metabolizması (5), bazı hormonların (insülin, leptin, grelin, kortizol, melatonin, büyüme hormonu) sentez ve sekresyonu, insülin duyarlılığı, kan basıncı, pıhtılaşma faktörleri, beslenme zamanı, uyku uyanıklık döngüsü, vücut ısısı, çalışma performansı gibi memeli fizyolojisinin birçok yönü

sirkadiyen kontrol altındadır (6). Ek olarak, akut miyokard enfarktüsü ve miyokard iskemisi olayların meydana gelmesi günlük osilasyon göstermektedir ve en sık sabah 06: 00 ile 12:00 saat arasında gerçekleşirler (30).

Enerji homeostazisinin sağlanmasında önemli bir faktör olan lipid metabolizması sirkadiyen ritme sahiptir. Lipid metabolizması; besinsel lipidlerin alımı, emilimi, *de novo* yağ asidi sentezi (31), lipoprotein metabolizması, TAG döngüsü, fosfolipid (FL) metabolizması ve yağ asidi oksidasyonu gibi pek çok bileşeni sirkadiyen ritim tarafından düzenlenmektedir. Ek olarak lipid metabolizmasında rol alan hepatik sitokrom P450, hidrosimetil glutaril-KoA redüktaz, kolesterol 7 $\alpha$ -hidroksilaz (CYP7), lipolitik enzimler, apolipoprotein AIV, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü ve PPAR $\alpha$  hem insanlarda hem de kemirgenlerde günlük osilasyonlar gösterirler (32). Yine adipoz dokudan salgılanan çok sayıda hormon (leptin, adiponektin) günlük dalgalanmalar gösterir (20).

Karaciğer ve adipoz doku gibi metabolik olarak aktif olan organlar, metabolik olaylarda veya hormon sentezinde rol alan saat genleri ve genlerin ekspresyonunda bir ritim gösterir (22). Karaciğerde transkriptlerin yaklaşık %10'u diüurnal salınım yapar, bunların arasında besin taşıma ve metabolizmasında, hücrel kolesterol homeostazında, ksenobiyotik detoksifikasyonda veya enerji dengesinde rol oynayan enzimleri ve taşıyıcıları kodlayan genler gibi çok sayıda bileşen vardır. Örneğin, fosfoenolpiruvat karboksilaz, Niemann-Pick C1, HMGKoA redüktaz, glukoz taşıyıcı Glut2 ve glukagon reseptörü sirkadiyen ekspresyon sergiler (6). Bağırsak lipoprotein üretimi diüurnal varyasyon gösterir. Ayrıca, ince bağırsakta ve hepatik dokularda mikrozomal trigliserit transfer proteini (MTP) aktivitesi, protein, mRNA ve gen transkripsiyonu günlük değişimler gösterir ve gece daha yüksektir (32).

Sirkadiyen ritimler ve metabolizma arasındaki ilişki çift yönlüdür. SCN'deki ana saat, SCN dışı bölgelere sinyaller gönderir; bu da, periferik dokuların, hormonal, otonom sinir sistemi ve davranışsal yollar vasıtasıyla yakıt kullanımını ve enerji harcamasının kontrolünü düzenlemesine imkan sağlar. Ekstra SCN bölgeleri ayrıca döngüsel enerji alımını ve lokomotor aktivitesini kontrol ederek enerji homeostazisini düzenler. Besin alımı, fiziksel aktivite ve metabolik süreçlerin düzenlenmesi yoluyla, hem beyin hem de çevresel saatler, enerji alımı ile enerji harcaması arasında kesin bir denge sağlayarak uzun vadeli ağırlık stabilitesine katkıda bulunur. Pozitif bir enerji dengesi depolanan enerjiyi çoğunlukla yağ dokusuna depolar ve obeziteye neden olurken negatif bir enerji dengesi zayıflığa neden olur (31).

### 2.3. Sirkadiyen Ritim Bozukluğu

Sirkadiyen ritim bozukluğu biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal sirkadiyen ritimlerin zamanlamalarındaki düzenin bozulması ve aynı zamanda sirkadiyen ritim ile çevresel döngü arasındaki normal ilişkinin bozulmasıdır (8). Sirkadiyen bozukluk kendini ritim şiddetindeki azalma, ritim kaybı, total ritim kaybı, bazende periferal ve merkezi sirkadiyen saatler arasındaki faz farkı (faz ilerlemesi, faz gecikmesi) ile gösterir (9). Çalışmalar genetik mutasyon veya yaşam tarzımızdaki değişiklikler nedeniyle sirkadiyen ritimlerin bozulma gösterdiğini, birçok klinik etkilerinin olabileceğini göstermektedir (6). Özellikle modern yaşam için geleneksel hale gelen elektrik ışıklarının yaygınlaşması, geç saatte yenen yemekler, gece atıştırmaları ve denizaşırı seyahatler sirkadiyen bozulmalara neden olabilmektedir. Yine gece vardiyası çalışma, elektromanyetik dalgalar, düzensiz diyet gibi birçok çevresel faktör ritimleri değiştirerek biyolojik süreçleri etkileyen sirkadiyen ritim bozukluklarına yol açmaktadır (26). Sirkadiyen ritimlerin bozulması kanserin de dahil olduğu dislipidemi, obezite ve kardiyovasküler hastalık gibi birçok klinik durumun ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

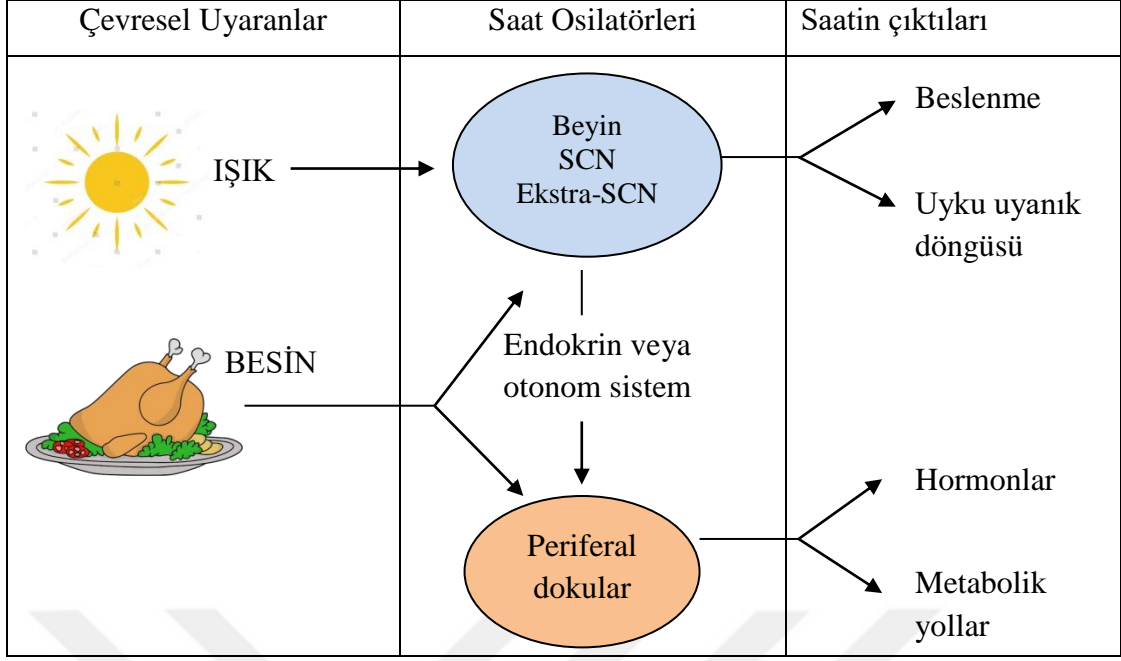
Işık ve besin, günlük yaşamı etkileyen iki baskın uyarıcıdır ve sirkadiyen saatin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (24). Işık SCN'yi uyarırken, beslenme süresi (kalori içeriği yanı sıra) hem merkezi saat sistemini hem de periferik saatleri düzenleyen sirkadiyen ritimler için güçlü bir zaman işareti olarak işlev görür. SCN, periferik dokularda yer alan saatlerin senkronizasyonunda yer almakta ve daha sonra birbirlerine uygun bir fazda salınım yapmalarını sağlamaktadır. Bu senkronizasyon, nöroendokrin yollar ve beslenme zamanları ile sağlanır (Şekil 2.2.) (31). Yiyeceklerin belirli bir zaman diliminde kısıtlanması, sirkadiyen ritimleri düzenleyen güçlü bir zaman işareti olarak işlev görür. Gece kemirgenlerinde, gıda mevcudiyetinin gün boyu kısıtlanması, gıda beklenti aktivitesinin ritmini ve periferik dokularda gen ekspresyonunu senkronize eder. (19). Bu nedenle besleme rejimlerinin değiştirilmesi ve sürekli ışığa maruz bırakılma deneysel sirkadiyen ritim çalışmalarında sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir. Deneysel çalışmalarda beslenme rejimleri; sınırlı beslenme ve kalori kısıtlaması şeklinde olurken ışıkla uyarılma ve sürekli aydınlığa veya sürekli karanlığa maruz bırakılma şeklinde yapılmaktadır.

Sınırlı besleme: Yiyecek erişilebilirliğinin süresi herhangi bir kalori kısıtlaması olmadan sınırlandırılmıştır. Yiyecekler zamanla sınırlandırıldığında ancak kaloriler kısıtlanmadığındaki bir durumda sadece periferal saatler etkilenmekte ancak merkezi sirkadiyen saat etkilenmemektedir (33).

Kalori kısıtlaması: Bu beslenme rejimi günlük alınan kalorinin miktarını %60-75 oranında azaltılır. Bu tür beslenme rejimleri kalori miktarı kısıtlandırıldığından hem periferel saati hem de merkezi saat etkilenmektedir (19). Yapılan son çalışmalar metabolik sağlıkta merkezi davranışsal ritimler ve beslenme zamanı arasında uyumun olduğunu göstermektedir (33). Kahvaltı atlamasının potansiyel karaciğer mekanizması, hepatik gen ekspresyonunun değişmiş sirkadiyen salınımına bağlı olarak anormal lipit metabolizmasını tetiklediği gösterilmiştir (34)

Işık, sirkadiyen zamanlama sistemini senkronize eden en büyük zaman işaretidir. Retina, ışığa maruz kalma sonucu retina kimyasındaki değişiklikler yoluyla çevresel ışığın günlük değişimlerini algılar. Bu mesaj, vücutta sirkadiyen ritimleri düzenlemek için retinohipotalamik sistem (RHT) vasıtasıyla SCN'ye iletilir (19). Sürekli aydınlık, SCN'deki nöronların moleküler ritimlerini senkronizasyonunu bozar. Bunun sonucunda hormonal ve vücut ısısı ritimlerini kaybeder. Ayrıca, sürekli ışık, lokomotor ritimleri etkiler, tipik olarak periyot uzunluğunu arttırır, ritim bölünmesini indükler. Geceleri sürekli ışık ve loş ışık, depresyon benzeri davranışı arttırır ve kemirgenlerde kaygı benzeri davranış üzerinde karışık etkiler yaratır (13). Akşam veya gece ışık, metabolik bozulma riskinin artmasıyla da ilişkilendirilir. Gece akut parlak ışığa maruz kalmanın, insülin direncini arttırdığı, postprandiyal insülin, glukoz ve GLP-1 seviyelerini yükselttiği bildirilmektedir (21). Geceleri sürekli ışık ve loş ışık gibi sürekli karanlık da depresyona benzer davranışı arttırır.

Melatonin sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol alan diğer önemli bir faktördür. Epifiz bezinden salgılanan bir nörohormon olan melatoninin gece sekresyonu ve parlak ışıkta bu sekresyonun baskılanması ile sirkadiyen ritim ve uyku düzenlenmektedir (35). Melatoninin uykunun başlangıcını, süresini ve kalitesini iyileştirdiği gösterilmiştir. Yaşla beraber melatonin salgısı azalır ve bunun yaşlılarda uyku bozukluğunun sık görülmesinin nedeni olabileceği düşünülmektedir (36). Melatonin uygun zamanlarda (akşam veya sabah) uygulanırsa sirkadiyen saatin fazını ilerletebilir veya geciktirebilir. Fizyolojik dozlarda ve uygun zamanlarda kullanılırsa, melatonin uykusuzluk veya sirkadiyen ritim bozukluklarından muzdarip olanlar için yardımcı olabilir (37).



**Şekil 2. 2** Sirkadiyen saatin ışık ve besinlerle uyarımı

#### 2.4. Uyku İle İlgili Genel Bilgiler

Yirmi dört saatlik uyku ritmi insanlar ve diğer birçok hayvan tarafından sergilenen en belirgin günlük ritimdir (38). Sağlıklı yetişkinlerin günlük uyku düzeni yaklaşık 16 saat günlük aktiviteyi takiben 8 saat gece dinlenme olarak kabul edilir (39). Sirkadiyen sistem, insanlarda uyku zamanlaması ve iç uyku yapısının büyük bir belirleyicisidir (5). Uyku, çoklu beyin bölgeleri ve nörotransmitter sistemleri tarafından oluşturulan; belli süreli, periyodik ve kişinin duysal uyarılarla uyandırılabilirdiği geçici bilinçsizlik durumu olarak tanımlanır (7). Uyku hızlı göz hareketleri REM (Rapid Eye Movement) ve hızlı olmayan göz hareketi NREM (Non rapid eye movement) olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Her evrenin kendine özgü nöroanatomik, nörofizyolojik ve nörofarmakolojik özellikleri vardır. REM ve NREM evreleri birbirini periyodik izleyerek siklus denilen bir döngü oluşturur. Her döngü 90 ila 110 dk arasında devam eder. Yetişkin insanda uykunun ilk üçte birinde NREM ve son üçte ikisinde REM uykusu hakimdir. NREM uykusu uykunun yüzde 75 ila 80'ini oluşturuyor. Bu evrelerin ölçümü polisomnograf denilen bir alet ile gerçekleştirilir (40).

Uyku kuvvetli bir sirkadiyen davranıştır ve SCN'nin uyku ve uyarılma beyin bölgeleri tarafından düzenlenir. Nöroanatomik çalışmalar sirkadiyen sinyal, enerji ve uykuda önemli olan hipotalamus bölgeleri arasındaki bağlantıları göstermektedir (41). Uyku ve uyanıklık, ön hipotalamusta ön ventrolateral preoptik alan (VLPO), lateral

hipotalamusta (LH) bulunan hipokretin (orexin) nöronları ve pontaki locus coeruleus (LC) gibi çoklu beyin bölgeleri tarafından düzenlenir (Şekil 2.3.). VLPO uyku sırasında aktif olan inhibitör (galaninerjik ve GABAerjik) nöronları içerir. Hipokretinler, aktif uyanma sırasında en fazla ve uyku sırasında neredeyse sessiz olan nöronlarda eksprese edilen nöropeptitlerdir. Bu nöronların aktivasyonu uyanıklığı artırır (25).

İnsan uykusunun zamanlaması, süresi ve devamlılığı, büyük ölçüde iki uyku düzenleyici sistemin etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Bunlar homeostatik ve sirkadiyen mekanizmalardır. Gün içinde sirkadiyen sistem, gündüzleri aktif olarak uyanıklığa teşvik ederken geceleri pineal bezden melatonin sekresyonu uykuya teşvik eder (38). Bu iki mekanizma uyumlu işlediğinde, yetişkinlerde gün boyunca uzun, devamlı bir uyanıklık ve gece uzun ve devamlı bir uyku bölümü elde etmelerini sağlar. Bu iki mekanizmadaki değişiklikler veya iki mekanizma etkileştiğindeki değişiklik, istenen zamanda uykuya dalmama, uykuda kalma zorluğu veya uyanık kalma zorluğu ile sonuçlanabilir (5). Tipik bir yetişkinin gece boyunca uyku süresi yaklaşık 7 ila 8 saattir. Ancak bu süre kişiden kişiye farklılık gösterebilir daha az uyuyup iyi çalışabilen bazı insanlar vardır (kısa uyuyanlar), bazıları ise daha fazla uyuyup az çalışanlar (uzun uyuyanlar) olarak adlandırılır (42).

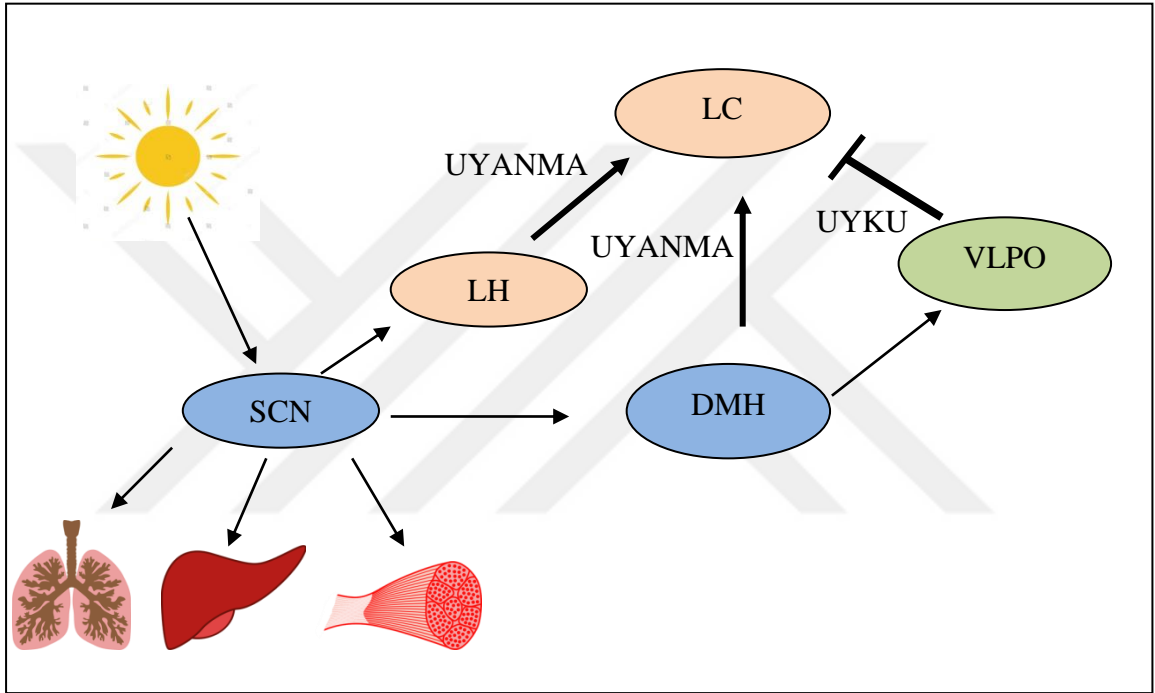
Epidemiyolojik çalışmalar uyku şikayetlerinin genel popülasyonda çok yaygın olduğunu göstermiştir. Ulusal Uyku Bozuklukları Araştırma Merkezi raporuna göre; Amerika Birleşik Devletleri'nde 40 milyondan fazla insanın kronik uyku ve uyanıklık rahatsızlıklarından şikayetçi oldukları bildirilmiştir. Nüfusun yaklaşık yüzde 35'i uykuya dalmakta, uykuyu sürdürmekte, sabahın erken saatlerinde uyanmakta veya restoratif olmayan uykuyu yaşamakta zorlanmaktadır (7).

İstenilen zamanlarda uyumak ya da uyanık kalmak ile ilgili sorunlardan oluşan, genellikle aşırı uyku veya uykusuzluk durumu görülen bozukluklar uyku bozukluğu olarak adlandırılmaktadır. Uluslararası Uyku Bozuklukları Sınıflandırması (ICSD) uyku bozukluklarını 7 başlık altında sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmaya göre uyku bozuklukları; uykusuzluk bozuklukları, uykuyla ilişkili solunum bozuklukları, santral hipersomnolan bozuklukları, sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık bozuklukları, parasomniler, uykuyla ilişkili hareket bozuklukları ve diğer uyku bozukluklarıdır.

Uyku şikayetlerinin değerlendirilmesi uyku anamnezi ve fiziki muayene ile başlamaktadır. Uyku fizyolojisi ve bozukluklarının tanısında ise uyku apnesi testi olan polisomnografi (PSG) kullanılmaktadır. (43). PSG hastaların bir gece boyunca uyku laboratuvarında tutulması ile yapılmaktadır. Test sırasında vücudun çeşitli noktalarına



bağlanan kablolarla alınan sinyaller odanın dışındaki bilgisayar ortamına aktarılmaktadır. Ölçüm yapılırken beynin elektriksel aktivitesi (EEG), kalbin elektriksel aktivitesi (EKG), solunum sayısı, vücut ısısı, kan oksijen düzeyleri ve göz hareketleri gibi fizyolojik değişiklikler kayıt altına alınır (40). PSG ile uyku evreleri, uyku kalitesi ve uyku ile birlikte olan bozukluklar tespit edilebilir. Özellikle Obstrüktif Uyku Apnea (Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu) tanısında PSG sonuçları kullanılmaktadır. Gün boyu uyanıklık ve uykusuzluğun değerlendirilmesi için ise Stanford uykusuzluk skalası ve Epworth uykusuzluk skalası kullanılmaktadır (42).



**Şekil 2. 3.** Memelilerde uyku ve sirkadiyen sistem döngüsü

SCN, uyarıları LH' ye ve DMH' ye yansıtır. DMH gelen uyarıyı LC veya VLPO'ya aktararak geniş bir uyku ve uyanma merkezi sunmaktadır. Kısaltmalar: SCN: suprakiazmatik nukleus; DMH: dorsomedial hipotalamus; LH: lateral hipotalamus; LC: locus coeruleus; VLPO: ventrolateral preoptik bölge. (25) numaralı kaynaktan yararlanılarak yeniden çizilmiştir.

#### 2.4.1. Sirkadiyen Ritme Bağlı Uyku Bozukluğu

Sirkadiyen ritim uyku bozuklukları, istenilen zamanlarda uyumak ya da uyanık kalmak ile ilgili sorunlardan oluşan, genellikle aşırı uyku veya uykusuzluk durumunun görüldüğü bozukluklardır (8). Sirkadiyen ritim bozukluklarına bağlı uyku bozukluklarının temel nedeni, biyolojik zamanlamadaki değişiklikler veya sirkadiyen zamanlama sistemi ile 24 saatlik dış çevre arasındaki uyumsuzluktur. Sirkadiyen ritim uyku bozukluğu: uyku-uyanıklık ritminin devamlı veya tekrarlayıcı tarzda bozulması fonksiyonel kayıplar ile sonuçlanır (18). Fonksiyonel kayıplar sosyal, mesleki,

akademik ya da diğerk önemli alanlarda performans azalması olarak kendini gösterir (44). Ayrıca uyku bozukluğu ruhsal ve fiziksel açıdan olumsuz etkilenmelere neden olur (37).

Uluslararası Uyku Bozuklukları Sınıflaması, uyku ve uyanıklığın zamanlaması ile ilgili sirkadiyen ritme bağlı uyku bozukluklarını 6 grupta sınıflandırır (Tablo 2.1.). Tüm sirkadiyen ritme bağlı uyku bozukluklarının birincil klinik özelliği, uykuya dalma, uykuda kalma veya istenen zamanda uyanamama bir yetersizliktir (5). Sirkadiyen ritim uyku bozuklukları içinde en sık görülen gecikmiş uyku fazı bozukluğudur ve bozukluğu olan kişiler uykuya dalma ve uyanma sürelerinin sürekli bir şekilde normalden fazla sürmesi şeklindedir (45). Jet-lag tipi bozuklukta birden çok zaman dilimi geçirilerek seyahat edildiğinde ortaya çıkan, içinde bulunulan zamana göre günün uygunsuz saatlerinde uykulu ya da uyanık olma durumudur. Bu durum, zaman dilimlerinde hızlı yolculuktan kaynaklanan iç biyolojik zaman ile dış zaman arasındaki ani uyumsuzluğa neden olur. Vardiyalı çalışma tipi bozuklukta ise gece mesaisi ya da mesai saatlerinin sık değişmesiyle birlikte asıl uyku döneminde kişinin uykusuz ya da asıl uyanıklık döneminde uykulu olması durumudur (11).

**Tablo 2. 1.** Sirkadiyen ritme bağlı uyku bozuklukları

<b>Sirkadiyen Ritme Bağlı Uyku Bozuklukları</b>
Gecikmiş uyku-uyanıklık faz bozukluğu,
İleri uyku-uyanıklık faz bozukluğu,
Düzensiz uyku-uyanıklık ritim bozukluğu,
24 saat olmayan uyku- uyanıklık ritim bozukluğu,
Jet lag
Vardiyalı çalışma bozukluğu

Uyku ve sirkadiyen ritim bozukluğu nöropsikiyatrik hastalıklar ve gözdeki ciddi bozukluklar dahil zamanımızın en zorlayıcı hastalıklarının ortak özelliğidir. Günümüzde sağlık, gıda üretimi, güvenlik, savunma, yayıncılık ve ulaşım gibi birçok kesim verimliliklerini ve hizmetlerini artırmak için vardiya çalışması yaparlar. Bu şekilde çalışan kişilerde uyku-uyanıklık döngüsü bozulmakta ve beraberinde pek çok ruhsal ve fiziksel problem ortaya çıkmaktadır (10).

Sirkadiyen ritme bağlı uyku bozukluğu uygunsuz bir zamanda uykulu hissetmekten çok daha fazla etkiye sahiptir. Anormal metabolizma, kardiyovasküler hastalıklar, artan

beden kitle indeksi ve metabolik sendrom ile ilişkilidir. Uyku ve sirkadiyen ritim bozukluğu ayrıca, zayıf dikkat ve hafıza, azalmış zihinsel ve fiziksel reaksiyon süreleri, azalmış motivasyon, depresyon, uykusuzluk, obezite, bağışıklık sistemi bozukluğu olmak üzere birbirine bağlı patolojilerle ilişkilidir (38, 46). Çok sayıda rapor vardiya işçilerinin diyabet, obezite ve kardiyovasküler insidansı daha yüksek olduğunu göstermektedir (15). İnsanda yapılan çalışmalarda, sirkadiyen bozukluk glukoz, insülin ve trigliserit seviyelerini yükselttiği ve enerji tüketimini azalttığı gözlenmiştir (21).

Uyku kaybı aynı zamanda insülin direnci belirteçlerinde artışı içeren metabolizma üzerinde derin etkilere sahiptir (25). İnsanlarda insülin sekresyonunda ve glukozda günlük döngüler tip 2 diyabetli hastalarda kaybolmuştur. Kısa uyku süreleri sempatik sinir sistemi aktivitesini artırarak insülin direncine yol açar, akşam kortizol seviyeleri yükseltir ve zamanla  $\beta$ -hücrelerini tehlikeye atarak beyin glukoz kullanımını azaltır ve diyabete yol açar. Benzer şekilde, tip 1 diyabetik hastalar sağlıklı deneklere göre daha erken ve gece kalıcı lipoliz gösterirler (6). Çalışmalar, uyku yoksunluğunda leptinin (tokluk hormonu) azaldığını grelinin (açlık hormonu) arttığını bunun sonucunda da insülin duyarlılığının tehlikeye girdiğini göstermektedir (12). Ayrıca, metabolik sendrom (yüksek TAG, düşük yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol HDL-C seviyeleri) vardiyalı çalışma ve gece yeme koşullarında daha sık görülür (6).

Yetersiz uykunun aynı zamanda sirkadiyen ekspresyon gösteren genlerin sayısını azalttığı bildirilmiştir. Yetersiz uyku durumunda CLOCK, PER ve CRY2 gibi birçok sirkadiyen genin etkilendiği rapor edilmiştir (47). İnsanların belirli bir uykuya doğru eğilimleri vardır. Kronotip, uyku-uyanıklık zamanlarının bireysel varyasyonları olarak tanımlanır ve büyük ölçüde ışık, çevresel ve genetik faktörlerden etkilenir. Bir kişinin kronotipi onun 24 saatlik zaman diliminde hangi vakitlerde uyumaya meyilli olduğunu ifade eder (11). İnsanlarda iki kronotip (sabahçıl ve akşamcıl kronotipi) mevcuttur (46). Akşamcıl kronotipte çalışanlar geç kalkmayı ve geç yatmayı tercih ederler bu da sirkadiyen sistemlerinde faz gecikmesine neden olmaktadır. Uyku süresinden bağımsız olarak akşamcıl kronotipte olanlar, artmış kalp hızı, yüksek tansiyon, yüksek stres hormonları, uyku apnesi, düşük HDL seviyeleri ve tip 2 diyabet ile ilişkilendirilmiştir (11). Sabahcıl kronotipte olanlar ise daha erken uyanır ve daha erken uyurlar. Yakın zamanda yapılan birçok çalışma, sirkadiyen genlere yakın genetik lokuslar ile kronotip arasındaki ilişkileri tanımlamıştır. Ek olarak, PER2'deki mutasyonlar ileri uyku fazı sendromu ile CRY1'deki mutasyonlar gecikmiş uyku fazı sendromu ile ilişkilendirilmiş,

Dolayısıyla, bu çalışmalar kronotipler ile sirkadiyen gen rahatsızlıkları arasında bağlantıların tanımlanabileceğini göstermektedir (13).

#### **2.4.2. Obstrüktif Uyku Apne Sendromu**

Obstrüktif Uyku Apne Sendromu (Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu) kronik aralıklı hipoksi ve üst solunum yolunun tekrarlayan çöküşü nedeniyle uykudan sık uyanma durumudur. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu, artmış oksidatif stres, inflamasyon ve üst solunum yolunun tekrarlayan tam (apne) veya kısmi (hipopne) ile karakterizedir (48). Uyku sırasında solunum yollarının tamamen tıkanması, beynin uyarılmasına, sempatik aktivasyona ve kanda oksijen desatürasyonuna neden olur. Uyku sırasında tekrarlanan üst solunum yolu tıkanıklığı parçalanmış ve restoratif olmayan uykuya neden olur (49) Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olanlar yorgunluktan, gün içi aşırı uyku, gece uykusuzluk veya sabah baş ağrılarında şikayetçi olabilirler. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanısı için apne hipopne indeksi (AHİ) kullanılmaktadır. AHİ uyku saati başına solunum durması ortalama sayısıdır. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanısında hastalar AHİ değerlerine göre basit horlama (<5), hafif, (5-15), orta (16-30) ve ağır (>30) uyku bozukluğu olarak sınıflandırılır (40). AHİ> 5 uyku bozukluğu olarak tanımlanır (50).

Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu oldukça yaygın bir hastalıktır. İnme, hipertansiyon, diabetes mellitus ve koroner arter hastalığı uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu ile ilişkilidir. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu kadınlara göre erkeklerde daha sık görülür ve yaş ve obezite ile artar. Sigara ve alkol tüketimi ayrıca risk faktörleri arasındadır (51). Genel popülasyondaki yetişkin erkeklerin en az %50'si bir dereceye kadar uyku sırasında solunum bozukluğu görülmektedir. Ayrıca, hastalık özellikle orta yaşlı ve yaşlı erkeklerin %79'unda yaygındır (50). Kanıtlar Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu doğrudan yüksek kardiyovasküler mortalite ve morbidite ile ilişkili olduğunu göstermektedir (52).

Endojen sirkadiyen sistemi, solunum olaylarının gece boyunca uzamasında önemli bir rol oynar ve uyku apnesinin modüle edilmesini sağlar. Her uyku için olay süreleri olan oksijen desatürasyonu ve AHİ'nin sirkadiyen osilasyon gösterdiği bildirilmiştir (53). Çalışmalar sirkadiyen sistemin apne-hipopne başlatma ve sonlandırma mekanizmalarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğunun sirkadiyen saatin işlevinde bozukluğa yol açtığı bildirilmiştir. Sabahın erken saatlerine karşılık gelen sirkadiyen bir fazda, apne ve hipopne süreleri en uzun ve

AHİ düşük, buna karşılık öğleden sonra ve akşamın erken saatlerine karşılık gelen sirkadiyen evrelerinde, olay süreleri en kısa ve AHİ yüksek bulunmuştur (53).

Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğunun bir özelliği olan aralıklı hipoksinin sirkadiyen saatin işlevinde bozukluğa yol açtığı bildirilmiştir. Hipoksiye bağlı faktörler (HIF1A, HIF1B, HIF3B, HIF2 / ARNT) düşük oksijenli süreçte kritik düzenleyicilerdir. BMAL1'in HIF1A ve HIF2A'yı doğrudan bağlandığı, ek olarak bu CLOCK/hipoksi kompleksinin DNA ile etkileşime girdiği ve bu heterodimerlerin hücrel hipoksiye cevap verebileceği gösterilmiştir. Fare dokusundaki oksijen seviyelerinin günlük osilasyon gösterilmiştir. Ayrıca, oksijen seviyelerinin bu ritmik döngüleri, hücrel saatleri HIF1A'ya bağımlı bir şekilde senkronize edebilir. Daha da önemlisi, düşük oksijen seviyelerine daha az maruz kalması için sirkadiyen saati sıfırlayabilir (54). Yine hipoksi miyokard enfarktüsü, kardiyovasküler dokularda hipoksiye bağlı transkripsiyon faktörlerinde değişikliklere neden olur.

Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu artan TAG seviyeleri ile bağlantılıdır. Hipoksi, kahverengi yağ dokusu ve beyaz yağ dokusunda lipoprotein lipaz aktivitesini azaltır. Ek olarak, hipoksi, lipoprotein lipaz, PPAR- $\gamma$  ve yağ asidi taşıyıcı CD36'nın transkripsiyonunu azalttığı gösterilmiştir. Akut hipoksinin hepatik TAG sekresyonunu arttırmadığı doku alımını azalttığı için plazma TAG'lerin arttığı bildirilmiştir (55). Ayrıca hipoksi, zayıf farelerde hiperlipidemiye neden olmaktadır. Bu aralıklı hipoksinin transkripsiyon faktörü SREBP-1'in aktivasyonu ve TAG ve FL biyosentezinden sorumlu stearoil-KoA desaturaz-1 (SCD-1) enziminin aktive edilmesinden kaynaklanmaktadır. Buna karşılık, kolesterol biyosentezinde rol alan anahtar genler, SREBP-2 ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA (HMG-KoA) redüktaz, aralıklı hipoksiden etkilenmemektedirler (52).

## **2.5. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarında Değişim Gösteren Metabolitler**

İnsanlarda küçük molekül ağırlıklı metabolitlerin yaklaşık %15'inin sirkadiyen değişiklikler gösterdiği ve bunların arasında %75'ten fazlasının çoğunlukla yağ asitleri olduğu gösterilmiştir (22). Sağlıklı 20 insanın plazmasında yapılan lipidomiks çalışmasında; lipidlerin %13'nün sirkadiyen osilasyon gösterdiği sirkadiyen osilasyon sergileyen lipidlerin çoğunun TAG ve digliseritler olduğu bildirilmiştir. TAG sabah en yüksek iken FC'ler akşamları en yüksek düzeylere ulaşmıştır. LDL kolesterol ise sirkadiyen ritim göstermemiştir (56). İnsan iskelet kası ve in vitro kültürlenmiş primer insan myotübüllerinde lipid profillerinin araştırıldığı çalışmada gliserolipidler,

gliserofosfolipitler ve sfingolipitler, günlük osilasyon gösterdiği bildirilmiştir (57). Çevresel olarak kontrol edilen bir uyku laboratuvarında yaklaşık 2 hafta boyunca kalmış bireylerde zayıf osilasyon ve değişkenlik gösterse de osilasyon gösteren metabolitler bulunmuştur. Bu metabolitler bir gliserofosfolipid (FG, 18: 1) ve bir lizofosfolipid (Lizo FC 16: 0) olarak bulunmuştur (58). Sağlıklı köpeklerde günlük serum lipidlerin (esterleşmemiş yağ asitleri, TAG, FL, total kolesterol ve total lipitler) varyasyonlarını, özellikle de ışık ve açlık döngüleri ile olan geçici ilişkilerine bağlı olarak incelendiği çalışmada; köpeklerin besin kısıtlaması sonucu total lipitlerin, total kolesterolün, FL'lerin ve TAG'ların ritimleri ortadan kalktığı gözlenmiştir. Işığa maruz kaldıklarında ise TAG ritiminin değiştiği bildirilmiştir (59).

Uyku yoksunluğuna maruz kalmanın plazma lipidlerinde yaygın değişikliklere yol açabilmektedir (15). Uyku sınırlandırması veya uyku bozukluğunun bir sonucu sirkadiyen senkronizasyondaki bozulmalar olması sebebiyle uyku sınırlandırması 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 birikimi, uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonunda azalma, buna ilaveten bazı fosfolipidlerin sentezi ve oksidasyonu ile bağlantılı metabolitlerdeki artış araştırmacılar tarafından PPAR yoluyla peroksizomal aktiviteye işaret ettiği şeklinde yorumlanmıştır (16). Yine insanlarda akut uyku sınırlandırmalarında yapılan metabolik profil çalışmalarında 27 metabolitin önemli oranlarda artış gösterdiği ve bu 27 metabolitten 13'nün gliserofosfolipid olduğu ortaya konmuştur (14). Uyku yoksunluğuna maruz bırakılmış bireylerde yapılan başka bir çalışmada kolin plazmalojen seviyeleri azalırken, FC ve çoklu doymamış yağ asitlerini taşıyan birkaç TAG artmıştır (15). Uyku kısıtlamasının erişkinlerin plazma metabolomu üzerindeki etkilerini incelendiği çalışmada uyku kısıtlandığında 12 amino asitin bağıl konsantrasyonları ve birkaç yağ asidi, safra asidi, steroid hormonu ve trikarboksilik asit döngüsündeki ara maddelerin artış gösterdiği buna karşılık dolaşımdaki glukoz seviyeleri, bazı monosakkaritler, glukonat ve beş karbonlu şeker alkolleri, uyku azaldığında azalma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (60). Yetersiz uyku sonucu yapılan transkriptom analizi 711 genin yetersiz uyku ile regülasyonun arttığı veya azaldığı bildirilmiştir. Yetersiz uykunun sirkadiyen ritim gösteren gen sayısını azalttığı gösterilmiştir (47).

## 2.6. Lipidler İle İlgili Genel Bilgiler

Lipidler, hücre zarının bileşenlerinin aktivasyonu, enerji kaynağı, otokrin ve parakrin sinyal yollarına katılma ve otofaji gibi temel biyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Bu fonksiyon çeşitliliği, lipidlerin molekül yapılarındaki muazzam değişkenlik ve biyosentezlerinin gerçekleşmesi için farklı biyokimyasal dönüşümlerden kaynaklanmaktadır (61). Günümüzde, lipidlerin hücre zarlarının kalınlık, rijitlik, yanal faz ayrılması ve füzyon eğilimi gibi biyofiziksel özellikleri etkilediği bilinmektedir. Hücre zarlarındaki bu işleyiş membranla ilişkili proteinleri modüle eder. Herhangi bir biyofiziksel özelliğin modüle edilmesinde farklı bir lipid tipinin etkisi nispi konsantrasyonuna bağlıdır. Dolayısıyla lipid tiplerinin birinin konsantrasyonundaki eksiklik veya değişiklikler hücresel düzeyde önemli değişiklikler meydana getirebilir (62). Lipidler, yapısındaki ketoaçil ve izopren gruplarına göre sekiz kategoride sınıflandırılır. Bunlar yağ asitleri, gliserolipidler, FL, sfingolipidler, sakkarolipidler, polipidler (ketoaçil alt birimlerinin yoğunlaşmasından elde edilen), steroller (kolesterol), ve prenolik lipidler (izopren alt birimlerinin yoğunlaşmasından elde edilen)'dir (61). Lipidler arasında, membran yapısında önemli rollere sahip olanlar, FL, sfingolipidler, steroller ve trigliseritlerdir. Ökaryotik hücre membranında bulunan ana lipidler ise FL'ler, steroller ve sfingolipidlerdir (63). Özellikle FL'ler, hücreleri oluşturan yapısal ve biyolojik olarak önemli moleküllerdir. FL'ler; homeostaz, hücre yapışması, göç, nörotransmisyon, sinyal iletimi, vezikül trafiği, apoptoz ve translasyon sonrası modifikasyon gibi çeşitli hücresel fonksiyonların düzenleyicileri olarak işlev görürler (61). Ayrıca FL'ler, membranlarda hücre içi veya hücre yüzeyinde kanallar ile zar proteinlerinin, reseptörlerin, enzimlerin ve iyonların davranışında rol oynarlar. FL ana sınıfları şunları içerir: fosfatidik asit (FA), fosfatidilgliserol (FG), fosfatidilinositol (FI), kardiyolipin, fosfatidilkolin (FC), fosfatidiletanolamin (FE) ve fosfatidilserin (FS) (64). FL'lerin diğer bir alt sınıfı uzun zincirli bir alkil veya alk-1-enil grubu içeren eter gliserolipidlerdir (65).

## 2.7. Peroksizomal Lipidler

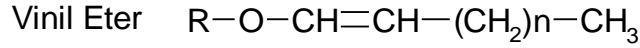
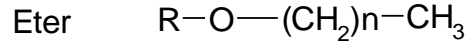
Peroksizomlar eritrosit hariç bütün hayvan hücrelerinde bulunan tek zarla çevrili organellerdir (66). Peroksizomlar, redoks homeostazı ve diğer metabolik fonksiyonlar için ökaryotlarda oldukça önemlidir (67). Çoğu ökaryotik hücrede peroksizomlar yağ asitlerinin oksidasyona uğratıldığı ve böylece önemli biyosentetik yollar için öncü moleküllerin üretildiği temel yapılardır. Memeli peroksizomları, özellikle çok uzun

zincirli ve dallanmış yağ asitlerinin yıkımında rol oynar. Memeli hücrelerinde peroksizomların metabolik fonksiyonları arasında; reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması, çok uzun zincirli yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu, uzun zincirli yağ asitlerinin  $\alpha$ -oksidasyonu, safra asitlerinin sentezi ve eter gliserofosfolipid biyosentezi bulunur (68). Yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyon ayrıca mitokondride meydana gelir, ancak;  $\alpha$ -oksidasyon ve eter gliserofosfolipid biyosentezi kısmen peroksizomlara özgüdür ve metabolik homeostaz için önemlidir (29). Peroksizomlardaki yol eter gliserofosfolipidlerin sentezi için zorunlu, diaçil fosfolipidlerin sentezi için ise alternatif bir yoldur (69). Peroksizomlar amino asit ve yağ asitleri gibi çeşitli substratları okside etmek için moleküler oksijeni kullanan enzimler (oksidazlar) içerirler (66). Peroksizomlarda bulunduğu bilinen enzimlerdeki eksiklikler çoğunlukla lipid metabolizmasını etkileyen çoklu biyokimyasal anormalliklere neden olur. Karakteristik olarak, çok uzun zincirli yağ asitlerinin peroksizomal  $\beta$ -oksidasyonunun yetersiz olması ve plazmalojen seviyelerinde bir azalma olması, alkil-dihidroksiaseton fosfat sentaz (ADHAFS) ve dihidroksiaseton fosfat açil transferaz (DHAFAT) enzimlerindeki kusurlar nedeniyle meydana geldiği bildirilmiştir (69). Yine Alzheimer, Down sendromu ve Zellweger sendromu gibi birçok hücrel fonksiyon ve hastalık peroksizom metabolizmasıyla ilişkilidir (65). Mevcut kanıtlar, peroksizomların oksidatif strese bağlı sinyal yollarının potansiyel düzenleyicileri olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Bu bulgular, peroksizom disfonksiyonunun sadece peroksizomal bozukluklarla değil, aynı zamanda oksidatif stresle ilişkili yaşa bağlı hastalıklarla da ilişkili olduğunu göstermektedir (70).

### **2.7.1. Eter Gliserofosfolipidler**

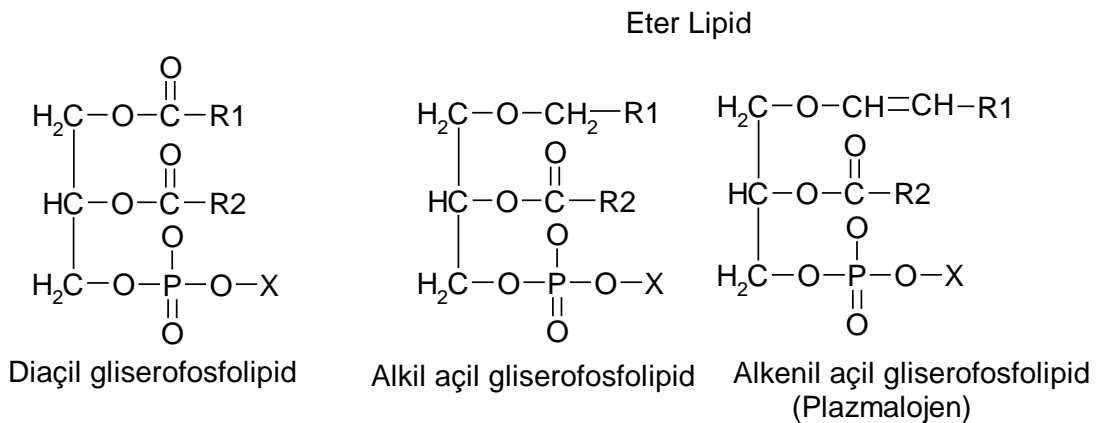
FL'ler gliserol omurgasının sn-1 ve sn-2 pozisyonlarına ester bağlarıyla bağlı açil zincirlerine sahiptir (71). Eter bağlı fosfolipidler, gliserol omurgasının sn-1 pozisyonunda bir alkil eter veya vinil eter bağı içeren lipidlerdir (Şekil 2.4.). Eter gliserofosfolipidlerde (EGL) iki ana tip eter bağı bulunmaktadır. Bunlar eter ve vinil eter bağlarıdır. EGL'de alkil eter bağı  $\alpha$ -pozisyonunda ve D-konfigürasyonuna sahiptir. Vinil eter bağında ise oksijen atomuna bağlı bir çift bağ bulunur. Bu çift bağ Z veya cis konfigürasyonuna sahiptir (72).





**Şekil 2. 4.** Eter ve vinil eter yapısı

EGL'ler alkali koşullar altında açıl gruplarını kaybederek alkil ve alkenil gliserolipidlere dönüşebilir. EGL'nin alkil eter bağları, normal koşullarda asidik hidrolize karşı stabil iken vinil eter bağları, asidik koşullarda aldehitlere dönüşebilir (73). EGL'ler gliserol omurgasının sn-1 pozisyonunda bir alkil eter veya alk-1-enil (vinil eter) eter bağı, sn-2 pozisyonunda genellikle ester bağı bir açıl zinciri bulundurlar (29). EGL'de sn-3 pozisyonunda fosfat grubuna bir alkol grubu bağlıdır. Alkol grubu genellikle kolin veya etanolamindir ancak zaman zaman inositol veya serin de bulunabilir. Doğada bulunan EGL'ler çoğunlukla heksadesil (C16:0-Kimil Alkol), oktadesil (C18:0-Batil Alkol) ve oktadesenil (C18:1-Selasil Alkol) karbon birimlerinden oluşur (74). EGL'ler vinil eter bağı bulunduranlar plazmeniller (plazmalojenler), eter bağı bulunduranlar ise plazmaniller olarak adlandırılır. EGL plazmeniller, plazmaniller trombosit aktive edici faktör (PAF) ve diğer eter lipid olarak sınıflandırılır (61). PAF, kemotaksisin uyarılması, toplanması ve oksidatif metabolizması gibi etkilere ve ayrıca trombositlerde topaklanma, şekil değişimi ve salgılanmanın indüklenmesi gibi fonksiyonlara sahiptir (75). Plazmanil ve plazmenil EGL sınıfları sonraki sayfada detaylı açıklanmıştır. EGL'ler memelilerin toplam fosfolipidlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Ancak dokulardaki dağılımı değişkenlik gösterir. En yüksek EGL düzeyleri beyin, kalp, dalak ve beyaz kan hücrelerinde bulunurken, karaciğerde düşük düzeyde bulunur (71).



**Şekil 2. 5.** Diaçil gliserolipid ve eter gliserolipid yapısı (76) nolu kaynaktan yararlanılarak yeniden çizilmiştir.

### 2.7.1.1. Plazmalojenler

Gliserofosfolipidler gliserol yapısının sn-1 pozisyonundaki gruba göre üç alt sınıfa ayrılır: açıl, alkil ve alkenil gliserofosfolipidler (77). Gliserol omurgasının sn-1 pozisyonunda bir açıl grubu bulunduranlara açıl gliserofosfolipid denir. Gliserol omurgasının sn-1 pozisyonunda doymuş bir eter kısmı içerenlere alkil gliserofosfolipid (plazmanil veya 1-O-alkil-2-açıl-sn-gliserol-3-fosfolipid) olarak adlandırılırken sn-1 pozisyonunda bir vinil eter kısmı bulunduranlara alkenil gliserofosfolipid (plazmalojenler, plazmeniller veya 1-O-1('Z)-alkenil-2-açıl-gliserofosfolipid) olarak adlandırılır (61). EGL'lerin alkenil gliserofosfolipid formu, "plazmenil", alkil gliserofosfolipid formu, "plazmanil" ön ekine sahiptir (61, 78).

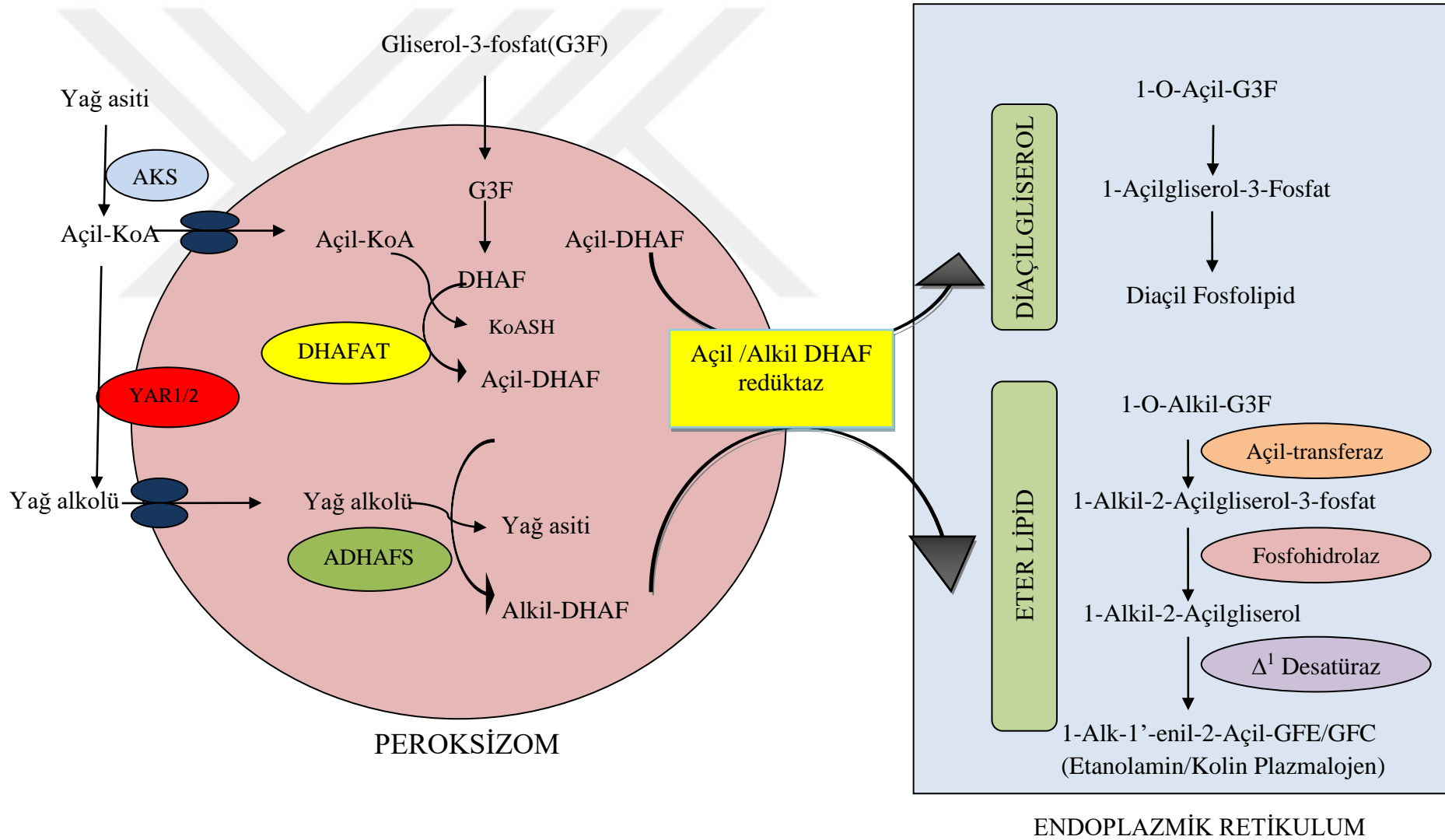
Plazmalojenler 1924 yılında Feulgen ve Voit tarafından keşfedilmiştir (79). Plazmalojenler, EGL'lerin en yaygın sınıfıdır ve esas olarak kolin plazmalojenler (plazmenilkolinler) ve etanolamin plazmalojenler (plazmeniletanolaminler) olarak sınıflandırılırlar (61). Baş grubu olarak etanolamin bulunduranlar plazmeniletanolamin kolin bulunduranlar plazmenilkolin olarak adlandırılır (29). Plazmalojenlerin sn-2 pozisyonunda, çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) dokozaheksanoik asitler (C22: 6 n-3) veya araşidonik asit (C20: 4 n-6) bulunur (78).

Plazmalojenler, birçok hücrel sinyal proteininin yoğunlaştığı, kolesterol bakımından zengin zar bölgeleri olan lipid yığınları (lipid rafts) mikroalanlarında yoğunlukla bulunurlar (80). Plazmalojenler insan biyolojik sıvılarında, anaerobik bakterilerde, omurgasızlar ve omurgalı hayvan türlerinde yaygın olarak bulunur (81). Plazmalojenler, tüm memeli hücrelerinin hücre zarı, çekirdek, ER, golgi ve mitokondri gibi organellerin önemli bileşeni iken sentez yerleri olan peroksizomlarda bulunmaz. (71). Ayrıca, plazmalojenler tüm memeli hücrelerinin beyin, kalp ve kas dokusunda bulunur (82). İnsan doku ve hücrelerinde ise plazmalojenler karaciğerde, bağırsakta ve böbrekte sentezlenir ve lipoprotein bileşenleri olarak kana salınırlar (70). Plazmalojenlerin dokulardaki oranları önemli ölçüde farklılık gösterebilir: Kalpte %32-50, inflamatuvar hücrelerinde %50'ye kadar ve spermatozoada %55'tir. Beyindeki FE'nin üçte ikisi ve toplam miyelin fosfolipidlerinin %12'si plazmeniletanolaminler, (29). Plazmada, plazmeniletanolaminler, toplam FE'nin %50'sini ve Plazmenilkolin toplam FC'nin %5'ini temsil eder (61). En düşük miktarda plazmalojen karaciğer dokusunda bulunur. Bu, karaciğerdeki azlığın sebebi sentezlenen plazmalojenlerin daha sonra lipoproteinler şeklinde diğer dokulara taşınması ile açıklanmıştır (83). Plazmalojen

seviyeleri aynı zamanda organizma yaşı ile de ilgilidir. Sağlıklı yenidoğanlarda eritrosit plazmalojen içeriği çok düşüktür. Beyin plazmalojenlerinin toplam miktarı, myelinasyonun gelişim evresi sırasında başlar ve yaklaşık 30 yaşına kadar maksimum seviyelere ulaşır genellikle yaşlanmayla birlikte de azalır (84).

### 2.7.1.2. Plazmalojenlerin Biyosentezi

Plazmalojen biyosentezi peroksizomlarda başlar ve ER'de sonlanır (85). Glikoliz ara maddesi gliserol-3-fosfat (G3F) plazmalojen sentezinde öncü molekülüdür. Sitoplazmadan peroksizom membranına geçen G3F, peroksizomlarda gliserol-3-fosfat dehidrojenaz (G3FDH) katalizi ile dihidroksaseton fosfata (DHAF) indirgenir (29). Oluşan DHAF'nin sn-1 konumuna DHAF açiltransferaz (DHAFAT) tarafından bir yağ açıl KoA'nın eklenmesiyle açil-DHAF oluşur. Bu aşama için gerekli yağ asitleri de novo lipojenezi veya diyet kaynaklarından yağ asidi sentezinin (YAS) aktivitesiyle üretilir. Yağ asitleri peroksizomal membran ile ilişkili bir açil-KoA sentetaz (AKS) ile açil-KoA'lara dönüştürülür (76). Sonraki peroksizomal adımda açil-DHAF'ye alkil dihidroksiaseton fosfat sentazı (ADHAFS)'ın katalizi ile bir yağ alkolü eklenir ve alkil-DHAF sentezlenir. Bu aşamada ADHAFS için gerekli yağ alkolü peroksizom dışındaki yağ açil-KoA redüktaz 1 ve 2 (YAR1 / YAR2) enzimleri tarafından sağlanır (61). Yine bu aşamada sn-1 pozisyonundaki açil zincirinin alkil zinciri ile yer değişmesi sonucu sn-1 konumunda eter bağı oluşturulur. Son peroksizomal aşama açil/alkil-DHAF redüktaz aracılığı ile gerçekleştirilir. Sentezlenen alkil-DHAF peroksizom membranında bulunan alkil-DHAF redüktaz tarafından 1-O-alkil-G3F'ye, Açil-DHAF ise açil-DHAF redüktaz tarafından 1-açil-G3F'ye (lizofosfatidik asit) indirgenerek peroksizom dışına çıkar (83). Sentezin sonraki adımları ER'de gerçekleşir. ER'deki ilk aşamada 1-O-alkil-G3F'ye bir açil transferaz aracılığıyla bir açil grubu eklenir. Devamında bir fosfohidrolaz katalizi ile 1-alkil-2-açilgliserole dönüştürülür. Oluşan 1-alkil-2-açilgliserole CDP-etanolamin alkil açilgliserol fosfoetanolamin/kolin transferaz ile bir CDP- etanolamin veya CDP- kolin eklenir. CDP-kolin eklenmesiyle 1-alkil-2-açilgliserol 3-fosfokolin, CDP-etanolamin eklenmesiyle 1-alkil-2-açilgliserol-3-fosfoetanolamin oluşur (71). 1-alkil-2-açilgliserol 3-fosfoetanolamin  $\Delta^1$  desaturaz ile 1-alk-1'-enil-2-açilgliserol 3-fosfoetanolamin/kolin (etanolamin/kolin plazmalojen) sentezlenir (Şekil 2.6.). Diğer taraftan Açil-DHAF açil-DHAF redüktaz tarafından 1-açil-G3F'ye (lizofosfatidik asit) indirgenerek peroksizom dışına çıkar ve ER'de diaçil fosfolipidlerin sentezinde rol oynar. Bu yol diaçil fosfolipid sentezi için zorunlu olmayan alternatif bir yoldur (83).

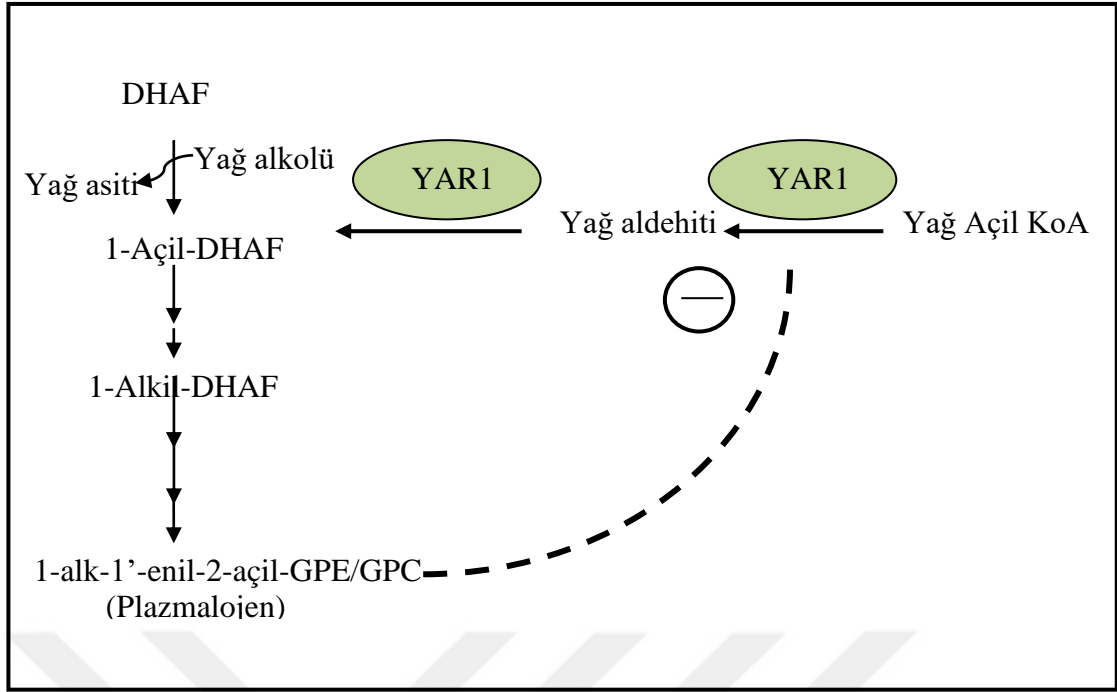


**Şekil 2. 6.** Plazmalojen biyosentez basamakları.

DHAFAT: dihidroksiaseton fosfat açil transferaz, ADHAFS: alkil dihidroksiaseton fosfat sentaz, AKS: açil KoA sentaz, YAR1/2: Yağ açil-KoA Redüktaz 1/2, DHAF: dihidroksiaseton fosfat, GPE/C: gliserol-3-Fosfoetanolin/Kolin. (76, 83) numaralı kaynaklardan yararlanılarak yeniden çizilmiştir.

### 2.7.1.3. Plazmalojen Biyosentezinin Regülasyonu

Plazmalojen sentezi, plazmalojenlerin hücre seviyesine bağlı bir şekilde feed back (geri bildirim) mekanizması ile düzenlenir (85). Plazmalojenlerin miktarının algılanması, plazmalojen biyosentezinin regülasyonu için çok önemli bir adımdır. Plazmalojenlerin miktarının algılanması plazma membranında bulunan Plazmeniletanolamin miktarının algılanmasıyla düzenlenir (71). Plazmeniletanolamin biyosentezi, yağ açıl redüktaz 1(Yarl)'in stabilitesinin, toplam plazmeniletanolaminler hücresele seviyesine bağlı bir şekilde modüle edilmesiyle düzenlenir. Plazmeniletanolamin eksikliği olan hücrelerde plazma zarının iç yüzeyinde yer alan plazmeniletanolaminler miktarı algılanır ve hücresele plazmeniletanolaminler seviyesini gösteren sinyal, peroksizomlara iletilir ve Yarl'in stabilitesinin düzenlenmesini sağlar. Yarl'in yüksek aktivitesi, hücresele plazmalojen seviyesini yükselterek normale dönüştürülür. Yarl'in aktivitesi, transkripsiyon seviyesinde düzenlenmez; aksine, hücresele plazmalojenlerin miktarına cevaben Yarl'in stabilitesini modüle edilmesiyle transkripsiyon sonrası düzenlenir (Şekil 2.7.). Yarl'in ayrışması plazmalojen eksikliği olan hücrelerde inhibe edilir, oysa hücresele Plazmeniletanolaminler'in yükselmesi, CHO-K1, HeLa ve HepG2 gibi çeşitli hücre hatlarında bildirildiği gibi Yarl'in yıkımını artırır, böylece Plazmeniletanolaminler sentezini azaltır. Bu tür deneysel kanıtlar, sınırlandırıcı enzim Yarl'in stabilitesinin, plazmalojenlerin hücresele seviyesinin algılanmasının bir sonucu olarak Plazmeniletanolaminler'in sentezini düzenlediğini göstermektedir (86). Ek olarak, hücresele plazmalojen seviyesi, kolesterol sentezi, kolesterol esterlenmesi, HDL aracılı kolesterol akışının ve kolesterolün dağılması gibi birçok aşamada kolesterol homeostazlarında önemli bir rol oynar. Bu bulgular göz önüne alındığında, plazmalojenlerin hücre seviyesini algılayarak plazmalojenlerin homeostazını korumak için plazmalojen sentezi sıkı bir şekilde düzenlenmelidir (85). Ayrıca kolesterol biyosentezi de plazmeniletanolaminler'in homeostazı ile düzenlenir, burada plazmeniletanolamin, kolesterol sentezinde önerilen ikinci hız sınırlayıcı enzim olan squalen monooksijenaz'ın stabilitesini düzenlenmektedir (61).



**Şekil 2. 7.** Plazmalojen biyosentezinin regülasyonu. Plazma membranının iç yüzeyinde yer alan plazmalojen konsantrasyonu artığında plazmalojen molekülü peroksizom membranında bulunan YAR1 bağlanarak plazmalojen sentezini baskılar. DHAF: dihidroksiaseton fosfat, YAR1: yağ açıl KoA redüktaz1 (87) numaralı kaynaktan yararlanılarak yeniden çizilmiştir.

#### 2.7.1.4. Plazmalojenlerin Fonksiyonları

**Plazmalojenlerin Membran Bileşenleri Olarak Önemi:** FL'ler, plazma zarlarının ve organel zarlarının baskın bileşenleridir. Ökaryotik membranlarda farklı FL'lerin kompozisyonunun homeostazı korumak için esastır (88). FL'lere eter bağlı alkil ve alkenil zincirlerinin dahil edilmesi onların fiziksel özelliklerini değiştirir ve membran dinamiklerini etkiler. Dolayısıyla membranlardaki EGL değişiklikleri, birçok hücrel fonksiyon ve hastalıkla ilişkilidir (78). Plazmalojenlerin sn-1 pozisyonundaki vinil-eter bağı, sn-1 ve sn-2 pozisyonundaki zincirlerin proksimal bölgelerinin paralel olmasını sağlar. Buna bağlı olarak zardaki FL'ler daha sıkı bir şekilde paketlenir, membran akışkanlığı düşer ve membran sertliği artar. Bu özellik, miyelin gibi membran yapılarında oldukça önemlidir (82). Plazmalojenler, onları diğer fosfolipidlerden ayıran biyofiziksel özellikler de gösterirler. Floresan anizotropi çalışmaları, plazmalojen eksikliği bulunan hücrelerin zarlarının, kontrol hücrelerin zarlarından daha fazla akışkan ve daha az sıralı olduğunu göstermektedir. Bu da plazmalojenlerin lipid akışkanlığını (mobilitesini) azalttığını göstermektedir (89). Plazmalojenlerin membran biyolojisindeki bir diğer önemli yönü de "füzojenik" aktivitelerinde kaynaklanmaktadır. Bu lipidlerin membran füzyonunu ve fisyonu üzerine etkisi hekzagonal bir faza geçiş eğiliminin

artmasından kaynaklanmaktadır. Plazmalojenlerin bu özelliğinin, membran geçirgenliğini ve membran-membran füzyonunu arttırdığı düşünülmektedir (29). Bu özellik eksositoz ve endositoz gibi fizyolojik işlemlerde önemli bir rol oynamaktadır (90). Plazmeniletanolaminlerin hegzagonal faz geçiş eğiliminin daha yüksek olması nedeniyle, etanolamin plazmalojen içeren veziküllerin FE içeren keseciklerden altı kat daha hızlı bir şekilde füzyona uğradığı görülmektedir. Bu, etanolamin plazmalojenlerinin sinaptik transmisyon, hormon salınımı ve apoptozis sırasında meydana gelen membran füzyonunda rol oynayabileceğine işaret eder (82). Ayrıca, sadece plazmalojenlerin kendilerinin değil, aynı zamanda bunların lizo-türevlerinin de membran füzyonunda ve faz geçişinde önemli rolleri olduğu öne sürülmüştür (89). Plazmalojenler plazma membranlarında iyonların taşınmasında da rol oynayabilirler (82).

**Plazmalojenlerin Sinyal Bileşenleri Olarak Önemi:** Plazmalojenler sn-2 pozisyonunda araşidonik asit (C20:4 n-6) ve dokozahekzaenoik asit (C22:6 n-3) gibi PUFA'ları yüksek oranda bulundurlar (78). Her iki yağ asiti de beyin gelişimi ve normal sinir fonksiyonları için hayati öneme sahiptir. Sinir sisteminde, özellikle gri madde plazmalojenleri PUFA'lar bakımından zengindir. PUFA'lar plazmojen seçici fosfolipaz A<sub>2</sub>, tarafından fosfolipidlerden kolayca salınabilir. Serbest araşidonik asit ve dokozahekzaenoik asit biyolojik olarak aktif moleküllere metabolize olur. Araşidonik asit; lökotrienler, lipoksinler, tromboksanlar ve prostaglandinler gibi biyolojik olarak aktif moleküllere metabolize olurlar (63). Dokozahekzaenoik yağ asiti; immünomodülatör etkilere sahip olan çözücülere, koruminlere ve maresinlere metabolize olabilir. Plazmalojenlerin sn-2 konumundan PUFA'ların serbest bırakılması, sadece sinyalleşme fonksiyonlarına aracılık edebilen serbest yağ asitleri üretmekle kalmaz, aynı zamanda ikinci haberci olarak da hizmet edebilen lizoplazmalojenleri üretir. Bir etanolamin baş grubuna sahip olan lizoplazmalojenler, doğal öldürücü hücrelerin (NK) uyarılması ve olgunlaştırılmasında kendi antijenleri olarak hareket etme potansiyeline sahiptir. Kolin baş grubuna sahip olanlar ise, nötrofillerin insan endotel hücrelerinde cAMP-bağımlı protein kinazı aktif hale getirerek daha fazla yapışmaya neden olabilirler (89). Son çalışmalar eter lipid eksikliği olan hastaların ve hayvan modellerinin fenotipik özelliklerinin çoğu, plazmalojenlerin bulunmamasına bağlanmıştır. Yine de, özellikle sinyal iletiminde çeşitli başka eter lipid bileşikleri patolojilere katkıda bulunabilir.

**Plazmalojenlerin Antioksidan Olarak Önemi:** Plazmalojenlerin vinil eter bağları singlet oksijen ve diğer reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı plazmalojenler antioksidanlar gibi davranabilir (82). Özellikle, plazmalojenlerin, doymamış membran lipidlerini tekli oksijen ile oksidasyondan koruyabildiğine dair kanıtlar vardır. Bunun, plazmalojenleri oksidatif ataklara duyarlı kılan vinil eter bağının varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (76). Vinil eter bağlarının düşük ayrılma güçleri vardır ve çeşitli serbest radikallere ve tekli oksijene maruz kaldıklarında oksitlenirler. Bu reaksiyonda plazmalojenler tüketilir. Bu çoklu doymamış yağ asitlerinin ve diğer hassas membran lipidlerinin oksidasyondan korumak için plazmalojenlerin kurban antioksidanlar olarak rol oynadığını göstermektedir. Plazmalojenlerin oksidatif ürünleri 1-hidroksi (veya lizo) -2-açıl-sn-gliserofosfolipid, 1-formil-2-açıl-sn-gliserofosfolipid, alelik hidroperoksitler, epoksitler ve hemiasetaller olabilir (71). Bunun yanı sıra, plazmalojenlerin çeşitli stres koşullarına karşı koruduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Plazmalojen eksikliği bulunan hücrelerin, stres koşullarına karşı kontrol hücrelerine göre daha az dirençli olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, plazmalojenlerin antioksidanlar olarak rolü tartışılmaktadır. Bazı araştırmacılar potansiyel bir antioksidan etkinin, vinil eter bağından ziyade, plazmalojenlerin sn-2 pozisyonuna esterlenmiş PUFA'lardan kaynaklanabileceğini öne sürmektedirler (89).

### **2.7.1.5. Plazmalojenleri Tespit Etmek İçin Analitik Yöntemler**

Plazmalojenleri tespit etmek, tanımlamak, karakterize etmek ve ölçmek için çeşitli analitik yöntemler kullanılabilir (61). Total lipidlerden fosfolipaz-C'nin hidroliz veya vitride redüksiyonu (lityum alüminyum hidrit ile indirgeme) ile elde edilebilen dialkil gliserol eterleri, alkil gliserol eterleri ve glikol monoeterleri adsorpsiyon kromatografisi ile birbirlerinden ayrılabilir (74). Bununla birlikte, süstitüe edilmiş gliseroller ve ilgili lipidler TLC ile ayrılabilir. TLC ile ayrılan lipid sınıfları, Gaz-Sıvı Kromatografisi ile daha da ayrılabilir (91). Plazmalojenler için bu analitik yöntemlerin önemli bir yönü, vinil-eter bağının asit hidrolizi ile ilgilidir ve asit hidrolizi sonucu plazmalojenler yağlı aldehitlere ve 1-lizofosfolipidlere ayrışır. Elde edilen yağ aldehitleri genellikle gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak dimetil asetal türevleri olarak ölçülür. 1-Lizofosfolipidler İki Boyutlu İnce Tabaka Kromatografisi ile ölçülür. TLC, EGL'lerin ayrılması için en sık uygulanan tekniktir çünkü bu yöntem düşük maliyetlidir ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi



(HPLC)'den daha hızlı ve daha uygun bir şekilde yapılabilir (92). TLC'nin diğere önemli avantajı, tek bir TLC plakası üzerinde birkaç numunenin aynı anda uygulanabilmesidir. Bu büyük avantajların yanı sıra TLC'nin ciddi bir dezavantajı, EGL'lerin yağ açıl bileşiminin ve bir EGL sınıfı içindeki diaçil ve alkil-açil bağlantılı türler arasındaki farklılığın belirlenmesinin zor olmasıdır (80). Ayrıca bu yöntemler emek yoğun gerektirdiğinden ve küçük örnek hacimlerindeki plazmalojenleri ölçmek için yetersiz doğruluktadır. Son zamanlarda, plazma/serum plazmalojenleri tespit etmek için radyoaktif iyot ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ve enzimatik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (70).



### 3. MATERYAL METOT

#### 3.1 Materyal

**Kimyasallar:** Kloroform (% 99,8, HPLC Grade) Lab-Scan (İrlanda). Kloroform (% 99,8), metanol, asetik asit (% 96) Merck KgaA, Darmstad (Almanya). Etanol, metanol, n-hekzan, toluen Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (Almanya). n-Bütanol, glasiyal asetik asit Carlo Erba Reagents (Fransa). Hidroklorik asit (% 38), orto-fosforik asit (%85) J. T. Baker (Hollanda). Dietil eter (% 99) Sigma Aldrich (Almanya).

**Reaktif ve diğer materyaller:** Potasyum hidroksit, potasyum dihidrojen fosfat Merck (Almanya). Dipotasyum hidrojen fosfat 3-hidrat, 2,7-dichlorofluorescein Roth (Almanya). Fosfolipaz-C (*Clostridium perfringens*, 500 unite) Sigma-Aldrich. % 0,9 İzotonik sodyum klorür, Polifarma (Türkiye). Bakır II sülfat 5-hidrat Sigma-Aldrich (Almanya). Sodyum metaperiodate, basic fuchsin dye Across Organics (Hindistan). Sodyum metabisülfid, Honeywell (Almanya). 25 TLC Plates 20 X 20 Silica gel 60 Merck (Almanya). Twin Through Chamber CAMAG Scientific Inc. (Wilmington N. C. ABD). Disposable Micropipettes 1 mL Eppendorf (İngiltere) ve Ergoone (Almanya). 2-20 uL Micropipettes BrandTech Scientific, 5-10 mL'lik cam pipet Iso-Lab(Almanya). Inc. 3.0 mL 5.4 mg EDTA içeren tüp BD-Polymouth (İngiltere). Vida kapaklı tüp 10 X 1.5 cm. 20 X 1.5 Vida kapaklı tüp. 1,5 mL. Mikrosantrifüj tüpü IsoLab (Almanya). Azot gazı Habaş (Türkiye).

**Standartlar:** 1-O-heksadesil-sn-gliserol Bachem (İsviçre). 1-O-1'-(Z)-heksadesenil-2-hidroksi-sn-gliserol-3-fosfokolin Avanti Polar Lipids, Inc. (ABD).

**Makine Teçhizat:** Soğutmalı Santrifüj: Hettich Universal 320 R (Almanya). Mikrosantrifüj: Netheler-Hinz GmbH (Almanya). Etüv: Binder (ABD). Su banyosu: PMC series 300 Bath San Diego (Kaliforniya). Su Banyosu: Köttermann Labortechnik (Almanya). Roller Mikser: Medispec (ABD). Spektrofotometre: Shimadzu UV-1800-240V (Japonya). Vorteks: Velp Scientifica (İtalya). Saç Kurutma Makinesi: Premier Prh 03 1200W (Türkiye). pH metre: WTW xylem brand (Almanya). Tarayıcı: Canon 5600F

**Programlar:** Genetools SynGene. SPSS (Statistical Package for Social Sciences). Microsoft Office Excel 2007.

### **3.2. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması**

Power analizi sonucunda, eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ ) oranlarının sağlıklı bireyler ile uyku bozukluğu olan bireylerde karşılaştırılması için aradaki farklılığın  $0.75 \mu\text{M}$  olacağı öngörüsüyle %80 güç ve %95 güven düzeyinde grup başına çalışmaya alınması gereken minimum kişi sayısı 29 olarak hesaplandı. Bunun sonucunda 25-60 yaş arası 30 kişi uyku bozukluğu olmayan (kontrol grubu) ve 30 kişi uyku bozukluğu olan (hasta grubu) kadın ve erkek gönüllü çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilecek kişi sayısının belirlenmesinin ardından Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 28.12.2016 tarihli 2016/198 nolu kararı ile etik kurul onayı alındı.

Kan numuneleri hasta grubu için Turgut Özal Tıp Merkezi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Uyku Bozuklukları Polikliniğine başvuran Uyku Laboratuvarında tek gece polisomnografi tetkiki yapılarak uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanısı konulan 25-60 yaş arası 30 gönüllü hastadan (8 kadın ve 22 erkek) alındı. Kontrol grubu için ise uyku bozukluğu tanısı olmayan 25-60 yaş arası 30 gönüllü sağlıklı kişiden (18 kadın ve 12 erkek) toplandı. Çalışmaya katılan uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanısı almış bireylerin ve kontrol grubu bireylerinin yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi gibi bazı özellikleri, sigara kullanımı, ilaç kullanımı ve varsa ek hastalıkları kaydedildi. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylere gönüllü onam formları okutulup gerekli bilgilendirmeler yapıldıktan sonra her bir bireyden antikoagülan içeren (EDTA) 2 tüpe kan numunesi alındı. Alınan numuneler plazma ve eritrositlerine ayrıldı. Çalışmada ayrılan eritrosit numuneleri kullanıldı. Numuneler hasta grubu için  $H_1, H_2, \dots, H_{30}$ , kontrol grubu için  $K_1, K_2, \dots, K_{30}$  şeklinde kodlandı. Tüm kan numuneleri 10.07.2018-15.01.2019 tarihleri arasında toplandı. Çalışmanın etik kurul onay belgesi (EK2) ve gönüllü onam formu örneği (EK3) ekler bölümünde verilmiştir.

### **3.3. Numunelerin Hazırlanışı**

#### **3.3.1. Eritrosit Süspansiyonu Hazırlanışı**

Kan numuneleri kan alımından hemen sonra 4000 rpm'de 7 dakika boyunca  $15^\circ\text{C}$  santrifüj (Hettich Almanya) edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan plazma, önceden hasta bilgileri yazılmış yeni Eppendorf tüplerine alındı. Her bir Eppendorf tüpünde 1 mL plazma numunesi olacak şekilde numuneler eklendi. Altta kalan eritrositten her bir

Eppendorf tüpüne 0.6 mL alındı ve üzerine 0.6 mL %0.9 izotonik sodyum klorür çözeltisi (salin) eklendi. Mikrosantrifüjde (Eppendorf Almanya) 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan faz ayrılıp atıldı. Altta kalan eritrosit fazı alındı önceden 1 mg BHT (2,6-di-terciyer-bütül-4-hidroksitoluen) içeren hasta bilgileri yazılmış yeni Eppendorf tüpüne eklendi. Üzerine yeniden 0.6 mL salin eklendi ve vortekslendi. Hazırlanan numuneler analiz süresine kadar -80 °C de saklandı (93). Toplanan her bir kan numunesi için aynı işlemler tekrarlandı. BHT içeren tüplerin hazırlanışı: 1 gr BHT tartıldı 100 mL etanolde çözüldü. Hazırlanan çözelti 6 °C ışıktan almayacak şekilde saklandı. Eritrosit numunesi konulacak her bir Eppendorf tüpüne kullanılmadan önce 0.1 mL BHT çözeltisi eklendi ve azot gazı altında uçuruldu.

### **3.3.2. Eritrosit Lipid Ekstraksiyonu**

Lipid ekstraksiyonu Bligh and Dyer (94) metoduna göre yapıldı. Hazırlanıp -80 °C muhafaza edilen eritrosit süspansiyonları oda ısısında çözüldü. Çözülen eritrosit süspansiyonundan 1 mL alınıp 10 x 1.5 mL vida kapaklı cam tüpe eklendi. Üzerine 3.75 mL kloroform / metanol (1:2 -v/v) eklendi tüpün ağzı teflon kapak ile kapatıldı ve 15 dk boyunca vortekslendi. Sonra üzerine 1.25 mL kloroform eklenip 1dk vortekslendi. 1.25 mL distile su eklenip 1 dk daha vortekslendikten sonra 4000 rpm'de 7 dk boyunca 15 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün içerisinde üç faz gözlemlendi. En üstte metanol ve su fazı, ortada proteinlerin olduğu tabaka ve en altta da kloroform fazı gözlemlendi. En üst faz ayrılıp atıldı. İki faz arasında bulunan protein tabaka delinerek alttaki kloroform fazı alındı temiz cam bir vida kapaklı tüpe eklendi. Cam tüpe alınmış olan faz 30 °C'de su banyosunda azot gazı altında uçuruldu. Aynı işlem tüm numuneler için tekrarlandı Hazırlanan ekstraksiyon üzerine 0.2 mL kloroform eklenerek +4 °C analiz edilinceye kadar muhafaza edilir.

### **3.3.3. Total Lipidlerin Fosfolipaz-C ile Hidrolizi**

Yöntem gliserofosfolipidlerin sn-3 pozisyonundaki fosfat gruplarının fosfolipaz-C ile hidrolizine dayanmaktadır. Hidroliz ürünleri diaçilgliserol ve suda çözünür fosforil bileşikleridir (95).

Lipid ekstraksiyonu yapılan her 1 mL eritrosit numunesi üzerine 2 mL dietileter eklendi ve 2 dk vortekslenerek lipidlerin tamamen çözünmesi sağlandı. Çözünmüş lipid ekstraktı üzerine 0.5 mL 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış (pH 7.0) fosfolipaz-C çözeltisi eklendi. Tüpün ağzı teflon kapak ve parafilm ile hava almayacak şekilde

kapatıldı ve 2 dk vortekslendi. Hazırlanan tüpler bir otomatik karıştırıcı (Roller mixer) üzerine yerleştirildi ve oda ısısında 3.5 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüpler 4000 rpm'de 7 dk boyunca 15 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst dietileter fazı 20x1.5 vida kapaklı cam tüpe alındı azot gazı altında uçuruldu. Aynı işlem tüm numuneler için tekrarlandı.

**Fosfat Tamponu Hazırlanışı:** 50 mM fosfat tampon için dipotasyum hidrojen fosfat 3-hidrat ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ) ve potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) kullanıldı.  $K_2HPO_4$  3.64 gr ve  $KH_2PO_4$ 'den 1.52 gr tatılarak ayrı ayrı beherlere alındı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacimler 250 mL ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerden manyetik karıştırıcı üzerine içerisinde pH metre bulunan bir beher içerisine  $KH_2PO_4$  ve  $K_2HPO_4$ 'den pH 7.0 olana kadar karıştırılarak eklendi. Hazırlanan çözelti temiz bir balon jöjeye alınıp ağzı kapatıldı ve +4 °C saklandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadan önce oda ısısına getirildi.

**Fosfolipaz-C Hazırlanışı:** 500 unite fosfolipaz-C üzerine 5 mL fosfat tamponu (pH 7.0) eklendi. Hazırlanan karışım kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C saklandı. Her bir numune için 0.07 mL Fosfolipaz-C çözeltisi alındı 0.43 mL fosfat tamponu ile 0.5 mL ye tamamlanarak kullanıldı. Böylece 1 mL'lik her bir numuneye 7 unite fosfolipaz-C eklenmiş oldu (96)

### 3.3.4. Açıl Gruplarının Saponifikasyonu

Yöntem açıl-alkil ve açıl-alkenil gliserolipidlerin alkali koşullar altında açıl gruplarını kaybederek alkil ve alkenil gliserollere dönüşmesi prensibine dayanmaktadır. Karışımdaki açıl grupları ortamdaki baz ile tepkime sonucu sabunlaşır. Sabunlaşmayan lipidler (alkil ve alkenil gliserolipidler) ekstrakte edilerek ayrılır (96).

Lipid ekstraksiyonu ve fosfolipaz-C ile hidrolizi yapıp azot gazı altında uçurulmuş olan ekstrakt üzerine 2.5 mL 0.5 M metanolde hazırlanmış potasyum hidroksit (KOH) eklendi. Tüpler 1 dk vortekslendikten sonra 10 dk 100 °C kaynayan su banyosunda tutuldu. 10 dk'nın sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler oda ısısına gelene kadar soğutuldu. Soğutulan tüplere 4.5 mL metanolde hazırlanmış %6 glacial asetik asit eklendi ve 1 dk vortekslendi. Vortekslenen karışıma 7 mL kloroform eklenip 1 dk vortekslendi. Sonrasında karışıma 6 mL distile su eklendi ve 1 dk daha vortekslendi. Hazırlanan numuneler faz ayrımı için bir gece karanlıkta bekletildi. Bir gecenin sonunda altta kalan kloroform fazı 5 mL'lik cam pipetle 10x1.5 cam tüpe alındı ve 30 °C'de su banyosunda azot gazı altında uçuruldu. Üst metanol fazına ise tekrar 7

mL kloroform eklenip 1 dk vortekslendi. Faz ayrımı için dört saat beklendi. Bu sürenin sonunda üst metanol fazı atıldı. Alt kloroform fazı alınarak 30 °C’de su banyosunda azot gazı altında uçuruldu. Uçurulan iki faz aynı tüpte toplandı. Üzerine 0.2 mL kloroform eklenerek +4 °C saklandı. Aynı işlem tüm numeneler için tekrarlandı.

Lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidroliz ve açıl gruplarının saponifikasyonu işlemleri 1 mL plazma numunesi için aynı şekilde tekrarlandı. Hazırlanan plazma numunesi ile eritrosit numunesi TLC ile ayrımı karşılaştırıldı.

### **3.4. Standartların Hazırlanışı**

**Alkil gliserolipid standartının hazırlanması:** 1gr 1-O-heksadesil-sn-gliserol üzerine 10 mL kloroform eklenerek çözüldü. Çözülen lipid 2 mL’lik stok çözeltilere ayrıldı. Hazırlanan stok çözeltiden 0.1 mL alındı son konsantrasyon 2µg/µL veya 4µg/µL olacak şekilde 25 veya 50 kat kloroformla sulandırılarak kullanıldı. Sulandırılan numuneler +4 °C’de, stok çözeltiler -20 °C saklandı (97).

**Alkenil gliserolipid standartının hazırlanması:** 10 mg 1-O-1’-(Z)-heksadesenil-2-hidroksi-sn-gliserol-3-fosfokolin üzerine 1 mL kloroform eklenerek çözüldü. Son konsantrastron 1µg/100µL olan çözeltiden 0.25 mL alınarak 2 cam tüpe eklendi. Hazırlanan çözeltilerin fosfolipaz-C ile hidroliz ve açıl gruplarının saponifikasyonu işlemleri yapıldı. Hazırlanan çözeltiler alkenil gliserofosfolipid standartı (LPC), hidrolize alkenil gliserolipid (LPC1), ve saponifiye alkenil gliserolipid (LPC2) olarak kodlandı.

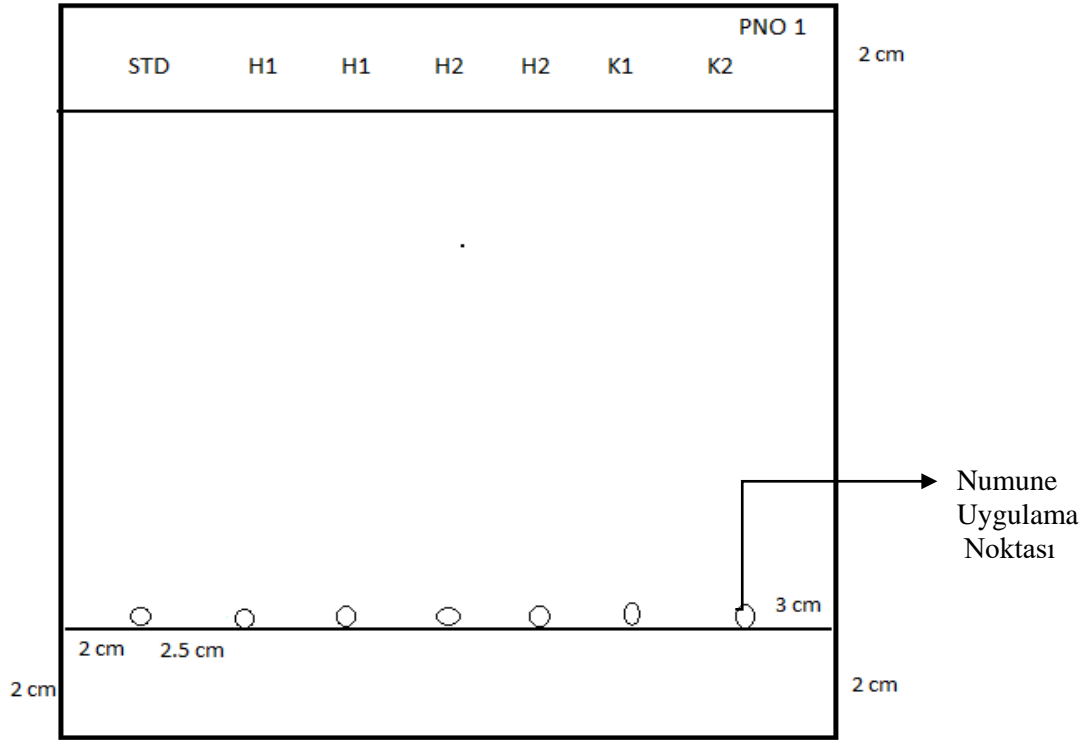
### **3.5. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı**

Yöntem sabit bir faz üzerine uygulanmış numune bileşenlerinin organik akıcı maddeler yardımıyla birbirinden ayrılmasına dayanmaktadır. Ayrım aşağıdan yukarı doğru hareketli fazın kılcallık etkisi ile sabit faz üzerinde bulunan numune bileşenlerinin birbirlerinden ayrılması ile olur (80). Yöntemde sabit faz, çeşitli boyutlardaki cam veya alüminyum plakalar üzerine, ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban (silika jel maddedir. Hareketli faz ise ayrılacak maddelerin özelliğine göre belirlenmiş bir veya birden fazla çözücü karışımlarından oluşur. Sabit faz polar, hareketli faz apolar özelliktedir. Dolayısıyla karışımdaki polar maddeler sabit faza tutunacağından daha yavaş hareket ederler. Hareketli faz ise apolar olduğundan apolar maddeler ise daha hızlı hareket ederler.

Bir mL eritrosit numunesinin lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidroliz ve saponifikasyon işlemleri sonucu elde edilen, lipid numuneleri ve alkil ve alkenil gliserolipid standartları TLC yöntemi ile ayrıldı. Kromatografik ayırım işlemi için sabit faz olarak 20×20 cm silika jel G kaplı cam plakalar, hareketli faz olarak kloroform/metanol/asetik asit (98:2:1; v/v/v) kullanıldı (98). Aynı hareketli fazda yürütme işlemi 2 kez tekrarlanarak hazırlanan lipid numunelerinin içerisindeki alkil ve alkenil gliserolipid bantlarının birbirinden tamamen ayrılması sağlandı.

### **3.5.1. İnce Tabaka Kromatografisi Plakalarının Analize Hazırlanması**

Kullanılacak 20×20 cm'lik TLC plakaları, 110 °C' de etüv içine düz bir şekilde yerleştirildi ve 1 saat süre ile aktive edildi. Aktive edilen plakaların her birine numunelerin ve standartların uygulanacağı noktalar kurşun kalem ve cetvel kullanılarak belirlendi. Her bir plakanın alt kenarından 2 cm yükseklik işaretlendi. Hareketli fazın yürüme mesafesi için ise plakanın alt kenarından itibaren 18 cm yükseklik işaretlendi. Plakaların alt kenarından 2 cm'lik ve sol kenarından 2 cm'lik noktasının kesiştiği noktadan başlanarak 2.5 cm mesafelerle plakanın sağ kenarından 3 cm boşluk kalana kadar numune ve standartların uygulanacağı noktalar kurşun kalemle hafifçe işaretlendi. Böylece her bir plakada numunelerin uygulanacağı 7 nokta işaretlendi. İşaretli noktaların birincisine genellikle alkil gliserolipid standardı uygulandı. Kalan 6 noktaya her bir numune iki tekrarlı olacak şekilde 3 ayrı numune uygulandı. Her bir plakada bir standart, bir hasta grubu, iki kontrol grubu numunesi veya bir standart, iki hasta, bir kontrol grubu numunesi uygulandı. Uygulanan her numunenin ismi numune uygulanan noktanın tam karşılığına denk gelecek şekilde plakanın üst tarafına yazıldı. Her bir plakanın sol üst köşesine bir plaka numarası verildi. Her bir plakaya uygulanan numunelerin isimleri ve sıraları bir deftere kaydedildi. Şekil 3.1'de TLC plakalarının analize hazırlanması şematize edilmiştir.



**Şekil 3. 1.** TLC plağının analiz öncesi numune uygulama noktalarının belirlenmesi

### 3.5.2. Numunelerin ve Standartların İnce Tabaka Kromatografi Plakasına Uygulanması

Standartların ve numunelerin uygulanmasında 5  $\mu\text{L}$ ' lik mikropipet kullanıldı. Standart, 5  $\mu\text{L}$  4 damla toplamda 20  $\mu\text{L}$ , numuneler ise, 5  $\mu\text{L}$ 'lik 4 damla toplamda 20  $\mu\text{L}$  ve 5  $\mu\text{L}$ 'lik 6 damla toplamda 30  $\mu\text{L}$  olarak iki tekrarlı uygulandı. Uygulama işlemi sırasında sıcak hava üfleyen bir saç kurutma makinesi açılarak uygulanan numunelerin içerisindeki çözücünün tamamen uçması sağlandı. Uygulama sırasında uygulanacak numunenin plakaya uygulanmadan önce uçmasını önlemek amacıyla numune damlatma sırasında saç kurutma makinesinin yönü plakanın tersi yöne çevrildi. Numune damlatıldıktan hemen sonra saç kurutma makinesinin yönü plakaya çevrildi. Plakaya damlatılan her bir damla tamamen uçurulduktan sonra yeni bir damla damlatıldı. Uygulama aşamasında ve diğer aşamalarda hiçbir plakaya el ile temas edilmedi. Plakalar yanlarından desteklenerek veya numune uygulanmayan en üst kenarından tutularak taşındı.



### 3.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi Plakalarının Yürütme İşlemi

**Hareketli Fazın Hazırlanışı:** Yürütme işlemi için hareketli faz olarak kloroform/metanol/asetik asit (98:2:1; v/v/v) kullanıldı. Numunelerin uygulandığı plakalar, yürütme tankı içinde tabandan itibaren 0.5 cm'lik kısmı hareketli faz içinde olması gerektiğinden, tankın tabanından itibaren 1 cm'lik yüksekliğe denk gelen kısım bir çizgi ile işaretlendi. Bu çizgiye denk gelen miktarda hareketli faz tanka döküldü. Bu miktar 71 mL olarak belirlendi. Hareketli faz bu hacime oranlanarak hesaplandı ve bu oranlarda hazırlandı. Hareketli faz her bir uygulamadan önce taze olarak hazırlandı.

**Yürütme İşlemi:** Standart ve numunelerin yürütme işlemi, iki oluklu kapaklı yürütme tankında (Twin Through Chamber) yapıldı. Yürütme tankı her kullanımdan önce içi yıkandı distile sudan geçirilerek kağıt havlu ile tamamen kurutuldu. Hareketli fazdaki miktarı en fazla olan çözücü (kloroform) ile birkaç kez çalkalandı. Çalkalanan çözücü tamamen uçurulduktan sonra taze hazırlanmış hareketli faz (71 mL) plaka tanka konulmadan 60 dk önce tankın içine eklendi. Tankın kapağı kapatılıp çözücü tamamen karışana kadar çalkalandı. Yürütme tankının tabanına uygun boyutlarda, süzgeç kağıtları katlanarak hazırlandı. Hazırlanan bu süzgeç kağıtları tankın alt kısmına yerleştirildikten sonra tankın kapağı kapatıldı. Süzgeç kağıdı hareketli fazla tamamen ıslanana kadar yürütme tankı çalkalandı. Bu şekilde tankın içinin çözücü buharı ile tamamen doyması sağlandı. Daha sonra yürütme tankı düz bir zemine yerleştirildi ve 30 derecelik bir açıyla eğilerek hareketli fazın iki oluğa eşit olarak dağılması sağlandı. Numunelerin uygulandığı plakalar, yürütme tankı içine tabandan itibaren 0.5 cm'lik kısmı çözücü içinde kalacak şekilde ve dik olarak yerleştirildi. Yürütme tankı içinde 1. yürütme işlemi, plaka üzerinde hareketli faz başlangıç noktasından itibaren 18 cm yüksekliğe gelene kadar devam ettirildi. Hareketli faz 18 cm mesafeye gelince plaka tanktan çıkarıldı 1.5 metre mesafeden tutulan sıcak hava üfleyen saç kurutma makinesi ile 20 dk boyunca kurutuldu. Hareketli fazın plakadan tamamen uzaklaştırılabilmesi için kurutma işlemi 20 dk süreyle aralıksız olarak yapıldı. Hareketli fazın kokusunun plaka üzerinden tamamen uzaklaştırıldığından emin olunduktan sonra 2. yürütme işlemine geçildi. Yürütme tankı içindeki hareketli faz iyice çalkalandıktan sonra kurutulan plaka tankın içerisine aynı şekilde yeniden yerleştirildi. Yürütme işlemi hareketli faz başlangıç noktasından itibaren 18 cm yüksekliğe gelene kadar devam ettirildi. Yürütme sonunda plaka tanktan çıkarıldı 1.5 metre mesafeden tutulan sıcak hava üfleyen saç kurutma makinesi ile 20 dk boyunca kurutuldu. Çözücü kokusunun plaka üzerinden

tamamen uzaklaştırıldığından emin olunduktan sonra boyama işlemine geçildi. Çalışma boyunca her çalışmada tankın içerisine bir plaka konuldu. Her bir yürütme işlemi yaklaşık 50 dk sürdü.

#### **3.5.4. Lipid Bantlarının Boyanması**

**Spreyin Hazırlanışı:** %85'lik fosforik asitten 9.4 mL alınıp üzerine 90.6 mL distile su eklenerek %8'lik fosforik asit elde edildi. 15.6 gr bakır II sülfat-penta hidrat tartıldı ve 100 mL %8'lik fosforik asit içerisinde çözülerek %10'luk (w/v) bakır II sülfat çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde cam bir şişenin içerisinde saklandı.

**Boyama İşlemi:** Yürütme işlemi biten ve kurutulan plakalara hazırlanan %10'luk bakır II sülfat çözeltisi bir sprej şişesine eklenerek plakalar boyandı. Boyama işlemi sırasında plakalar, 30 derecelik bir açıyla düz bir zemin üzerine yerleştirildi. Boya, plakalara dik ve 50 cm mesafeden yukardan aşağıya doğru inerek ve soldan sağa doğru çeker ocak içerisinde püskürtüldü. Yürütme işleminin gerçekleştiği alanın tamamı boyandı ve plaka üzerinde homojen, açık mavi renkte bir görüntü elde edildi. Boyama işlemi biten plakalar, önceden 180 °C dereceye getirilmiş etüv içerisinde düz bir şekilde yerleştirildi. Plaka üzerinde lipid bantları belirginleşince plakalar etüvden çıkarıldı. Her bir plaka yaklaşık 20 dk süre ile etüv içerisinde bekletildi.

Çalışma boyunca hareketli fazın hazırlanması, yürütme işlemi, kurutma işlemi ve boyama işlemlerinin tamamı, oda ısısında ve çeker ocak içinde yapıldı.

#### **3.5.5. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipid Bantlarının Fotodansitometrik Yoğunluk Analizi**

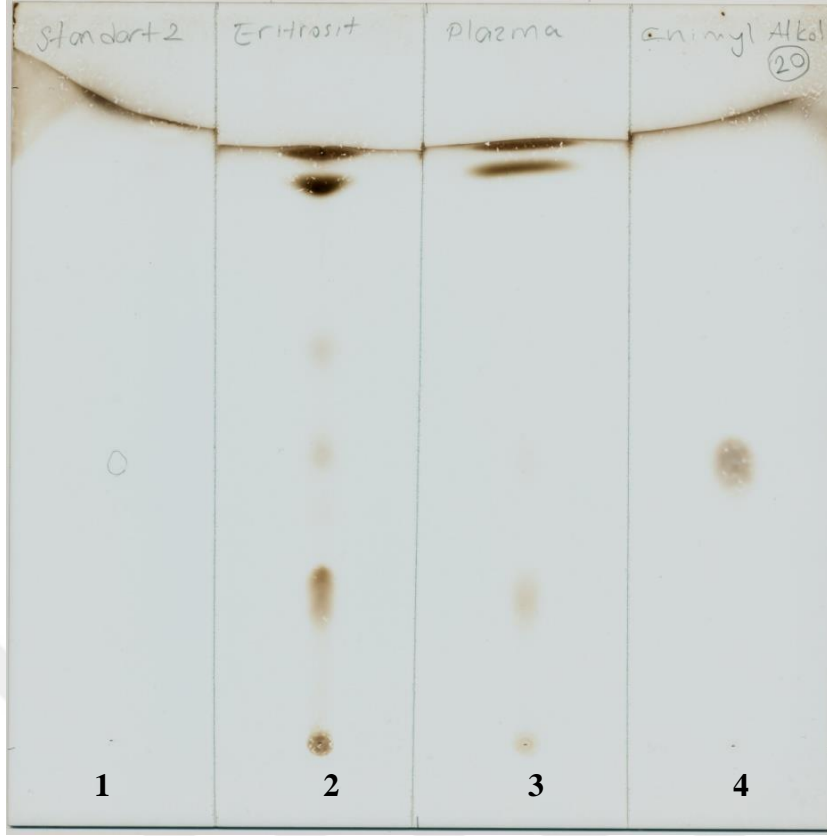
Bir mL eritrosit süspansiyonunun lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidrolizi ve açıl gruplarının saponifikasyonu sonucu hazırlanan numuneler TLC ile ayrıldıktan sonra (SYNGENE Genetools yazılımı) fotodansitometrik olarak yoğunluk/miktar tayini yapıldı. Yöntem bilgisayar ortamına aktarılmış olan görüntü üzerindeki seçilmiş bir noktanın (lipid bantının) koyuluğuna veya açıklığına göre bir sayısal bir değer oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu sayısal değer seçilen lipid bantının yoğunluğuna göre artıp azalmaktadır. Seçilen noktanın koyuluğu artıkça oluşan sayısal değer artmakta seçilen noktanın koyuluğu azaldıkça da bu değer azalmaktadır.

TLC ile ayrılıp boyama sonucu görünür hale gelen lipidlerin olduğu plakalar tarayıcı (Canon 5600F) ile tarandı. Taranan plakalar TIFF dosyası formatında bilgisayar ortamına kaydedildi. Kaydedilen görüntülerden plakalar üzerindeki her bir lipid

bantının yoğunluk/miktar tayini yapıldı. Analiz Tipi 'Automatic Band Quantification' (Otomatik Bant Yoğunluk/Kantitasyon) olarak seçildi. Background Correction işlemi Automatic (Otomatik Arka plan) olarak seçildi. Böylece miktarı saptanacak her lipid bantına ait alan otomatik olarak seçildi. Seçilen her bir bant için bir bant yoğunluğu değeri (Raw Volume) oluştu. TLC ile ayrılmış olan her bir bireye ait (hasta ve kontrol grubu) alkil ve alkenil gliserolipid bantlarına denk gelen bant yoğunluğu değerleri birbirine bölünerek alkil/alkenil gliserolipid oranları hesaplandı. Yine her bir bireye ait alkil ve alkenil gliserolipid bantlarına denk gelen bant yoğunluğu değerleri toplanıp toplamdaki her bir bireye ait alkil ve alkenil gliserolipid yüzdeleri hesaplandı. TLC'ye iki tekrarlı olarak uygulanmış aynı bireye ait numunelerin bant yoğunluğu değerlerinin ortalaması alınarak oran ve yüzde hesaplamaları yapıldı.

### **3.6. Eritrosit ve Plazma Numunelerinin Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerinin İnce Tabaka Kromatografi İle Ayrımı**

Lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidroliz ve açıl gruplarının saponifikasyonu yapılan eritrosit ve plazma numuneleri TLC ile ayrıldı (Şekil 3.2.). Eritrosit numunelerinde belirgin ve yoğun bantlar gözlenirken, plazma numunelerinde belirgin ve yoğun bantlar gözlemlenemediğinden çalışmada kontrol ve hasta gruplarına ait eritrosit numuneleri kullanıldı.



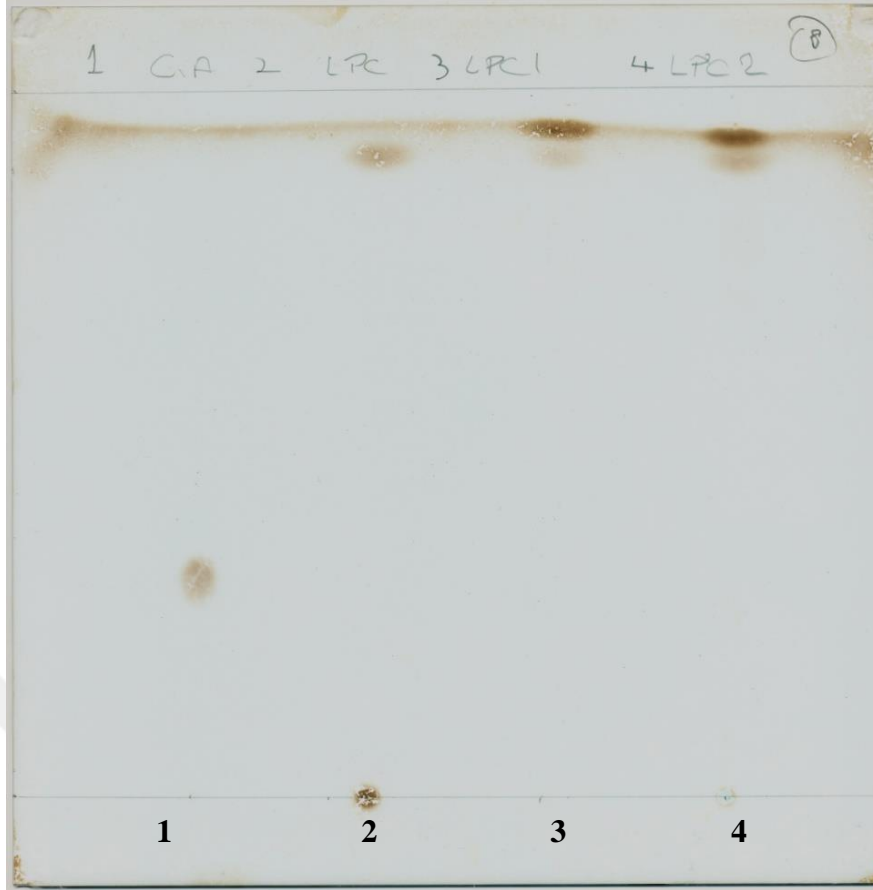
**Şekil 3. 2.** Eritrosit ve plazma numunelerinin alkil ve alkenil gliserolipidlerin TLC ayırımının karşılaştırılmasına ait ince tabaka kromatogramı.

1: Alkenil gliserolipid standartı, 2: Eritrosit numunesi, 3: Plazma numunesi, 4: Alkil gliserolipid standartı

### **3.7. Standartların İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı**

#### **3.7.1. Alkil ve Alkenil Gliserolipid Standartlarının İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı**

Alkil gliserolipid standartı, alkenil gliserofosfolipid standartı (LPC), hidrolize alkenil gliserolipid (LPC1), ve hidrolize ve saponifiye alkenil gliserolipid (LPC2) TLC ile ayrıldı. Standartların TLC plakası üzerindeki ayırımında alkil gliserolipid standartı tek bir bant halinde gözlenirken alkenil gliserolipid standartının üç formu iki ayrı bant halinde gözlemlendi (Şekil 3.3.).

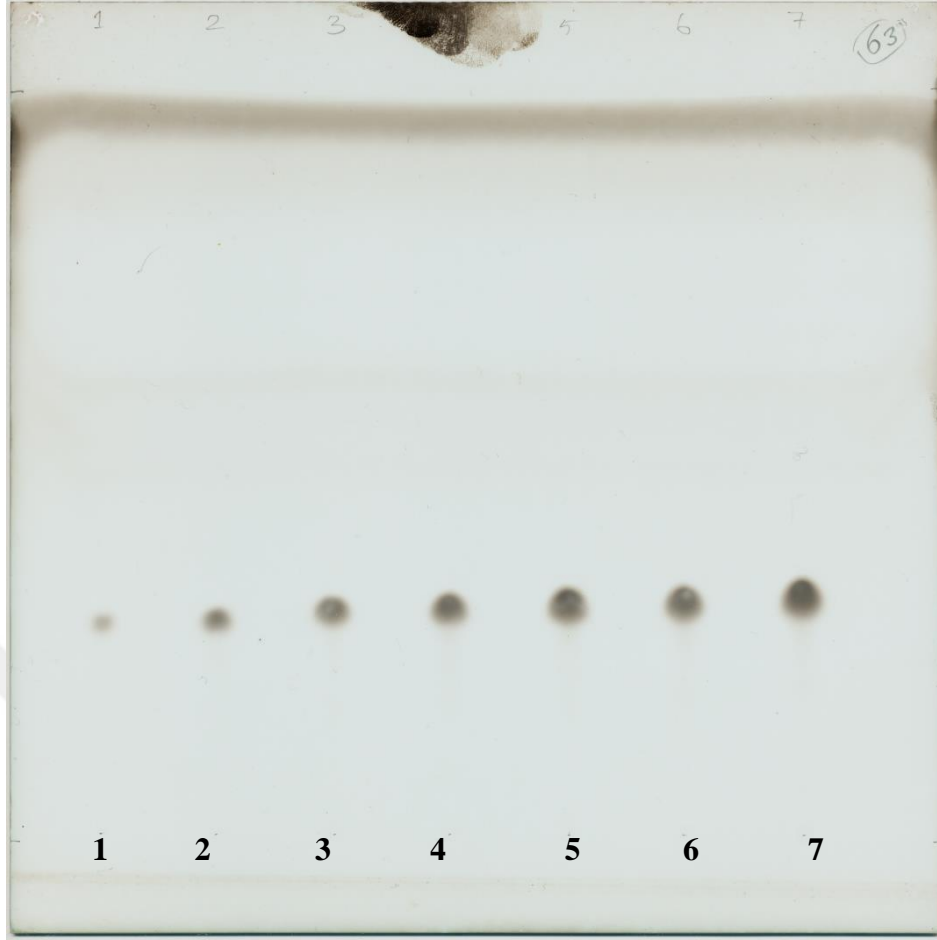


**Şekil 3. 3.** Alkil gliserolipid ve alkenil gliserolipidin üç şekildeki TLC kromatogramı

1: Alkil gliserolipid standartı), 2. LPC (alkenil gliserolipid standartı hiçbir işlem yapılmayan  
3: LPC1 (fosfolipaz-C ile hidrolizi yapılan), 4: LPC2 (fosfolipaz-C ile hidrolizi ve saponifikasyonu yapılan)

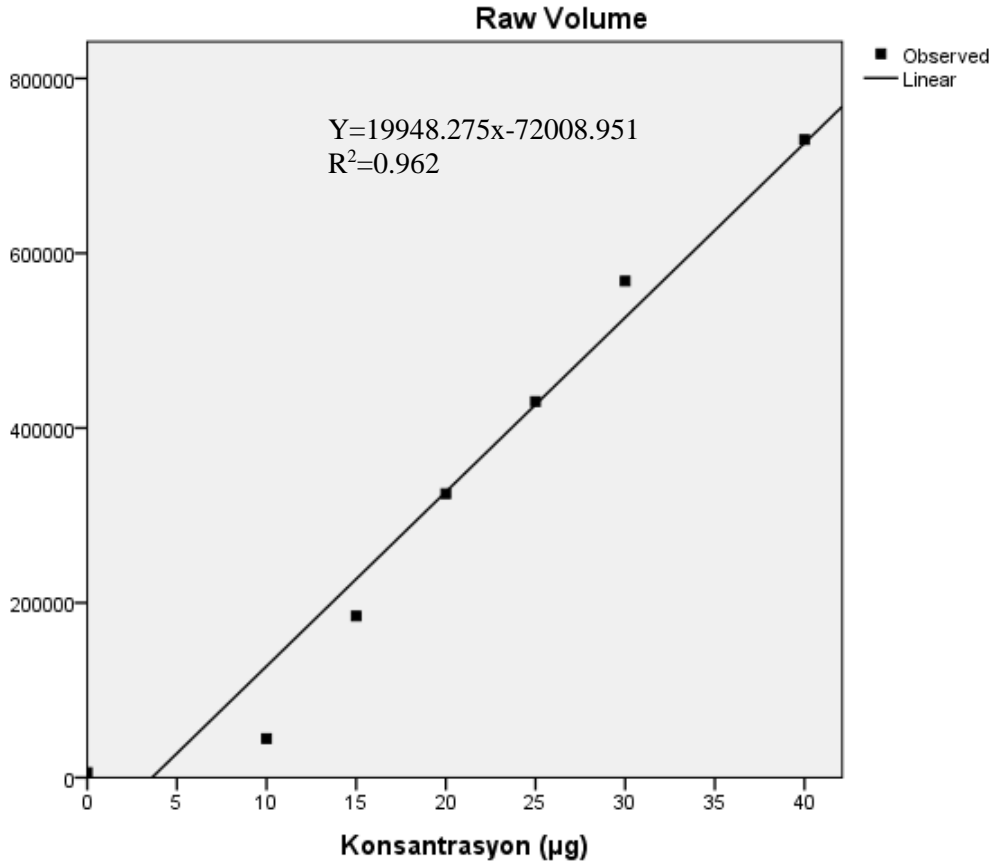
### **3.7.2. Alkil Gliserolipid Standartının İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrımı**

Alkil gliserolipid standartının  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\mu\text{g}$ ) alınarak TLC ile ayrıldı (Şekil 3.4.). Yürütme işlemi biten plaka tarayıcı ile tarandı. Fotodansitometrik olarak bant yoğunlukları belirlendi. Plakanın numune olmayan boş alanından (Background) bantlar alınarak bu değerlerin ortalaması kör olarak kullanıldı. Hesaplanan kör değeri her bir banta ait bant yoğunluğu değerinden çıkarıldı.



**Şekil 3. 4.** Alkil gliserolipid standartına ait TLC kromatogramı. Konsantrasyonlar 1'den 7'ye sırasıyla 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\mu\text{g}$ 'dır.

Alkil gliserolipid standartının  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\mu\text{g}$ ) TLC ile ayrıldı. Fotodansitometrik analiz sonucu oluşan bant yoğunluğu değerlerinden yararlanılarak konsantrasyona karşı bant yoğunluğu değeri kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.5.). Hazırlanan kalibrasyon eğrisi denkleminde yararlanılarak 1 mL eritrosit süspansiyonu içerisindeki alkil ve alkenil gliserolipid miktarları hesaplandı.



**Şekil 3. 5.** Alkil gliserolipid standartının fotodansitometrik yoğunluk konsantrasyon eğrisi

### 3.7.3. Alkil Gliserolipid Standartı ve Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipid Bantlarının $R_f$ Değerlerinin Hesaplanması

Bir mL eritrosit süspansiyonunun lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-c ile hidrolizi ve açıl gruplarının saponifikasyonu işlemleri yapılan numuneler ve alkil gliserolipid standartı TLC ile ayrıldı. Boyama işlemi sonucu görünür hale gelen lipid bantlarından kontrol ve hasta grubu alkil, alkenil gliserolipid ve alkil gliserolipid standartının  $R_f$  değerleri hesaplandı. Her bir lipid bantının kat ettiği mesafe ve hareketli fazın yürüme mesafesi plakanın alt kenarından başlanarak ölçüldü. Her bir bantının başlangıç noktasına uzaklığı hareketli fazın yürüme mesafesine bölünerek her bir banta ait  $R_f$  değerleri hesaplandı (Tablo 3.1. ).

**Tablo 3. 1.** Alkil gliserolipid standartı ve kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipidlerin *R<sub>f</sub>* değerleri

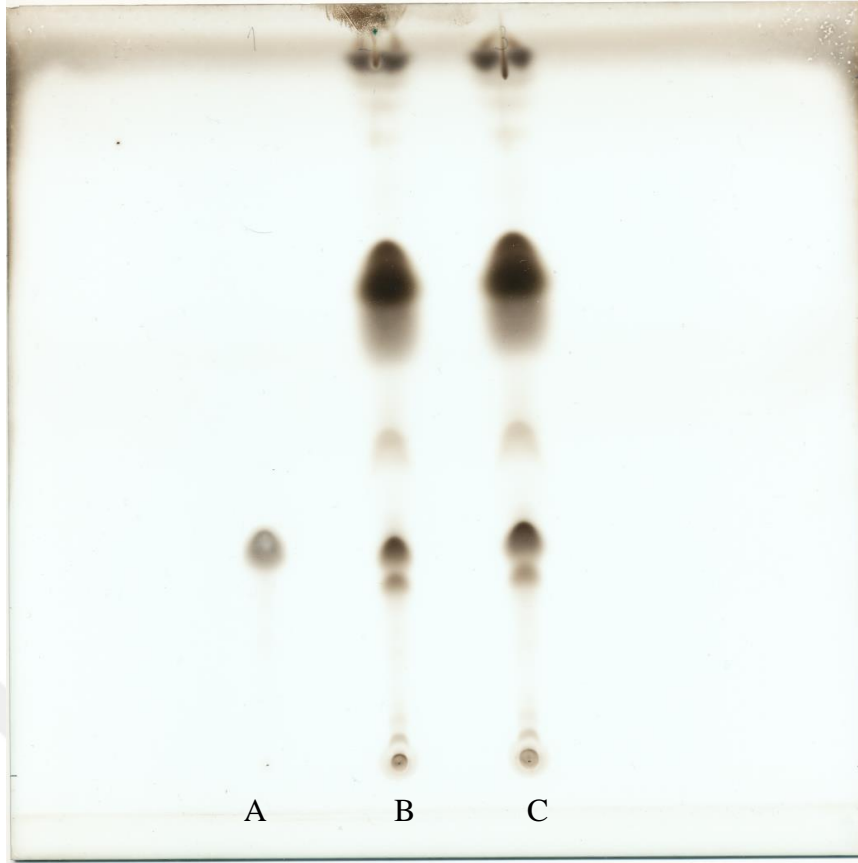
		<i>R<sub>f</sub></i> değeri
<b>Standart</b>	Alkil gliserolipid	0.43 ±0.01
<b>Kontrol grubu</b>	Açıl gliserolipid(?)	0.39 ±0.02
	Alkil gliserolipid	0.43±0.02
	Alkenil gliserolipid	0.48 ±0.01
<b>Hasta grubu</b>	Açıl gliserolipid(?)	0.39±0.01
	Alkil gliserolipid	0.44±0.01
	Alkenil gliserolipid	0.48±0.01

*R<sub>f</sub>*: TLC plakası üzerinde numunenin aldığı mesafenin hareketli fazın aldığı mesafeye oranıdır.

### 3.8. Alkil Gliserolipid Standartı ve Eritrosit Numunelerinin Alkil Gliserolipid Bantlarının Doğrulanması

TLC plakasında A, B ve C olarak 3 tane numune uygulama noktası belirlendi. Plakanın A bölümüne alkil gliserolipid standartının 4µg/µL (25 kat sulandırılmış) çözeltisinden 10 µL, B bölümüne eritrosit lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidroliz ve saponifikasyon işlemleri yapılan eritrosit numunesinden 20 µL uygulandı. C bölümüne ise 20 µL eritrosit numunesi ve 5 µL alkil gliserolipid standartı karıştırılarak TLC plakasına uygulandı. Uygulama sonucu plaka boyanarak lipid bantları görünür hale getirildi. Sonuçta C bölümünde alkil gliserolipid bantlarının üst üste gelerek yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 3.6.). Standart ve numune bantlarının üst üste gelerek yoğunlaşması numune içerisinde alkil gliserolipitin varlığını doğrulamaktadır.





**Şekil 3. 6.** Alkil gliserolipid standartı ve eritrosit numuneleri alkil gliserolipid bantlarının üst üste çakışmasına ait ince tabaka kromatogramı

A: alkil gliserolipid standartı, B: eritrosit numunesi, C: Alkil gliserolipid ve eritrosit numunesi karışımı

### **3. 9. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerinin İnce Tabaka Kromatografik ve Spektrofotometrik Analiz ile Doğrulanması**

Eter lipidlerin spektrofotometrik olarak analizi; alkil gliserollerin periodat oksidasyonu ve alkenil gliserollerin asit hidrolizinden sonra oluşan aldehitlerin fuksin reaktifi ile renkli kompleks oluşturmaları esasına dayanmaktadır (96). Periodat oksidasyonu ile alkil ve alkenil gliserolipidler tepkime verirken, asit hidrolizi ile sadece alkenil gliserolipidler tepkime verir. Açıl gliserolipidler ise periodat oksidasyonu ve asit hidroliz tepkimelerinin ikisiyle de tepkime vermez.

#### **3.9.1. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipidlerinin Periodat Oksidasyonu ve Asit Hidrolizi**

**Sodyum metaperiodat ile doyrulmuş %90'lık asetik asit hazırlanışı:** %96'lık asetik asitten 6 ml alınıp üzerine 90 ml distile su eklenerek %90'lık asetik asit hazırlandı. 1.5 gr sodyum metaperidat tartıldı Cam bir tüpe alınarak üzerine 8 mL

%90'lık asetik asit eklendi ve 1 dk vortekslendi. Hazırlanan çözelti oda ısısında ışık almayacak şekilde saklandı. Çözelti her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.

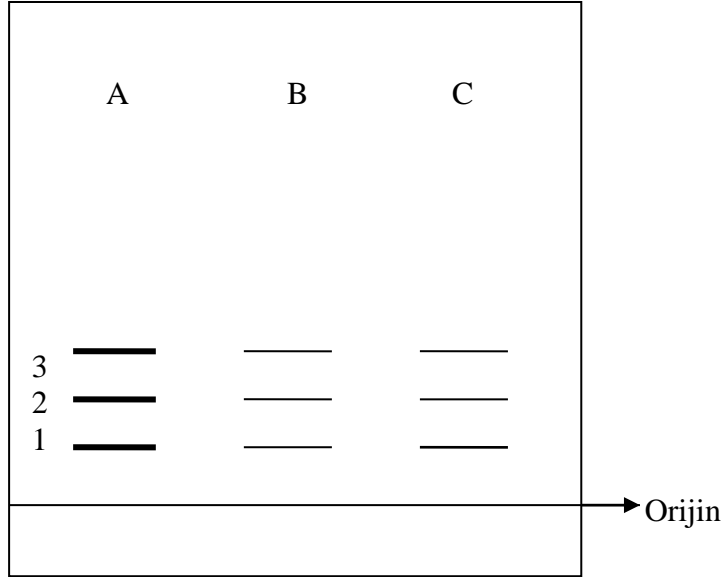
**%90'lık asetik asitte 0.5 M HCl hazırlanışı:** stok konsantrasyonu 12,48 M olan HCl'den 10.01 mL alındı %90'lık asetik asitle 250 mL'ye tamamlandı.

**Fuksin ayracı hazırlanışı:** 1 gr basic fuksin 700 mL kaynayan distile suda çözüldü. Soğutuldu ve filtre edildi. Üzerine 5 gr sodyum metabisülfid ve 100 mL 1M HCl eklenip karıştırıldı. Son hacim distile suyla 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti ışık almayacak şekilde cam şişeye alındı ve +4 °C saklandı. Çözelti her kullanımdan önce oda ısısına getirilerek kullanıldı.

**Sülfid su hazırlanışı:** 0.5 gr sodyum metabisülfid tartıldı üzerine 100 mL 0.1M HCl içinde çözüldü. Oda ısısında saklandı.

**Ekstraksiyon solventi:** n-bütanol/toluen/metanol (2:2:1; v/v/v) oranlarında hazırlandı. Oda ısısında kullanımdan önce taze hazırlandı.

TLC plağında A, B ve C şeklinde üç numune uygulama noktası belirlendi. Bu noktaların her birine (eritrosit lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidroliz ve açıl gruplarının saponifikasyonu işlemleri yapılan) aynı numune aynı miktarlarda uygulandı. TLC ile kloroform/metanol/asetik asit (98:2:1; v/v/v) hareketli fazında iki kez yürütme işlemi ile numuneler birbirinden ayrıldı. TLC ile ayrılmış olan numunelere ait bantlar aşağıdan yukarıya doğru 1, 2 ve 3 olarak numaralandırıldı ve plakaların 1/3'lik bölümü (A numunesi) boyandı, 2/3'lik bölümü (B ve C numuneleri) boyanmadı. Bu işlem için plakaların boyanmayacak bölümü cam bir levha ile kapatılarak boya ile teması engellendi. Şekil 3.7'de hazırlanan TLC plağı şematize edilmiştir. Plakanın boyanmış bölümdeki lipid bantları esas alınarak boyanmamış bölümdeki lipid bantları ayrı ayrı kazındı. Boyanmamış bölümdeki numunelerden B numunesi B1, B2 ve B3 ve C numunesi C1, C2 ve C3 şeklinde kodlandı. B ve C kodlu numunelerin 1, 2 ve 3 nolu bantları plakadan bistüri ile kazındı ve ayrı ayrı tüplere alındı. Kazınan her bir numune üzerine 2 mL kloroform/metanol (4:1-v/v) eklendi ve 3 dk vortekslendi. Vortekslenen tüpler 4000 rpm de 7 dk boyunca 22 °C santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst faz 10 x 1.5 cam bir tüpe alındı. Alt faz üzerine yeniden 2 mL kloroform/metanol (4:1-v/v) eklenerek aynı işlemler yapıldı. Ayrılan fazlar Azot gazı altında uçuruldu. Uçurulan B1, B2 ve B3 numunelerine periodat oksidasyonu, C1, C2 ve C3 numunelerine asit hidrolizi uygulandı.



**Şekil 3. 7.** Periodat oksidasyonu ve asit hidrolizi TLC plağı şeması

Plakanı A bölümü boyandı (koyu bantlar), B ve C bölümü boyanmadı. B bölümündeki bantların ayrı ayrı tüplere alınarak tamamına periodat oksidasyonu, C bölümündeki bantların ayrı ayrı alınarak tamamına asit hidrolizi işlemleri yapıldı.

Periodat oksidasyonu için plakadan kazınan B1, B2 ve B3 nolu numuneleri üzerine 0.5 mL sodyum metaperiodat ile doyurulmuş %90'lık asetik asit eklendi. Asit hidrolizi yapılacak C1, C2 ve C3 no'lu numuneler üzerine ise 0.5 mL %90'lık asetik asitte hazırlanmış 0.5 M HCl eklendi. Hazırlanan tüpler kapakları kapatılıp 1 dk vortekslendikten sonra 45 dk 50 °C su banyosunda tutuldu. Süre sonunda tüpler çıkarıldı oda ısısına gelene kadar soğutulduktan sonra her bir tüpe 2 mL fuksin ayracı eklendi. Tüpler vortekslendi 30 dk oda ısısında bekletildi. Süre sonunda tüplerin her birine 2 mL sülfite su ve 5 mL ekstraksiyon solventi eklendi ve 1 dk vortekslendi. Vortekslenen tüpler 4000 rpm'de 7 dk boyunca santrifüj edildi. Üst faz ayrılarak alındı 565 nm de spektrofotometre ile absorbanslar ölçüldü. Absorbans değerlerine göre periodat oksidasyonu ile B2 (alkil gliserolipid) ve B3 (alkenil gliserolipid) bantları yüksek absorbans değerleri verirken B1 (açıl) bantı köre yakın absorbans verdi (Tablo 3.2.). Asit hidrolizi ile ise sadece C3 (alkenil gliserolipid) bantı yüksek absorbans değerleri verdi. C1 (açıl gliserolipid) ve C2 (alkil gliserolipid) bantları köre yakın absorbans verdi.

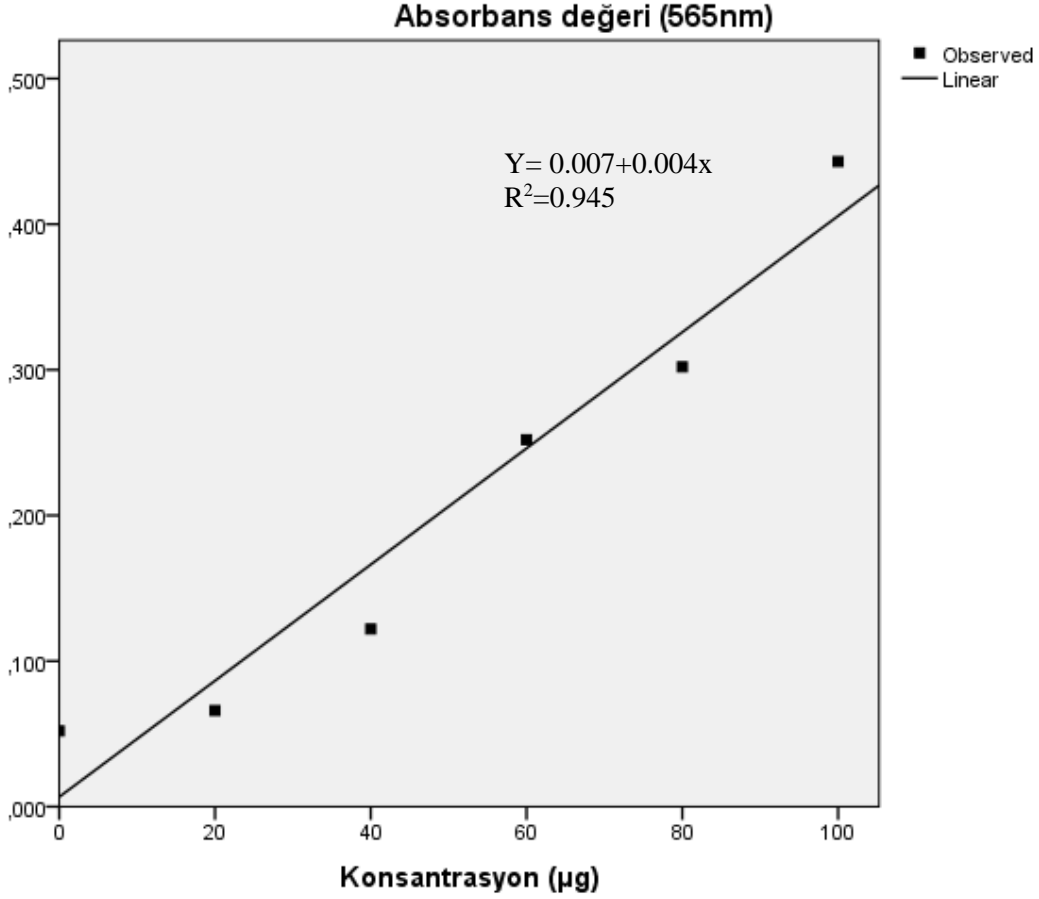
**Tablo 3. 2.** Eritrosit alkil ve alkenil gliserolipidlerin spektrofotometrik analizi.

		Absorbans Değerleri				
		K	K	H	H	H
<b>Periodat Oksidasyonu</b>	Kör	0.048	0.057	0.052	0.033	0.055
	B1 Açıl gliserolipid(?)	0.078	0.063	0.068	0.071	0.080
	B2 Alkil gliserolipid	0.177	0.288	0.230	0.293	0.129
	B3 Alkenil gliserolipid	0.111	0.129	0.164	0.130	0.121
<b>Asit Hidrolizi</b>	Kör	0.048	0.044	0.048	0.033	0.048
	C1 Açıl gliserolipid(?)	0.049	0.074	0.050	0.048	0.062
	C2 Alkil gliserolipid	0.069	0.073	0.084	0.050	0.088
	C3 Alkenil gliserolipid	0.091	0.115	0.153	0.160	0.136

Absorbans değerleri 565 nm’de okundu. K: kontrol grubu. H: hasta grubu. Periodat oksidasyonu alkil ve alkenil gliserolipidleri asit hidrolizi ise sadece alkenil gliserolipidleri ile tepkime verir. Açıl gliserolipidler ise periodat oksidasyonu ve asit hidrolizi tepkimelerinin her ikisiyle vermez.

### 3.9.2. Alkil Gliserolipid Standartının Periodat Oksidasyonu Sonucu Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Alkil gliserolipid standartının 4µg/µL çözeltilisinden farklı miktarlarda (40, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg) alınarak TLC ile ayrıldı. Hazırlanan plakanın yürütme işlemi bitince plakanın sadece birinci numunenin (40 µg) olduğu bölümü boyandı. Plaka 180 °C 10 dk boyunca etüvde kurutuldu. Böylece boyalı bölümdeki görünen bantlardan plakanın görünmeyen bantlarının yerleri belirlendi. Bantlar plakadan kazınıp ayrı ayrı tüplere alındı. Üzerlerine 5 ml kloroform/metanol (4:1-v/v) eklendi ve 3 dk (1'er dk aralıklı) vortekslendi. Sonrasında 4000 rpm’de 7 dk boyunca santrifüj edildi. Üst faz alındı azot gazı altında uçuruldu. Ve periodat oksidasyonu işlemleri yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. 565 nm’de absorbanslar ölçüldü. Konsantrasyona karşı absorbans eğrisi çizildi (Şekil.3.7.).



Şekil 3. 8. Alkil gliserolipid standartının periodat oksidasyonu sonucu kalibrasyon eğrisi

### 3.10. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) program kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılıma uyan veriler ortalama ve standart sapma ile özetlendi, karşılaştırmalarda bağımsız gruplarda t testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan veriler medyan, minimum ve maksimum değerler ile sunuldu ve karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi uygulandı. Kategorik veriler sayı ve yüzde ile gösterildi ve gruplar süreklilik düzeltilmeli ki-kare testi ile karşılaştırıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

Fotodansitometrik analiz sonucu elde edilen bant yoğunluğu değerlerinden kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid oran ve yüzdelere hesaplanmasında Microsoft Office Excel 2007 programı kullanıldı.

## 4. BULGULAR

Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olan ve uyku bozukluğu olmayan iki grubun eritrosit numunelerinin eter gliserolipidleri (alkil ve alkenil gliserolipid) TLC ile ayrılıp fotodansitometrik analizler ile alkil/alkenil gliserolipid oranları ve yüzdeleri tespit edildi.

### 4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Bazı Özelliklerin Karşılaştırılması

Çalışmaya uyku bozukluğu olmayan 30 kontrol grubu ve Uyku Laboratuvarında tek gece polisomnografi tetkiki sonucu Obstrüktif Uyku Apne Sendromu (Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu) tanısı konulan 30 hasta alındı. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanısında hastalar apne hipopne indeksi (AHI) değerlerine göre hafif (5-15), orta (16-30) ve ağır (>30) uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olarak üç grupta sınıflandırıldı ve AHI>5 olan hastalar çalışmaya dahil edildi. AHI uyku süresince görülen apne ve hipopnelerin her saat başına düşen sayısıdır.

Kontrol ve hasta grubuna ait cinsiyet, yaşı, beden kitle indeksi (BKİ), sigara, ilaç kullanımı ve hasta grubu AHI değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 4.1.). Çalışmaya katılan kontrol ve hasta grubuna ait özellikler karşılaştırıldığında cinsiyet bakımından hasta grubunda erkeklerin sayısı daha fazlaydı. Kontrol grubunda ise kadınların sayısı daha fazlaydı (Tablo 4.1.). Her iki grupta sigara kullanan ve kullanmayanların oranı birbirine yakın bulundu. Kontrol grubunda ilaç kullanan yok iken hasta grubunda ilaç kullanan ve kullanmayanların sayısı birbirine eşitti. İlaç kullananların ek hastalıklarına bakıldığında 7'si hipertansiyon, 7'si diyabetes mellitus, 4'ü tiroid, 1 kişi koroner arter hastası, 4'ü hem hipertansiyon hem diyabetes mellitus şeklindeydi. Yaş ortalamalarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.001$ ) ve hasta grubunda bulunanlar 10 yaş daha büyük olduğu belirlendi. Beden Kitle İndeksi (BKİ) değerlerine göre hasta grubunun BKİ değerleri kontrol grubuna göre  $8 \text{ kg/m}^2$  daha yüksekti ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p<0.001$ ). Bu farklılığın sebebi hasta grubundaki kişilerin daha kilolu olması ve uyku bozukluğu şikayeti olması ile ilişkili olabilir. Hasta grubu AHI ortalaması yüksek bulundu. AHI değerlerine göre hastaların 1'i hafif, 11'i orta ve 18'i ağır uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanısı almıştır. Orta ve ağır uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu tanılı hastaların fazla olması AHI ortalamasını yükseltmiştir.

**Tablo 4. 1.** Hasta ve kontrol grubuna ait bazı özellikler

		Kontrol Grubu		Hasta Grubu		
		N	%	N	%	<i>p</i>
<b>Cinsiyet</b>	Kadın	18	60.0%	8	43.3%	0.019*
	Erkek	12	40.0%	22	56.7%	
<b>Sigara</b>	Kullanan	10	33.3%	9	30.0%	=1.000*
	Kullanmayan	20	66.7%	21	70.0%	
<b>İlaç</b>	Kullanan	-	0.0%	15	50.0%	<0.001*
	Kullanmayan	30	100.0%	15	50.0%	
		Ortalama ± SD		Ortalama ± SD		
<b>Yaş</b>		30	36.20±7	30	49.70 ± 7.8	<0.001**
<b>BKİ</b>		30	24.71 ± 3.44	30	32.38 ± 6.05	<0.001**
<b>AHI</b>		-	-	30	42.157 ± 20.58	-

BKİ: Beden Kitle İndeksi, AHI: Apne-Hipopne İndeksi, SD: Standart sapma, Kategorik veriler sayı ve yüzde ile normal dağılım gösteren veriler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.

\*Süreklilik düzeltilmeli ki-kare testi

\*\* Bağımsız gruplarda t testi

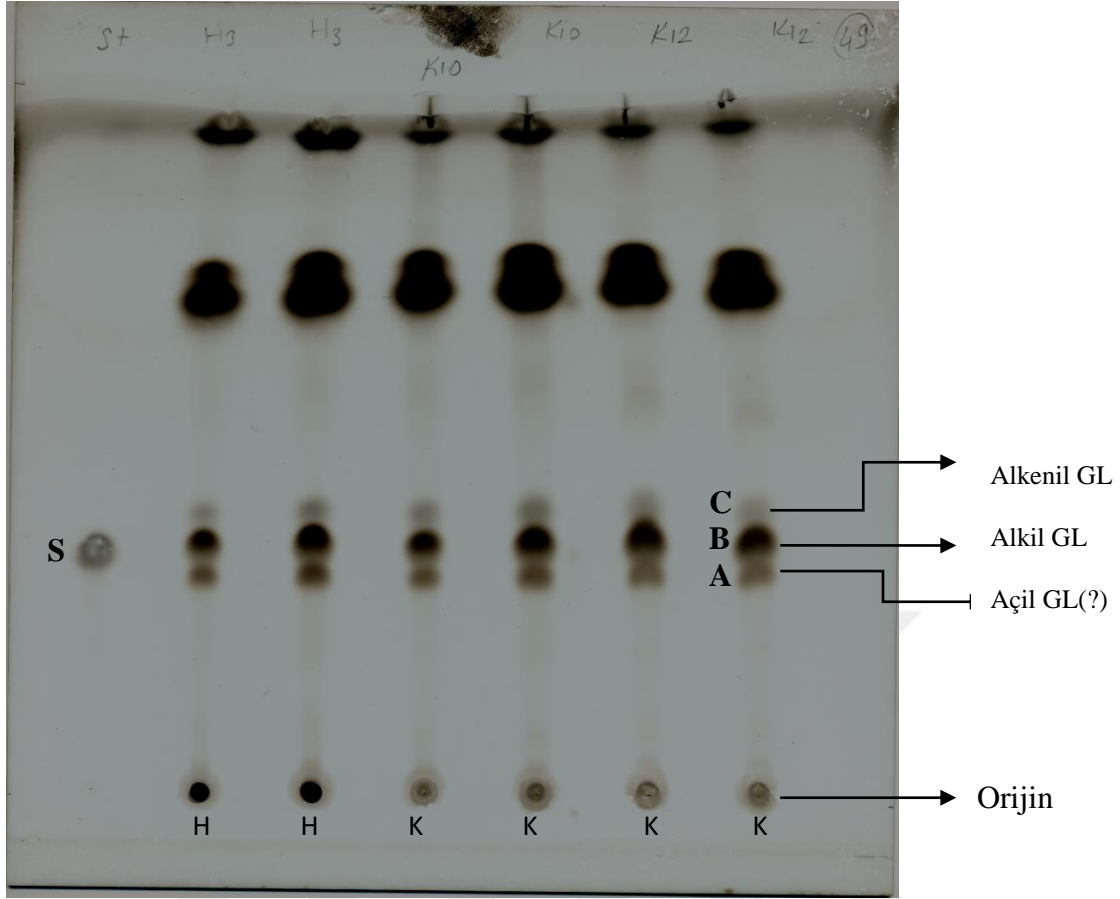
$p < 0.05$

#### 4.2. Kontrol ve Hasta Grubu Eritrosit Alkil /Alkenil Gliserolipid Oranları

Kontrol ve hasta grubunda her bir bireye ait 1 mL eritrosit süspansiyonunun lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidrolizi ve açıl gruplarının saponifikasyonu işlemleri ile hazırlanan numuneler TLC'ye uygulandı. TLC sonucu ayrılan numuneler boyanarak görünür hale getirildi (Şekil 4.1.). TLC plakası üzerinde görünür hale gelen lipid bantları aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla açıl(?) gliserolipid, alkil gliserolipid ve alkenil gliserolipid olarak tanımlandı. Lipid bantlarının tanımlaması, ticari olarak satın alınmış standartlar ve spektrofotometrik yöntemler ile yapıldı. TLC plakası üzerindeki lipid bantlarından alkil gliserolipid standardı (S) (1-O-heksadesil-sn-gliserol) ile aynı hızda olan ve aynı Rf değerlerine denk gelen bant (B) alkil gliserolipid olarak tanımlandı (Şekil 4.1.). Alkenil gliserolipid tanımlamasında ise öncelikle ticari olarak satın alınmış olan alkenil gliserofosfolipid standardı (1-O-1'-(Z)-heksadesenil-2-hidroksi-sn-gliserol-3-fosfokolin) kullanıldı. Ancak alkenil gliserolipid standardı sn-3 pozisyonunda bir fosfaditilkolin içerdiğinden standart fosfolipaz-C ile hidrolizi edildi. Yine aynı standart hidrolizi takiben açıl gruplarının saponifikasyonu işlemi yapıldı. Hazırlanan üç şekildeki standart (standart, hidrolize standart ve saponifiye standart) TLC ile ayrıldı. Ancak ayırmada üç şekildeki standartta TLC plakası üzerinde

muhtemelen farklı izomerlerine ait iki farklı bant halinde gözlemlendi (Şekil 3.3.). Standartın iki bant halinde gözlenmesi lipid bantlarının doğru tanımlaması için uygun olmadığı kanaatine varıldı. Bu nedenle alkenil gliserolipid tanımlaması spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirildi. Spektrofotometrik yöntemde aynı numune üç tekrarlı olarak TLC'ye uygulandı. TLC ile ayrılmış olan lipid bantları plakadan ayrı ayrı kazınıp periodat oksidasyonu ve asit hidrolizi işlemleri yapıldı. Periodat oksidasyonu hem alkil hem de alkenil gliserolipidler ile tepkime verirken, alkenil gliserolipidler sadece asit hidrolizi ile tepkime vermektedir. Plakadan kazınmış olan bantlardan B ve onun üzerindeki C bantı periodat oksidasyonu ile yüksek absorbans değerleri verirken asit hidrolizi yapılan bantlardan sadece C bantı yüksek absorbans değeri verdi. Bunun sonucunda bu bant alkenil gliserolipid olarak tanımlandı. B ve C bantlarının altında yer alan A bantı için ise tanımlayacak standart temin edilemediğinden sağlıklı bir tanımlama yapılamadı. Ancak hem spektrofotometrik analiz sonucu tepkime vermemesi (köre yakın absorbans değerleri) hem de benzer literatürlere bakıldığında yakın Rf değerlerinin ve (77, 99). TLC plakası üzerindeki konumunun alkil ve alkenil gliserolipid bantlarına yakın olması sebebiyle açıl gliserolipid olabileceği kanaatine varıldı. Yapılan hesaplamalarda kesin olmasa da bu bant (A) açıl gliserolipid olarak değerlendirildi. Plaka üzerindeki diğer görünür lipid bantları ise değerlendirilmeye alınmadı.





**Şekil 4. 1.** TLC ile ayrılmış olan alkil gliserolipid standartı, kontrol ve hasta gruplarına ait eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid bantlarına ait kromatogram S: alkil gliserolipid standartı, A: açıl gliserolipid (?), B: alkil gliserolipid, C: alkenil gliserolipid. H: hasta grubu, K: kontrol grubu.

Kontrol ve hasta grubunda her bir bireye ait 1 mL eritrosit süspansiyonunun lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidrolizi ve açıl gruplarının saponifikasyonu işlemleri ile hazırlanan numuneler TLC'ye uygulandı. TLC sonucu ayrılan numuneler boyanarak görünür hale getirildi. TLC ile ayrılmış olup görünür hale gelen kontrol ve hasta grubu eritrosit numunelerinin alkil ve alkenil gliserolipid olarak tanımlanmış ve açıl gliserolipid olduğu düşünülen her bir lipid bantının fotodansitometrik (Syngene Genetools yazılımı) olarak yoğunluğu belirlendi. Kontrol ve hasta grubu eritrosit numunelerinden her bir bireye ait TLC plakası üzerindeki alkil ve alkenil gliserolipid olarak tanımlanmış ve açıl gliserolipid olduğu düşünülen lipid bantlarına denk gelen her bir bantının fotodansitometrik olarak yoğunluğuna göre bir sayısal değer tespit edildi (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8). Belirlenen bu değerlerden açıl, alkil ve alkenil gliserolipid bantlarına denk gelen sayısal değerlerinden alkil/alkenil, alkil/açıl ve alkenil/açıl oranları belirlendi (Tablo 4.2.). Ayrıca açıl, alkil ve alkenil gliserolipid bantlarına denk

gelen değerlerin toplamı alınıp toplamdan her bir kontrol ve hasta grubu eritrosit açıl(?), alkil ve alkenil gliserolipid yüzdeleri hesaplandı (Tablo 4.3.).

**Tablo 4. 2.** Fotodansitometrik yoğunluk analizi sonucu kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil, alkenil gliserolipid oranları

<b>Grup</b>					
<b>Kontrol (n=30)</b>			<b>Hasta (n=30)</b>		
<b>Alkil/Alkenil</b>	<b>Alkil/Açıl</b>	<b>Alkenil/Açıl</b>	<b>Alkil/Alkenil</b>	<b>Alkil/Açıl</b>	<b>Alkenil/Açıl</b>
3.97	2.42	0.61	3.19	2.56	0.80
5.37	2.48	0.46	7.44	3.14	0.42
2.76	2.46	0.89	6.15	2.57	0.42
5.12	3.31	0.65	7.66	2.91	0.38
3.23	3.49	1.08	10.58	2.82	0.27
7.95	2.92	0.37	3.52	2.29	0.65
2.62	1.74	0.67	4.08	2.54	0.62
3.79	2.73	0.72	4.10	2.64	0.64
6.00	2.42	0.40	6.34	3.03	0.48
4.95	2.89	0.58	4.34	2.58	0.59
6.11	3.02	0.49	4.37	2.19	0.50
8.02	3.50	0.44	4.18	2.33	0.56
7.00	2.69	0.38	3.35	3.43	1.02
3.68	2.00	0.54	4.61	2.73	0.59
3.97	2.61	0.66	4.26	2.60	0.61
9.38	1.72	0.18	3.39	1.99	0.59
7.91	3.35	0.42	3.49	2.66	0.76
5.94	2.29	0.38	5.66	2.71	0.48
17.67	3.99	0.23	16.86	3.27	0.19
12.31	4.00	0.32	10.32	2.70	0.26
15.25	4.10	0.27	10.58	4.62	0.44
12.18	3.27	0.27	15.07	3.73	0.25
11.20	2.83	0.25	7.35	4.60	0.63
11.96	3.51	0.29	8.87	2.76	0.31
8.71	3.74	0.43	3.62	2.58	0.71
2.60	2.30	0.89	4.90	2.66	0.54
4.44	2.01	0.45	5.95	2.56	0.43
5.60	2.25	0.40	3.94	2.93	0.74
3.09	2.89	0.94	5.77	3.04	0.53
4.76	2.45	0.52	3.38	2.59	0.77

Veriler fotodansitometrik analiz sonucu elde edilen bant yoğunlarına ait sayısal değerlerin birbirine bölünmesiyle hesaplanmıştır.

**Tablo 4. 3.** Fotodansitometrik yoğunluk analizi sonucu kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid yüzdeleri

<b>Grup</b>					
<b>Kontrol (n=30)</b>			<b>Hasta (n=30)</b>		
<b>% Açıl GL</b>	<b>% Alkil GL</b>	<b>% Alkenil GL</b>	<b>% Açıl GL</b>	<b>% Alkil GL</b>	<b>% Alkenil GL</b>
24.82%	60.07%	15.11%	22.89%	58.70%	18.41%
25.38%	62.90%	11.72%	21.93%	68.82%	9.25%
23.01%	56.50%	20.49%	25.06%	64.47%	10.47%
20.15%	66.80%	13.05%	23.32%	67.82%	8.86%
17.94%	62.66%	19.40%	24.46%	69.02%	6.52%
23.34%	68.09%	8.57%	25.36%	58.12%	16.52%
29.34%	51.13%	19.53%	24.05%	61.01%	14.94%
22.50%	61.33%	16.17%	23.33%	61.65%	15.02%
26.18%	63.27%	10.55%	22.18%	67.22%	10.60%
22.37%	64.58%	13.05%	23.99%	61.78%	14.23%
22.14%	66.91%	10.95%	27.11%	59.32%	13.57%
20.24%	70.92%	8.84%	25.73%	59.94%	14.33%
24.56%	66.01%	9.43%	18.32%	62.92%	18.76%
28.21%	56.46%	15.33%	23.12%	63.18%	13.70%
23.45%	61.16%	15.39%	23.75%	61.75%	14.50%
34.50%	59.19%	6.31%	28.00%	55.62%	16.38%
20.93%	70.19%	8.88%	22.59%	60.16%	17.25%
27.25%	62.28%	10.47%	23.88%	64.70%	11.42%
19.17%	76.50%	4.33%	22.39%	73.26%	4.35%
18.78%	75.11%	6.11%	25.25%	68.15%	6.60%
18.62%	76.37%	5.01%	16.50%	76.29%	7.21%
22.02%	72.06%	5.92%	20.09%	74.94%	4.97%
24.47%	69.35%	6.18%	16.05%	73.89%	10.06%
20.80%	73.09%	6.11%	24.55%	67.80%	7.65%
19.36%	72.33%	8.31%	23.33%	60.09%	16.58%
23.87%	55.00%	21.13%	23.78%	63.29%	12.93%
28.89%	58.03%	13.08%	25.08%	64.15%	10.77%
27.42%	61.59%	10.99%	21.41%	62.69%	15.90%
20.70%	59.91%	19.39%	21.91%	66.56%	11.53%
25.19%	61.83%	12.98%	22.98%	59.42%	17.60%

GL: gliserolipid. Veriler fotodansitometrik analiz sonucu elde edilen bant yoğunlarına ait sayısal değerlerden yararlanılarak hesaplanmıştır.

Hesaplanan kontrol ve hasta grubu eritrosit açıl, alkil ve alkenil gliserolipid yüzdeleri ve alkil/açıl, alkenil/açıl ve alkil/alkenil gliserolipid oranları istatistiksel olarak medyan değerlerine göre karşılaştırıldığında kontrol ve hasta grubu eritrosit % açıl ve % alkil medyan değerleri birbirine yakın bulundu. % alkenil gliserolipid medyan değerlerine bakıldığında ise hasta grubunda % alkenil gliserolipid oranı kontrole göre %2 daha yüksekti. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.4.). Eritrosit alkil/alkenil, alkil/açıl ve alkenil/açıl gliserolipid oranlarına bakıldığında alkil/açıl ve alkenil/açıl gliserolipid medyan değerleri her iki grupta birbirine yakın bulunurken alkil/alkenil gliserolipid oranları hasta grubunda kontrole göre daha düşük bulundu. Bu düşüş alkil gliserolipid yüzdesinin yüksek olması veya alkenil gliserolipid yüzdesinin düşük olmasıyla ilgili olabilir. Yüzde medyan değerleri dikkate alındığında eritrosit alkil gliserolipid yüzdelerinin iki grupta hemen hemen aynı olduğu ancak eritrosit alkenil gliserolipid yüzdelerinin hasta grubunda yaklaşık %2 daha yüksek olduğu tespit edildi. Dolayısıyla eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranlarındaki azalmanın hasta grubu alkenil gliserolipid yüzdesindeki artıştan kaynaklandığı kanaatine varıldı. Ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.4.).

**Tablo 4. 4.** Eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid yüzde değerleri ve oranlarının kontrole göre karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=30)			Hasta Grubu (n=30)			<i>p</i>
	Medyan	Minimum	Maksimum	Medyan	Minimum	Maksimum	
<b>%Açıl</b>	23.18	17.94	34.50	23.33	16.05	28.00	0.965
<b>%Alkil</b>	63.09	51.13	76.50	63.24	55.62	76.29	0.965
<b>%Alkenil</b>	10.97	4.33	21.13	13.25	4.35	18.76	0.473
<b>Alkil/Açıl</b>	2.78	1.72	4.10	2.68	1.99	4.62	0.971
<b>Alkenil/Açıl</b>	0.45	0.18	1.08	0.55	.19	1.02	0.301
<b>Alkil/Alkenil</b>	5.77	2.60	17.67	4.76	3.19	16.86	0.525

Mann Whitney U Testi. Sonuçlar medyan, minimum ve maksimum olarak verilmiştir.  $p < 0.05$ .

Kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranları cinsiyete göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranı erkeklere göre kadınlarda daha düşük bulundu (Tablo 4.5.).

Kontrol grubunda sigara kullananlar ile kullanmayanların eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranları medyan değerlerine göre birbirine yakın bulunurken, hasta grubunda sigara kullananlarda kullanmayanlara göre eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranları daha düşük olduğu tespit edildi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4.5.).

Hasta grubunda ilaç kullananların eritrosit alkil/alkenil gliserolipid medyan değerleri kullanmayanlara göre karşılaştırıldığında daha yüksek fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.5.).

Hasta grubu eritrosit alkil/alkenil gliserolipid medyan değerleri AHİ değerleri <30 olanlar (orta uyku bozukluğu) ile  $\geq 30$  olanlar (ağır uyku bozukluğu) ile karşılaştırıldığında AHİ  $\geq 30$  olanlar hastalarda AHİ <30 olanlara göre daha düşük olduğu gözükmemekte ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak Tablo 4.4'e bakıldığında hasta grubunda eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranlarının da düşük olduğu tespit edildi. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da bu fark hasta grubunda da görülmektedir (Tablo 4.5.). Eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranları kontrole göre anlamlı olmayan bu azalma cinsiyete göre karşılaştırıldığında da aynı şekilde her iki cinsiyette de kontrole göre azalma olduğu tespit edildi (Tablo 4.5.). Bu azalma cinsiyetten faktöründen bağımsızdır. Sigara kullanmayan kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranları arasında anlamlı fark tespit edilemedi. Ancak sigara kullanan kontrol ve hasta grubu arasında değerlendirme yapıldığında eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranı hasta grubunda daha düşük bulundu. Bu azalma sigara faktöründen bağımsızdır (Tablo 4.5.).

**Tablo 4. 5.** Eritrosit alkil/alkenil gliserolipid oranlarının kontrol ve hasta gruplarında cinsiyet, sigara kullanımı ve hasta grubu ilaç kullanımına ve AHİ değerlerine göre karşılaştırılması

			Alkil/Alkenil Gliserolipid Oranı				
			N	Medyan	Minimum	Maksimum	p
<b>Cinsiyet</b>	Kontrol	Kadın	18	5.25	2.60	17.67	0.602
		Erkek	12	6.06	3.23	11.96	
	Hasta	Kadın	8	4.26	3.39	16.86	0.574
		Erkek	22	5.72	3.19	15.07	
	Kadın	Kontrol	18	5.25	2,60	17,67	0.567
		Hasta	8	4.26	3.39	16.86	
	Erkek	Kontrol	12	6.06	3.23	11.96	0.488
		Hasta	22	5.72	3.19	15.07	
<b>Sigara</b>	Kontrol	Kullananan	10	5.77	3.09	11.96	0.983
		Kullanmayan	20	5.74	2.60	17.67	
	Hasta	Kullananan	9	4.37	3.39	10.58	0.422
		Kullanmayan	21	5.77	3.19	16.86	
	Kullananan	Kontrol	10	5.77	3.09	11.96	0.182
		Hasta	9	4.37	3.39	10.58	
	Kullanmayan	Kontrol	20	5.74	2.60	17.67	0.938
		Hasta	21	5.77	3.19	16.86	
<b>İlaç</b>	Hasta	Kullananan	15	5.77	3.19	16.86	0.683
		Kullanmayan	15	4.37	3.38	15.07	
<b>AHİ</b>	Hasta	<30	12	5.28	3.19	16.86	0.851
		≥ 30	18	4.49	3.35	15.07	

Mann Whitney U Testi. Sonuçlar medyan, minimum ve maksimum olarak verilmiştir. p<0.05. AHİ: Apne Hipoapne indeksi. Kontrol grubunda ilaç kullanan olmadığından değerlendirme yapılmamıştır. AHİ> orta uyku bozukluğu, AHİ ≥ 30 ağır uyku bozukluğu

#### 4.2.1. Eritrosit Alkil ve Alkenil Gliserolipid Konsantrasyonları

Kontrol ve hasta grubuna ait 1 mL eritrosit süspansiyonun lipid ekstraksiyonu, fosfolipaz-C ile hidrolizi ve açıl gruplarının saponifikasyonu yapılan numuneler TLC ile ayrıldı fotodansitometrik olarak bant yoğunlukları belirlendi. Oluşan bu değerler daha önce hazırlanmış olan alkil gliserolipid standartı kalibrasyon eğrisi denklemi (Şekil 3.5.) kullanılarak 1 mL eritrosit süspansiyonu içerisindeki alkil ve alkenil gliserolipid miktarları hesaplandı (Tablo 4.6.). TLC plakasına uygulanan numune miktarları bazı

numuneler için kesin bilinmediğinden sadece TLC plakasına uygulanan konsantrasyonu kesin olarak bilinen numuneler için eritrosit alkil, alkenil ve açıl(?) gliserolipid konsantrasyonları hesaplandı. Alkenil ve açıl gliserolipid standartları olmadığından alkenil ve açıl gliserolipid konsantrasyonları da alkil gliserolipid kalibrasyon eğrisinden hesaplandı.

**Tablo 4. 6.** Eritrosit süspansiyonunda tespit edilen kontrol ve hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid konsantrasyonları

	<b>Açılglycerolipid</b> (µg /mL)	<b>Alkil gliserolipid</b> (µg / mL)	<b>Alkenil gliserolipid</b> (µg / mL)
<b>KONTROL</b>			
<b>K9</b>	325.44	712.41	174.28
<b>K10</b>	314.06	779.55	215.20
<b>K12</b>	365.20	1127.42	199.24
<b>K13</b>	245.99	598.30	143.62
<b>K17</b>	261.54	727.33	152.88
<b>K18</b>	395.93	812.17	196.72
<b>K26</b>	313.62	658.73	230.89
<b>K27</b>	657.35	1202.23	343.79
<b>K28</b>	395.99	819.22	218.03
<b>K29</b>	378.57	848.86	235.90
<b>K30</b>	331.43	678.02	207.80
<b>HASTA</b>			
<b>H1</b>	244.98	531.86	202.57
<b>H2</b>	256.85	705.18	148.76
<b>H3</b>	307.73	686.08	166.00
<b>H4</b>	232.08	562.34	133.09
<b>H5</b>	234.58	538.62	114.58
<b>H25</b>	202.25	426.72	152.90
<b>H26</b>	195.96	445.64	135.98
<b>H27</b>	419.51	920.75	207.84
<b>H28</b>	256.68	654.19	194.76
<b>H29</b>	269.32	673.82	166.56
<b>H30</b>	251.48	559.26	215.11

K: kontrol grubu, H: hasta grubu. K ve H yanındaki sayılar numune kodlarını ifade etmektedir.

**Tablo 4. 7.** TLC ile ayrılan kontrol grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid spotlarına ait fotodansitometrik yoğunluk analizi bulguları

	<b>Açıl gliserolipid</b>	<b>Alkil gliserolipid</b>	<b>Alkenil gliserolipid</b>
<b>K1</b>	955909.6	2313504	582236.8
<b>K2</b>	417853	1035366.1	192867.3
<b>K3</b>	234013.2	574543.6	208273.4
<b>K4</b>	56337.3	186752.4	36465.56
<b>K5</b>	137039.6	478589	148176.7
<b>K6</b>	211023.8	615554.69	77398.51
<b>K7</b>	680886.1	1186636.5	453224.4
<b>K8</b>	471828.5	1286183.3	339275.9
<b>K9</b>	306020.3	739508.66	123195.8
<b>K10</b>	296717.4	856407.03	172998.4
<b>K11</b>	295568.1	893119.31	146131.1
<b>K12</b>	278821	976920.63	121815.8
<b>K13</b>	283584.2	762207.72	108908.1
<b>K14</b>	651849.6	1304601.6	354315.5
<b>K15</b>	721318.1	1881320.3	473335.1
<b>K16</b>	895006.9	1535461.5	163658.2
<b>K17</b>	215541.4	722710.16	91363
<b>K18</b>	322901.9	738061.94	124199.2
<b>K19</b>	81858.95	326684.16	18487.33
<b>K20</b>	35660.41	142593.9	11582.78
<b>K21</b>	96810.03	397087.58	26038.21
<b>K22</b>	54356.87	177905.21	14611.65
<b>K23</b>	203355.5	576405.07	51443.34
<b>K24</b>	159545.1	560708.44	46873.1
<b>K25</b>	194287.6	725935.96	83359.07
<b>K26</b>	294070.8	677591.85	260296
<b>K27</b>	437111.4	878031.1	197976.5
<b>K28</b>	433532.7	973910.82	173818.9
<b>K29</b>	328252.2	949888.13	307509.6
<b>K30</b>	321964.6	790274.1	165990.3

K: Kontrol grubu



**Tablo 4. 8.** TLC ile ayrılan hasta grubu eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid spotlarına ait fotodansitometrik yoğunluk analizi bulguları

	<b>Açıl gliserolipid</b>	<b>Alkil gliserolipid</b>	<b>Alkenil gliserolipid</b>
<b>H1</b>	225084.71	577300.8	181121.6
<b>H2</b>	247498.72	776664	104394.9
<b>H3</b>	309655.63	796716.2	129516.8
<b>H4</b>	217404.51	632275.7	82591.72
<b>H5</b>	194216.32	548004.2	51792.53
<b>H6</b>	801820.38	1837638	522291.2
<b>H7</b>	811285.25	2057643	503906.8
<b>H8</b>	604779.56	1598379	389542
<b>H9</b>	298543.34	904847.4	142682.7
<b>H10</b>	417040.47	1074253	247450.2
<b>H11</b>	681487.56	1490995	341036.9
<b>H12</b>	364098.88	848169.3	202828.9
<b>H13</b>	321127.25	1103045	328884.4
<b>H14</b>	370277.46	1011680	219381.3
<b>H15</b>	615160.3	1599062	375536.5
<b>H16</b>	578010.94	1148343	338306.6
<b>H17</b>	452395.97	1204985	345531.3
<b>H18</b>	722485.13	1957604	345701
<b>H19</b>	78091.32	255531.6	15156.34
<b>H20</b>	79537.023	214636.1	20788.08
<b>H21</b>	54329.15	251259.8	23743.74
<b>H22</b>	63973.915	238614	15836.07
<b>H23</b>	56733.325	261207.9	35561.47
<b>H24</b>	196566.42	542838.8	61209.53
<b>H25</b>	205787.65	529924.3	146239.5
<b>H26</b>	225051.91	598966.4	122333
<b>H27</b>	411247.53	1052010	176735.6
<b>H28</b>	283206.5	829385.7	210360.2
<b>H29</b>	246705.25	749493.5	129806.2
<b>H30</b>	269167.01	695948.8	206146.4

H: Hasta grubu

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde gelişen aydınlatma sistemleri, geç yemek yeme, gece uyuma, kıtalar arası yapılan yolculuklar, vardiyalı çalışma gibi birçok faktör sirkadiyen saatlerdeki senkronizasyonların bozulmasına yol açmakta ve bunun sonucunda da kanserin de dahil olduğu, obezite, tip 2 diyabet, metabolik sendrom, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık (8) ve alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (54) gibi bozukluklarda artışlara yol açmaktadır. Yine son yıllarda giderek artan epidemiyolojik çalışmalar, vardiya tipi ve gece çalışmalarının uyku-uyanıklık döngüsünün bozulmasına bağlı sağlığa ilişkin uzun süreli etkilere neden olabileceğini göstermektedir (6). Çalışmalar kısmi günlük uyku kaybı veya total uyku yoksunluğuna maruz kalmanın plazmada lipid konsantrasyonlarını (örneğin, kolesterol, yağ asitleri ve fosfatidilkolin) etkilediğini göstermektedir. Uyku kısıtlaması sonucu konsantrasyonları değişen lipidlerin birçoğunun sirkadiyen değişim gösterdiği bildirilmiştir. Buradan hareketle çalışmamızda uyku kısıtlaması ve uyku kaybı sonucu meydana gelen sirkadiyen ritim bozukluklarında değişim gösterdiği bilinen bir metabolit olan plazmalojen düzeylerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda uyku bozukluğu olan ve uyku bozukluğu olmayan iki grubun alkil ve alkenil gliserolipid (plazmalojen) oranları tespit edilip, sirkadiyen ritim bozukluğuna bağlı uyku bozukluklarının tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı ihtimali değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olan (hasta) ve uyku bozukluğu olmayan (kontrol) iki grubun eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid oranları belirlenmiştir. İki grup arasında eritrosit alkil ve alkenil gliserolipid oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak hasta grubunda alkil/alkenil gliserolipid oranlarının daha düşük olduğu gözlemlendi. Hasta grubunda eritrosit alkil/alkenil oranındaki bu düşüş hasta grubunda alkenil gliserolipid yüzdesinin artmasından kaynaklanabileceği kanaatine varıldı. Sonuçlarımızda istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmayışı farklı sebeplere bağlı olabilir:

1. Bireysel ve fenotipik farklılıklardan dolayı bir fark gözlemlenememiş olabilir. Çünkü memeli sirkadiyen saati bireysel ve fenotipik farklılıklardan etkilenir. İnsanların belirli bir kronotipe (sabahçıl ya da akşamcıl) doğru eğilimleri vardır (7). Sabahcıl ve akşamcıl kronotipler arasında yaklaşık iki saatlik bir faz farkı bulunmaktadır. İki saatlik faz farkı uyku-uyanıklık döngüsü, vücut sıcaklığı, hormon salgılanması (kortizol ve melatonin) gibi fizyolojik olaylarda da yaklaşık 2 saattir (14). Bireysel ve fenotipik

farklılıklar sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitlerin osilasyonun da farklı olmasına yol açar. Her bir bireyin sirkadiyen saatinde ilgili metabolitlerin pik yapma zamanı farklı olmaktadır (100). Her bir bireyin osilasyon zamanının farklı oluşu iki grup arasında yapılan karşılaştırmalarda farklılıkların belirlenmesini güçleştirmektedir. Farklı gruplara ait değerler bir araya getirilip bir ortalama alındığında bu farklılar birbirini nötralize ettiğinden bir fark varsa da gözlemlenememektedir. Dolayısıyla bizim çalışmamızda bir fark varsa da sonuçlar tüm grup içinde değerlendirildiği için farklılık gözlemlenememiş olabilir. Bu nedenle sirkadiyen ritim çalışmalarında sonuçların bireysel olarak değerlendirilmesi daha doğru bir yaklaşım olabilir.

2. Önceki çalışmalarda serum numuneleri kullanılırken bizim eritrosit membranı lipid kompozisyonunu değerlendirmiş olmamız diğer bir sebep olabilir. Sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitlerdeki farklılıklarını gözlemlenmesi amacıyla eritrosit membranının lipid kompozisyonu değerlendirmek doğru bir yaklaşım olabilir. Çünkü plazma yağ asitlerinin profili günlük diyetle alınmasına bağlı olarak sirkadiyen osilasyon gösterirken, eritrosit membran bileşimi yağ asitlerinin 2-3 aylık diyet alımını yansıtmaktadır (101). Ayrıca insan olgun eritrositlerinin nükleus, ribozom, mitokondri, vakoul ve ER gibi organelleri içermediği bilinmektedir. Bu hücresel yapılarının olmayışı bu hücrelerin protein sentezi, nükleik asit sentezi ve lipid sentezini de gerçekleştiremeyeceği anlamına gelmektedir. Bu nedenle yıkanmış olan eritrositlerden elde edilen lipidler sadece eritrosit membranındaki lipidleri gösterir. Bu özellikler bu hücrelerin membranlarında sirkadiyen ritim değişimlerini gözlemlemek için önemli bir membran modeli sunmaktadır. Ancak bu model bireysel farklılıkları yansıtabilse de eritrosit membranı lipid kompozisyonu geç değiştiğinden günlük değişimleri gözlemleyebilmek için uygun bir model değildir. Bizim çalışmamızda hem günlük değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla hem de geniş bir FL havuzu olduğu için serum numuneleri kullanılması öngörülmüştür. Fakat yapılan ön denemelerde bu metodun (TLC) hassasiyet derecesinin serum numunelerinde ölçüm yapmak için yeterli olmadığı belirlenmiştir. Plazma FL analizleri enzimatik-kolorimetrik yöntemlerle yapılabilir.

3. Diğer bir sebep önceki çalışmalarda oluşturulan sirkadiyen ritim bozukluğu modellerinin bizim çalışmamızla farklı olması olabilir. Önceki çalışma uyku sınırlandırılması yapılmış kontrollü bir deney (5 gün 4 saatlik uyku kısıtlaması) iken bizim çalışmamız uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olan bireylerden oluşan bir çalışmadır. Her ne kadar çalışmamıza katılan bireylerin uyku bozukluğunun şiddeti yüksek olsa da ( $AHI \geq 30$ , ağır uyku bozukluğu) bu kişilerin ne kadar süredir

uykusuzluk çektiği veya uykusuzluk düzeylerin nasıl olduğu belli değildir. Yine mevcut çalışmada çalışmaya katılan katılımcıların uyku sınırlandırılması yapılmadan önce, yapıldıktan bir gün sonra ve beş gün sonra kan örnekleri alınarak bir değerlendirme yapılmıştır. Bizim çalışmamızda böyle bir uygulama için katılımcıların uyku bozukluğu olmadan önceki değerleri ve uyku bozukluğu başladıktan sonraki değerleri karşılaştırarak yapılmasını gerektirir. Ancak bu uyku kliniğine uyku bozukluğu şikayetiyle başvuran hastalardan oluşan bir çalışma olduğundan böyle bir takip yapılması mümkün olmamıştır. Böyle bir çalışma için belirli aralıklarla rotasyonlu çalışan bireylerde rotasyon öncesi ve sonrası kan değerleri değerlendirilebilir veya oruç tutan bireylerin (sirkadiyen saatinin bozulduğu öngörülerek) oruç öncesi ve oruç sonrası kan değerleri alınarak bir değerlendirme yapılabilir.

4. Lipid analizlerinin gerçekleştirildiği analitik metodların farklı olması da bu sonuçları etkileyen başka bir sebep olabilir. Mevcut çalışmada lipid analizleri GC-MS ve LC-MS ile gerçekleştirilirken bizim TLC ile yapmış olmamız analizler arasında dedeksiyon limitleri ve varyasyon derecelerinin farklı olması da farklı sonuçlara sebep olmuş olabilir. Ancak TLC, EGL'lerin ayrılması için en sık uygulanan tekniklerden biridir. Çünkü bu yöntem düşük maliyetlidir, tek bir TLC plakası üzerinde birkaç numune aynı anda uygulanabilir hızlıdır ve daha uygun bir şekilde yapılabilir (92). Bu avantajlarının yanında EGL'lerin yağ açıl bileşiminin ve bir EGL sınıfı içindeki diaçil ve alkil-açıl bağlantılı türler arasındaki farklılığın TLC belirlenmesi de zordur (80).

5. Ayrıca lipid bantlarının yoğunluklarının fotodansitometrik olarak belirlenmiş olmasının kısmen subjektif bir değerlendirme olduğu göz ardı edilmemelidir. Çünkü fotodansitometrik analizler bir fotoğraf görüntüsü üzerindeki görüntünün yoğunluğuna göre yapılmakta. Bizim de çalışmamızda lipid bantlarının görünürleştirmek için kullanmış olduğumuz boyanın hangi lipid bantıyla ne oranda etkileşim gösterdiği bilinmemektedir. Boyayı yoğun olarak almış bir lipid bantı için yoğunluğunun da fazla olacağı veya boyayı az olarak almış bir lipid bantı için yoğunluğunun da az olacağı anlamına gelmez. Bu da lipid bantları arasında boyanma özelliklerine göre bir analiz yapmanın objektif sonuçlara olumsuz etkisini ortaya koyabilir. Ayrıca fotodansitometrik analizlerde her ne kadar lipid bantları otomatik olarak işaretlenmiş olsa da tüm bantların aynı düzeyde hassas olarak işaretlenmesi mümkün olmayabilmektedir ve her plakanın arka planın yoğunluğu da farklı olmaktadır.

Tüm bu faktörler istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmamasını etkilemiş olabilir.

Bazı plazma lipidleri sirkadiyen osilasyon gösterirler. İnsanın plazmasında yapılan lipidomiks çalışmasında; lipidlerin %13 sirkadiyen osilasyon gösterdiği sirkadiyen osilasyon sergileyen lipidlerin çoğu TAG ve diaçilgliseroller olduğu bildirilmiştir (56). İnsan kanında sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitler arasında FG (18:1, gliserofosfolipid) ve LizoFC (16:1 lizofosfolipid) gösterilmiştir (58). İn vivo insan iskelet kası hücrelerinde gliserolipidler, gliserofosfolipitler ve sfingolipitler, günlük osilasyon göstermiştir (57). İnsan plazmasında günlük varyasyon gösteren FL ise lizofosfatidilkolin, lizofosfatidiletanolamin ve kolin plazmalojenlerdir.

Uyku sınırlandırması veya uyku bozukluğunun bir sonucu sirkadiyen senkronizasyondaki bozulmalar olması sebebiyle uyku sınırlandırması 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 birikimi, uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonunda azalma, buna ilaveten bazı fosfolipidlerin sentezi ve oksidasyonu ile bağlantılı metabolitlerdeki artış araştırmacılar tarafından PPAR yoluyla peroksizomal aktiviteye işaret ettiği şeklinde yorumlanmıştır (12). Yine insanlarda akut uyku sınırlandırmalarında yapılan metabolik profil çalışmalarında 27 metabolitin önemli oranlarda artış gösterdiği ve bu 27 metabolitten 13'nün gliserofosfolipid olduğu ortaya konmuştur (10). Başka bir çalışmada uyku yoksunluğu sonucu kolin plazmalojen seviyelerinin azaldığı, birkaç FC ve çoklu doymamış yağ asiti içeren TAG'lar ise arttığı gözlenmiştir. FC'lerde ve TAG'lardaki artış, uyku kaybının, yeterli uyku sağlamayan bireylerde metabolik sağlık için potansiyel etkileri olan lipid metabolizmasını değiştirebileceğini göstermektedir (11).

Uyku kısıtlaması veya total uyku yoksunluğu sonucu insan serumunda değişen metabolitlere bakıldığında bizim sonuçlarımızla farklılıklar görülmektedir. Her ne kadar mevcut çalışmalarda serum numuneleri, bizim çalışmamızda eritrosit numuneleri kullanılmış olsa da bu sonuçlar plazmalojen sentezini ve sentez sonrasını değiştiren faktörlere bağlı olarak bir değişime işaret etmektedir. Mevcut çalışmalarda plazmalojen seviyeleri düşük bulunurken çalışmamızda uyku bozukluğu olan bireylerde eritrosit alkenil gliserolipid (plazmalojen) yüzdesi yüksek bulundu. Plazmalojenlerin fonksiyonları (membran bileşeni, antioksidan ve sinyal bileşeni) göz önüne alındığında alkenil gliserolipid yüzdesindeki artış artan oksidatif stres, hipoksi ve plazmalojenaz aktivitesi ile ilişkilendirilebilir.

Plazmalojenlerin endojen antioksidanlar olarak FL, lipid ve lipoprotein partiküllerini oksidatif strese karşı korudukları bilinmektedir (61). Yapılan çalışmalara bakıldığında oksidatif stresin plazmalojen düzeyine etkisinin iki yönlü olduğu görülmektedir. Birçok patolojide plazmalojenlerin oksidatif stres sonucu endojen antioksidanlar olarak azaldığı diğer taraftan hipoksi sırasında oksidatif stresten korunmak için hücrelerin plazmalojen sentezlerini artırdıkları bildirilmiştir. Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, kanser ve solunum hastalığı gibi birçok hastalıkta plazmalojen düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. Bu azalmanın artan oksidatif stres sonucu plazmalojenlerin sn-1 pozisyonundaki vinil-eter bağının oksidatif strese duyarlılığından kaynaklandığı bildirilmiştir (65). Ayrıca vinil eter bağının konumu (membranın hidrofilik bölgesinde yer aldığı düşünülmekte) ve plazmalojenlerin oksidatif stres ürünlerinin yavaş oluşması plazmalojenlerin kurban antioksidanlar olarak rolünü açıklamaktadır (83). Yine artan oksidatif stres sonucu mitokondri membranının geçirgenliğinin artması sonucu elektron taşıma zinciri elemanı sitokrom c'nin sitoplazmaya geçerek plazma membranında bulunan plazmeniletanolamin veya plazmenilkoline bağlanmasıyla plazmalojenaz aktivitesi gösterdiği ve bunun sonucunda da plazmalojenleri azalttığı bildirilmiştir (102). Bizim çalışmamızda ise alkenil gliserolipid düzeyleri arttı. Ayrıca sitokrom-c'nin plazmalojenaz aktivitesi plazma membranının iç yüzeyinde cereyan etmekte ve bu işlem mitokondrilerle ilişkilidir. Eritrositlerde de mitokondri bulunmadığından bu mekanizma eritrositler için geçersizdir. Bu nedenle plazmalojenlerdeki bu artışın sitokrom c'nin plazmalojenaz aktivitesinden ziyade artan oksidatif stres ve hipoksi ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

İnsan pulmoner arter endotelial hücrelerin hipoksiye maruz kaldığında ortama plazmalojen öncüsü (sn-1-O-heksadesilgliserol) eklendiğinde plazmalojenlerin beş gün içerisinde sentezlerini iki kat artarak insan pulmoner arter endotelial hücrelerini oksidatif stresten koruduğu bildirilmiştir (103). Ayrıca HIF1 hipoksiye cevap olarak geniş bir gen ekspresyonunu aktive edebilir. Hipoksi durumunda HepG2 hücrelerinde PPAR $\gamma$  seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (104). Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olan bireylerde (105) ve bağırsak endotel hücrelerinde hipoksi sonucu PPAR- $\alpha$ 'nın regülasyonunun azaldığı bulunmuştur (106). Aksine başka bir çalışmada akciğer kanser hücre kültüründe hipoksinin PPAR- $\alpha$  ve HIF1- $\alpha$  ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur (107). Bu veriler PPAR- $\alpha$  aktivitesini HIF1- $\alpha$  tarafından düzenlenebileceğini göstermektedir. Yine endotel hücrelerinin akut ve kronik hipoksiye maruz kalması

sonucu endotel hücre FL kompozisyonu ve fosfolipaz aktivitesi üzerinde etkileri olduğu bulunmuştur. Akut ve kronik hipoksiye maruz kalındığında ortamda bulunan FL öncüsü (asetik asit) miktarı azalması FL sentezinin arttığı gösterilmiştir. Çalışmada Fosfolipaz A<sub>2</sub> ve FC düzeyleri artarken, FE düzeyi değişmemiştir. Bu etkilerin endotel hücrelerinin kökenine ve hipoksinin süresine bağlı olduğu bulunmuştur. Ancak bu değişimler plazma membranından ziyade organel membranında görülmüştür (108). Bu veriler plazmalojenlerin hipoksi ve diğer reaktif oksijen türlerinden kaynaklı oksidatif stres sırasında miktarlarını arttırarak hücreleri koruyabileceğini göstermektedir. Ancak bu artış için plazmalojenlerin hücre içerisinde sentezlenmiş olması gerekir. Fakat olgun eritrositler nükleus ve hücre içi organeller taşımadığından plazmalojen sentezi gerçekleştiremezler. Oysa olgun eritrositlerin dolaşım ömrü boyunca çok dinamik bir sistemin, membranın genel bileşimini ve kompozisyonunu koruduğu bilinmektedir (109). O zaman eritrositlerde FL lipid kompozisyonu nasıl değişebilir?

1. Yeni sentezlenmiş olup dolaşıma katılan eritrositler total membran FL kompozisyonu değiştirir. Bir eritrosit hücrelerinin dolaşımdaki ömrü yaklaşık 120 gündür (110). Hergün retikuloendotelial sistem tarafından dolaşımdaki eritrositlerin %1'nin yenilendiği bilinmektedir. Dolayısıyla yeni sentezlenen eritrositlerle membran FL kompozisyonu değişmiş olabilir. Ayrıca eritrositlerin dolaşımdaki bu günlük değişimleri peroksizomal aktiviteyi de yansıtabilir. Çünkü plazmalojenlerin sentezi fonksiyonel peroksizomlar gerektirir. Plazmalojen sentezinde önemli iki enzim (Alkil-DHAFS ve YAR1) peroksizomda yer alır (68).

2. Olgun eritrositlerde membran fosfolipid kompozisyonunun düzenlenmesinde diğer bir yol serum lipoproteinleri ve eritrosit membranı arasındaki lipid değiş-tokuşudur (14). Olgun eritrositler FL sentezi gerçekleştiremezler ancak insan doku ve hücrelerinde plazmalojenlerin karaciğerde, bağırsakta ve böbrekte sentezlendiği ve lipoprotein bileşenleri olarak kana salındığı bilinmektedir (70). Sürekli yenilenen yağ asitleri plazmadan hızla alınıp ve membran fosfolipidlerine dahil edildiği bilinmektedir (109). İnsanlarda ve köpeklerde eritrosit ve plazma bileşikleri arasında PC (lesitin) ve SM arasındaki değişim gösterilmiştir (111). Dolayısıyla plazmalojen düzeylerindeki artışın plazmadan eritrosit membranına bir transfer mekanizması ile gerçekleştiği düşünülebilir. Ancak bu değişimin mekanizmasının nasıl işlediği belli değildir. Bu değişimin plazma lipoproteinleri ile eritrosit membranı arasında fosfolipid transfer proteini (FLTP) (112), lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) (113), endotelial lipaz (LIPG) (114), salgısal fosfolipaz A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) (115) ve plazmalojenaz enzimlerinin rol

oynadığı düşünülebilir. Bu enzimler eritrosit membranında yer alan FL'lerin sn-1 veya sn-2 pozisyonunda bulunan bir açıl grubunun ayrılmasını katalizleyerek serbest yağ asitleri ve lizofosfolipidlerin oluşmasına yol açmaktadır. Oluşan lizofosfolipidler plazma membranın fonksiyonlarını etkilemektedir. Özellikle FLTP bu transfer mekanizmasında oldukça önemli bir rol oynadığı düşünülebilir. Çünkü FLTP serum lipoprotein-eritrosit trafiğinde tam bir FL taşınmasını sağlamakta. Ancak serum lipoproteinleri ile eritrosit membranı arasındaki bu transfer mekanizmasının nasıl olduğu hali hazırda açık değildir.

3. Eritrosit membran FL kompozisyonun değişimine yol açan diğer bir yol ise membranda çift katlı lipid tabakasında FL transferini sağlayan enzimler ile olmaktadır. Eritrosit membranı amfipatik lipid moleküllerinden ve lipid matrisine gömülü proteinlerden (transmembran) oluşan dinamik yapılardır (88). Eritrosit membranında yer alan lipidler membran yüzeyleri arasında asimetrik olarak dağılmış durumdadır. Memeli hücrelerinde, eritrosit membranının sitoplazmik yüzeyi ile dış yüzeyi karşılaştırıldığında genellikle FE, FS ve FI sitozolik katmanda daha fazla bulunurken SM ve FC dış yüzeyde daha fazla bulunur. Kolesterol ise iki katmanda eşit olarak dağılmış durumdadır (66). İnsan eritrosit membranın çok sayıda PUFA içerdiği de bilinmektedir (116). Eritrositlerde membran fosfolipidlerinin asimetri gösterdiği ve asimetrisinin korunması lipid homeostazını korumak için esastır (117). Membran asimetrisinin korunması floppazlar, filipazlar, ve scramblases enzimleri tarafından düzenlenmektedir. Floppaz iç yüzeyinden dışa yüzeye doğru FC'lerin FS ile ters transferini kontrol eder (118). Filipazlar (aminofosfolipid translokaz) amino grubu içeren fosfolipidleri (FE, FS) sitoplazmik yüzeyden dış yüzeye doğru doğru pompalar. Scramblase ise membranın iç ve dış yüzeyi arasında konsantrasyon gradyentine bağlı olarak eritrosit membranı boyunca iki yönlü fosfolipid geçişini sağlamaktadır (117). Tüm bu enzimleri etkileyen faktörler, membran FL kompozisyonunda değişime yol açabilir.

4. Eritrosit membranının FL lipid kompozisyonun beslenme ve çeşitli patolojilerde değişim gösterdiği de bilinmektedir (111, 116). Bozuk membran katyon geçirgenliğinin artması sonucu eritrosit hacmindeki artma veya azalış, hücresel deformasyonlara yol açmaktadır (110). Eritrosit membran disfonksiyonu hemoglobinopatilerin patolojisinde önemli bir rol oynar. Anemi, orak hücre anemisi ve talasemilerde antioksidan sisteme rağmen membran FL asimetrisi değişmektedir. Bu değişim diğer kan hücreleriyle etkileşim sonucu patolojiler meydana getirir (118). Down



sendromlu çocukların sağlıklı kardeşleriyle karşılaştırıldığında plazma ve eritrosit membran fosfolipid kompozisyonu artış gösterdiği, plazmalojen konsantrasyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (119). Yine Gaucher hastalığı olan hastaların eritrosit zarı plazmalojen seviyeleri azalma tespit edilmiştir (120). Myotonik distrofi hastalarında da eritrosit membran fosfatidiletanolamin ve plazmalojen düzeylerinde değişimler gözlenmiştir (121). Bunlar gibi birçok durumda bozulmuş membran kompozisyonu gözlenmiştir. Bu patolojilere ek olarak bizim verilerimize göre uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu durumunda da membran disfonksiyonuna bağlı olarak plazmalojen düzeyleri değişmiş olabilir. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu, sistemik inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi, artmış oksidatif stres seviyesi ve endotel disfonksiyonu de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerin düzensizliğini içerdiği bilinmektedir (54). Mevcut bilgilerimiz ışığında uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu ve eritrosit membranı plazmalojen seviyeleri arasındaki bağlantıyı ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

5. Reaktif oksijen türlerinin de membran FL kompozisyonunu değiştirdiği bilinmektedir. Yüksek ROS seviyeleri FL yapısında bulunan çoklu doymamış açıl gruplarının hasar görmesine neden olur. ROS arttığında oksijen çoklu doymamış açıl gruplarının çift bağları ile reaksiyona girer apolar zincirlere bir kutupsal özellik kazandırır. Bu yapı fosfolipazlar tarafından tanınır. Fosfolipaz onarım işlemine başlayarak sn-2 pozisyonundan bir açıl grubu koparmasıyla lizofosfolipitler üretilir. Plazmadan bir açıl transferaz ile bir yağ asiti alınır membran fosfolipidlerine eklenir (109).

Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamasa da cinsiyet ve sigara kullanımı eritrosit alkil/alkenil oranlarını etkileyen iki önemli faktördür. Çalışmamızda hem kontrol grubunda hem de hasta grubunda eritrosit alkil/alkenil oranları kadınlarda daha düşük bulundu. Bu düşüş sirkadiyen ritimden bağımsızdır. Bu farklılık kadınların hormonal değişimlerinin bir sonucu olabilir. Sigara kullanımına göre ise kontrol ve hasta grubunda sigara kullanmayanların eritrosit alkil/alkenil oranları birbirine yakın bulunurken sigara kullananlar arasında hasta grubunda alkenil gliserolipid yüzdesi yüksek bulundu. Bizim verilerimiz sigara kullananların plazmalojen biosentezinde önemli bir enzim olan alkil-DHAF'ın azalan aktivitesinin plazmalojen sentezinin azalttığı (71) sonuçlardan farklıdır. Bu sonuçlarla değerlendirildiğinde bizim sonuçlarımıza göre alkenil gliserolipid yüzdesi arttığından alkil-DHAF aktivitesi artmış olabilir. Ancak çalışmamızda bu enzimin aktivitesine yönelik herhangi bir parametre

çalışılmadı. Yine insan serumunda nikotine bağlı miktarı değişen metabolitler değerlendirildiğinde sigara içenlerin plazmalojen düzeylerinin daha düşük olarak bulunurken (122) bizim çalışmamızda plazmalojen düzeyleri yüksek bulundu. Mevcut çalışmada sadece sigara kullanımına bağlı plazmalojen düzeyleri değerlendirilirken, bizim çalışmamızda uyku bozukluğu ile beraber sigara faktörü değerlendirilmiştir. İki çalışma arasındaki farklılık bundan kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamızda ilaç kullananların alkil/alkenil gliserolipid düzeyleri de değerlendirildi. Ancak bireylerin kullandığı ilaçların birbirinden farklı olması sebebiyle kesin bir değerlendirme yapılamadı. Metformin (123), dexamethasone (124) ve isotretinoin (125) gibi pek çok ilacın sirkadiyen ritmi etkilediği bilinmektedir. Dolayısıyla farklı ilaç kullanan bireylerin plazmalojen düzeylerini ne tür ilaçlardan etkilendiğini değerlendirmek için ilave çalışmalar yapılabilir.

Bütün bunlar değerlendirildiğinde; uyku bozuklukları sirkadiyen ritmi değiştirmektedir. Sirkadiyen ritimin bozulmasına bağlı olarak da plazmada osilasyon gösteren lipidlerin (FC, TAG) osilasyonu değişmektedir. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu artan hipoksi, artmış oksidatif stres, üst solunum yolunun tekrarlayan apne veya hipopneler (48) ile ilişkilidir. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğunun bir özelliği olan hipoksinin ise hem sirkadiyen saat hem de lipid sentezi ile ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Lipid metabolizması ile ilgili genlerin (SREB1 ve SCD-1) ekspresyonunun artması ile membran FL kompozisyonu değişmektedir (126). Uyku apnesine bağlı uyku bozukluklarında akut hipoksi sonucu artan TAG seviyeleri ve azalan lipoprotein lipaz aktivitesi gösterilmiştir (55). Ancak uyku apnesine bağlı uyku bozukluklarında eritrosit membranının peroksizomal kökenli alkil ve alkenil gliserolipid düzeylerini nasıl değiştirdiği bilinmemektedir. Artan hipoksinin plazmalojen sentezini artırdığı gösterilmiş fakat bu çalışma uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu sonucu değişen hipoksi değil hücre kültüründe hipoksiye maruz bırakılan insan pulmoner arter endotelial hücrelerinde gösterilmiştir (103). Yine total uyku yoksunluğu veya uyku kısıtlaması sonucu plazmalojen düzeylerinin azaldığı belirtilmiş ancak uyku apnesine bağlı uyku bozuklukları ile plazmalojen düzeyleri arasındaki bağlantıyı gösteren herhangi bir çalışma rastlanılmamıştır. Çalışmamızda her ne kadar istatistiksel olarak bir fark bulunamasa da uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu olan bireylerde alkenil gliserolipid düzeyleri yüksek bulundu. Bu artışı artan oksidatif stres ve hipoksi sonucu plazmalojen sentezinin indüklendiği düşünülebilir.

Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu genel populusyondaki yetişkin erkeklerin %50'sinin en az bir dereceye kadar sahip olduğu oldukça yaygın bir hastalıktır. Yaş ile birlikte bu oran giderek artmaktadır (50). Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve özellikle felç ile ilişkilidir ve 70 yaşın altındaki kişilerde erken ölüm riskini arttırmaktadır (51). Böyle bir hastalığında tanı ve tedavisinin takibi oldukça önem arz etmektedir. Uyku apnesine bağlı uyku bozukluğunun tanı ve tedavisinin takibi PSG denilen alet ile gerçekteştirilmektedir. Hastalık tanısı AHİ değerlerine göre konulmakta ancak AHİ oranları birden fazla değişkenden etkilendiğinden (yaş, cinsiyet, sigara) özellikle hafif uyku apnesine bağlı uyku bozukluğu (AHİ 5-15) tanısı için bunun yeterli bir teknik olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, uyku apnesine bağlı uyku bozukluğunun değerlendirilmesini sağlayacak yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (50). Bizim çalışmamızda her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamasa da daha kontrollü deneyler yapılarak uyku apnesine bağlı uyku bozukluğunun tanı ve tedavisinin takibinde plazmalojen düzeylerinin bir belirteç olarak kullanılabileceği kanatindeyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Memeli sirkadiyen saati bireysel ve fenotipik farklılıklardan etkilendiğinden grup içerisinde sirkadiyen ritim etkisini ve değişimini tespit etmek zordur. Çünkü her bir bireyin sirkadiyen saatinde ilgili metabolitlerin pik yapma zamanı farklı olduğundan tüm değerler toplanıp bir ortalama alındığında farklılıklar birbirini nötralize eder. Dolayısıyla sirkadiyen ritim değişimlerini grup olarak değerlendirmektense her bir bireyin ritim bozukluğu tedavilerinin başlangıcında ve tedavi sonrasında alınacak numunelerinin karşılaştırılması sirkadiyen ritim bozukluklarının tespitinde daha doğru bir yaklaşım olabilir.

Bazı plazma lipidleri günlük osilasyon gösterirler. Ancak plazma lipidlerinin osilasyonu her bireyde farklı olduğundan plazmada sirkadiyen ritim etkisini ve değişimini tespit etmek zordur. Bu nedenle eritrosit membranı günlük değişimlerden daha az etkilendiğinden sirkadiyen ritim bozukluklarının lipid metabolizmasındaki değişikliklerini yansıtan önemli ve etkili bir model olabileceği kanaatine varıldı.

Uyku bozukluğuna bağlı sirkadiyen ritim değişiminde bireylerin plazmalojen düzeylerinin nasıl etkilendiğini aydınlatılabilmesi için rotasyonlu çalışan bireylerin rotasyon öncesi ve rotasyon sonrası kan değerleri değerlendirilebilir veya oruç tutan bireylerin (sirkadiyen saatinin bozulduğu öngörülerek) oruç öncesi ve oruç sonrası kan değerleri değerlendirilebilir.

Uyku apnesine bağlı uyku bozukluklarında plazmalojen düzeylerinin nasıl etkilendiği ile ilgili daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. TAG düzeylerinin hipoksiye bağlı olarak değiştiği bildirilmiş ancak plazmalojen düzeyleri ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Mevcut bilgiler ışığında bu çalışma uyku apnesine bağlı uyku bozukluklarında plazmalojen düzeylerindeki değişimi gösteren ilk çalışmadır.

Uyku apnesine bağlı uyku bozukluklarının tanı ve tedavisinin takibi PSG ile yapılmaktadır. Bu test hastaların bir gece uyku laboratuvarında kalmalarını gerektirmekte ve bu süreç hastalar için hem zaman alıcı hem de zahmetli olduğundan daha kullanışlı ve daha hızlı tanı ve tedavi takibi belirteçlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu veriler metabolik açıdan uyku apnesinin tedavisinin takibinde önemli bir belirteç olmasına yol açabilir.

Uyku apnesine bağlı uyku bozuklukları hipoksiye neden olmaktadır. Hipoksinin ise PPAR'ın aktivasyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Metabolizma ile sirkadiyen ritim

ve metabolik bozuklukları arasında önemli bir reseptör olan PPAR'ın hipoksiden nasıl etkilendiğinin araştırılması önemli ipuçları verecektir.



## KAYNAKLAR

1. Weger M, Diotel N, Dorsemans AC, Dickmeis T, Weger BD. Stem cells and the circadian clock. *Dev Biol* 2017, 431(2): 111–23.
2. Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* 2014, 24(2): 90–9.
3. DF, Westgate EJ, FitzGerald GA. Peripheral circadian clocks in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27(8): 1694–705.
4. Mistlberger RE. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav* 2011, 104(4): 535–45.
5. Kim JH, Duffy JF. Circadian rhythm sleep-wake disorders in older adults. *Sleep Med Clin* 2018, 13(1): 39–50.
6. Duez H, Staels B. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diabetes Vasc Dis Res* 2008, 5(2): 82–8.
7. S. Chokroverty. Overview of sleep & sleep disorders. *Indian J Med Res* 2010, 131: 126–40.
8. Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian rhythm abnormalities. *Contin. Lifelong Learn. Neurol* 2013, 19(1): 132–47.
9. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Adv Drug Deliv Rev* 2010, 62(9–10): 967–78.
10. Özdemir PG, Ökmen AC, Yılmaz O. Vardiyalı çalışma bozukluğu ve vardiyalı çalışmanın ruhsal ve bedensel etkileri. *Curr Approaches Psychiatry* 2017, 10(1): 71-83.
11. Hittle BM, Gillespie GL. Identifying shift worker chronotype: implications for health. *Ind Health* 2018, 56(6): 512–23.
12. Gangwisch J. Epidemiological evidence for the links between sleep, circadian rhythms and metabolism. *Obes Rev* 2014, 10(2): 37–45.
13. Vadnie CA, McClung CA. Circadian rhythm disturbances in mood disorders: nsights into the role of the suprachiasmatic nucleus. *Neural Plast* 2017, 2017: 1-28.
14. Davies SK, Ang JE, Revell VL, Holmes B, Mann A, Robertson FP, Cui N, Middleton B, Ackermann K, Kayser M, Thumser AE, Raynaud FI. Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *Proc Natl Acad Sci* 2014, 111(29): 10761–6.
15. Chua EC-P, Shui G, Cazenave-Gassiot A, Wenk MR, Gooley JJ. Changes in plasma lipids during exposure to total sleep deprivation. *Sleep* 2015, 38(11): 1683–91.
16. Weljie AM, Meerlo P, Goel N, Sengupta A, Kayser MS, Abel T, Birnbaum MJ, Dinges DF, Seghal A. Oxalic acid and diacylglycerol 36:3 are cross-species markers of

sleep debt. *Proc Natl Acad Sci* 2015, 112(8): 2569–74.

17. Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J, Schibler U. The mammalian circadian timing system: From gene expression to physiology. *Chromosoma* 2004, 113(3): 103–12.

18. Selvi Y, Beşiroğlu L, Aydın A. Kronobiyoloji ve duygudurum bozuklukları-chronobiology and mood disorders. *Psychiatry Interpers Biol Process* 2011, 3(3): 368–86.

19. Güldür T, Otlı HG. Circadian rhythm in mammals: time to eat & time to sleep. *Biol Rhythm Res* 2017, 48(2): 243–61.

20. Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P. Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol Rev*. 2013, 93(1): 107–35.

21. Poggiogalle E, Jamshed H, Peterson CM. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metabolism* 2018, 84: 11-27.

22. Gnocchi D, Pedrelli M, Hurt-Camejo E, Parini P. Lipids around the clock: focus on circadian rhythms and lipid metabolism. *Biology* 2015, 4(1): 104–32.

23. Johnston JD, Frost G, Otway DT. Adipose tissue, adipocytes and the circadian timing system. *Obes Rev* 2009, 10(2): 52–60.

24. Hussain MM, Pan X. Clock regulation of dietary lipid absorption. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012, 15(4): 336–41.

25. Mattis J, Sehgal A. Circadian rhythms, sleep, and disorders of aging aging of central and peripheral circadian systems introduction to the circadian system. *Trends Endocrinol Metab* 2016, 27(4): 192–203.

26. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Sanna B, Alparslan MM, Kayrın L. Sirkadiyen saatin epigenetikle ilişkisi-Relationship between epigenetics and circadian clock. *Arşiv Archives Medical Review Journal* 2017, 26(1):50–62.

27. Polvani S, Tarocchi M, Tempesti S, Bencini L, Galli A. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2016, 22(8): 2441–59.

28. Wang YX. PPARs: Diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res* 2010, 20(2): 124–37.

29. Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab* 2014, 19(3): 380–92.

30. Pritchett D, Reddy AB. Circadian clocks in the hematologic system. *J Biol Rhythms* 2015, 30(5): 374–88.

31. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep and metabolism. *J Clin Invest* 2011, 121(6): 2133–41.
32. Pan X, Hussain MM. Diurnal regulation of microsomal triglyceride transfer protein and plasma lipid levels. *J Biol Chem* 2007, 282(34): 24707–17.
33. Bass J. Circadian topology of metabolism. *Nature* 2012, 491(7424): 348–56.
34. Shimizu H, Hanzawa F, Kim D, Sun S, Laurent T, Umeki M, Ikeda S, Mochizuki S, Oda H. Delayed first active-phase meal, a breakfastskipping model, led to increased body weight and shifted the circadian oscillation of the hepatic clock and lipid metabolism-related genes in rats fed a high-fat diet. *PLoS One* 2018, 13(10): 1-17.
35. Gooley JJ. Treatment of circadian rhythm sleep disorders with light. *Ann Acad Med* 2008, 37(8): 669–76.
36. Xie Z, Chen F, Li WA, Geng X, Li C, Meng X, Freng Y, Liu W, Yu F. A review of sleep disorders and melatonin. *Neurol Res* 2017, 39(6): 559–65.
37. Akıncı E, Orhan FÖ. Sirkadiyen ritim uyku bozuklukları. *Curr Approaches Psychiatry* 2016, 8(2): 178.
38. Foster RG, Kreitzman L. The rhythms of life: What your body clock means to you! *Exp Physiol* 2014, 99(4): 599–606.
39. Reinberg A, Ashkenazi I. Concepts in human biological rhythms. *Dialogues Clin Neurosci.* 2003, 5(4): 327–42.
40. Ramar K, Olson EJ. Management of common sleep disorders. *Am Fam Physician.* 2013, 88(4): 231–8.
41. Bass J. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science (80-)*. 2013, 330(6009): 1349–54.
42. Ellenbogen JM. Sleepiness. *Semin Neurol.* 2016, 36(5): 449–55.
43. Abdulkadiroğlu Z, Bayramoğlu F, İlhan N. Uyku ve uyku bozuklukları. *Genel Tıp Derg* 1997, 7(3): 161–6.
44. Uchiyama M, Lockley SW. Non-24-hour sleep-wake rhythm disorder in sighted and blind patients. *Sleep Med Clin* 2015, 10(4): 495–516.
45. Martinez D, Lenz MCS. Circadian rhythm sleep disorders. *Indian J Med Res* 2010, 131: 141–9.
46. Jagannath A, Taylor L, Wakaf Z, Vasudevan SR, Foster RG. The genetics of circadian rhythms, sleep and health. *Hum Mol Genet* 2017, 26(R2): 128–38.
47. Moller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, Lo JCY, Santhi N, von Schantz M, Smith PC, Dijk DJ. Effects of insufficient sleep on circadian



rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc Natl Acad Sci* 2013, 110(12): 1132–41.

48. Reutrakul S, Mokhlesi B. Obstructive sleep apnea and diabetes: a state of the art review. *Chest* 2017, 152(5): 1070–86.

49. Senaratna CV, Perret JL, Lodge C, Lowe A, Campbell BE, Matheson MC, Hamilton GS, Dharmage SC. Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. *Sleep Med Rev* 2017, 34: 70–81.

50. McNicholas WT. Obstructive sleep apnoea of mild severity: Should it be treated? *Curr Opin Pulm Med* 2017, 23(6): 506–11.

51. Franklin KA, Lindberg E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population-A review on the epidemiology of sleep apnea. *J Thorac Dis* 2015, 7(8): 1311–22.

52. Drager LF, Jun J, Polotsky VY. Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: implications for atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010, 17(2): 161–5.

53. Butler MP, Smales C, Wu H, Hussain MV, Mohamed YA, Morimoto M, Shea SA. The circadian system contributes to apnea lengthening across the night in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2015, 38(11): 1793–801.

54. von Allmen DC, Francey LJ, Rogers GM, Ruben MD, Cohen AP, Wu G, Schmidt RE, Ishman SL, Amin RS, Hogenesch JB, Smith DF. Circadian dysregulation: the next frontier in obstructive sleep apnea research. *Otolaryngol - Head Neck Surg* 2018, 159(6): 948–55.

55. Jun JC, Shin MK, Yao Q, Bevans-Fonti S, Poole J, Drager LF, Polotsky VY. Acute hypoxia induces hypertriglyceridemia by decreasing plasma triglyceride clearance in mice. *Am J Physiol Metab* 2012, 303(3): 377–88.

56. Chua ECP, Shui G, Lee ITG, Lau P, Tan LC, Yeo SC, Lam DB, Bulchand S, Summers SA, Puvanendran K, Rozen SG, Wenk M, Gooley JJ. Extensive diversity in circadian regulation of plasma lipids and evidence for different circadian metabolic phenotypes in humans. *Proc Natl Acad Sci* 2013, 110(35): 14468–73.

57. Mangold LU, Perrin L, Vandereycken B, Betts JA, Walhin JP, Templeman I, Chanonf S, Wegerg BD, Durandf C, Roberth M, Montoyai JP, Moniattei M, Karagounis LG, Johnstonl JD, Gachong F, Lefai E, Riezmann H, Dibner C. Lipidomics reveals diurnal lipid oscillations in human skeletal muscle persisting in cellular myotubes cultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2017, 114(41): 8565-74.

58. Kasukawa T, Sugimoto M, Hida A, Minami Y, Mori M, Honma S, Honma KI, Mishimad K, Sogab T, Ueda HR. Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proc Natl Acad Sci* 2012, 109(37): 15036–41.

59. Bertolucci C, Fazio F, Piccione G. Daily rhythms of serum lipids in dogs: Influences of lighting and fasting cycles. *Comp Med* 2008, 58(5): 485–9.
60. Bell LN, Kilkus MJ, Booth JN, Bromley LE, Imperial JG, Penev PD. Effects of sleep restriction on the human plasma metabolome. *Physiol Behav* 2013, 185(2): 974–81.
61. Cristina M, Messias F, Mecatti GC, Priolli DG, Carvalho PO. Plasmalogen lipids : functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Messias al Lipids Heal Dis* 2018, 17(41): 1–12.
62. Koivuniemi A. The biophysical properties of plasmalogens originating from their unique molecular architecture. *FEBS Lett.* 2017, 591(18): 2700–13.
63. Brouwers JFHM, Gadella BM, van Golde LMG Van, Tielens AGM. Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection. *J Lipid Res* 1998, 39: 344–53.
64. Dorninger F, Brodde A, Braverman NE, Moser AB, Just WW, Forss-petter S, Brügger B, Berger J. Homeostasis of phospholipids-The level of phosphatidylethanolamine tightly adapts to changes in ethanolamine plasmalogens. *BBA-Mol Cell Biol Lipids* 2015, 1851(2): 117–28.
65. Su XQ. Plasmalogens and Alzheimer’s disease: a review. *Lipids Health Dis* 2019, 18(100): 1-10.
66. Özmen M, Geçkil H, Yeşilada Ö. *Moleküler Hücre Biyolojisi*. 6. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2011; 567.
67. Maeba R, Ueta N. Determination of choline and ethanolamine plasmalogens in human plasma by HPLC using radioactive triiodide (1-) ion ( $^{125}\text{I}_3$ ). *Anal Biochem* 2004, 331(1): 169–76.
68. Jo DS, Cho DH. Peroxisomal dysfunction in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res* 2019, 42(5): 393-406.
69. Martinez M, Mougan I. Fatty acid composition of brain glycerophospholipids in peroxisomal disorders. *Lipids* 1999, 34(7): 733–40.
70. 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
71. Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *BBA-Mol Basis Dis* 2012, 1822(9): 1442–52.
72. Wood R, Snyder F. Quantitative determination of alk-1-enyl- and alkyl-glycerol ethers in neutral lipids and phospholipids. *Lipids* 1968, 3(2): 129–35.
73. Murphy EJ, Stephens R, Jurkowitz-Alexander M, Horrocks LA. Acidic hydrolysis

of plasmalogens followed by high-performance liquid chromatography. *Lipids* 1993, 28(6): 565–8.

74. Oswald EO, Piantadosi C, Anderson CE, Synder F. Infrared spectra and polymorphism of glycerol ether derivatives. *Chem Phys Lipids* 1967, 5: 270–81.

75. Blanc LE, Samuelsson J, Brohult J, Berg A, Palmblad J. Methoxy ether lipid inhibiting platelet activating factor-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative metabolism. *Biochem Pharmacol* 1995, 49(11): 1577–82.

76. Dean JM, Lodhi IJ. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell* 2018, 9(2): 196–206.

77. Snyder F. Thin layer chromatographic behavior of glycerolipid analogs containing ether, ester, hydroxyl, and ketone groupings. *J Chromatogr* 1973, 82: 7–14.

78. Gaposchkin DP, Zoeller R. Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants. *J Lipid Res* 1999, 40(3): 495–503.

79. Snyder F. The ether lipid trail: a historical perspective *BBA* 1999, 1436: 265-78.

80. Fuchs B. Analytical methods for (oxidized) plasmalogens: methodological aspects and applications. *Free Radic Res* 2015, 49(5): 599–617.

81. Goldfine H. The anaerobic biosynthesis of plasmalogens. *FEBS Lett.* 2017, 591(18): 2714–9.

82. Farooqui AA, Yang HC, Horrocks LA. Plasmalogens, phospholipases A<sub>2</sub> and signal transduction. *Brain Res Bull* 1995, 21(1): 152–61.

83. Paul S, Lancaster GI, Meikle PJ. Plasmalogens: a potential therapeutic target for neurodegenerative and cardiometabolic disease. *Prog Lipid Res* 2019, 74:186–95.

84. Leßig J, Fuchs B. Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Curr Med Chem* 2009, 16(16): 2021–41.

85. Honsho M, Abe Y, Fujiki Y. Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci Rep* 2017, 7: 1-13.

86. Honsho M, Fujiki Y. Plasmalogen homeostasis - regulation of plasmalogen biosynthesis and its physiological consequence in mammals. *FEBS Lett.* 2017, 591(18): 2720–9.

87. Rizzo WB. Fatty aldehyde and fatty alcohol metabolism: review and importance for epidermal structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2014, 1841(3): 377–89.

88. Sunshine H, Luisa M, Arispe I. Membrane lipids and cell signaling. *Curr Opin*

*Lipidol* 2017, 28(5): 408–13.

89. Dorninger F, Forss-Petter S, Berger J. From peroxisomal disorders to common neurodegenerative diseases—the role of ether phospholipids in the nervous system. *FEBS Lett.* 2017, 591(18): 2761–88.

90. 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: 137–46.

91. Wood R, Baumann WJ, Snyder F, Mancold HK. Gas-liquid chromatography of dialkyl, alkyl acyl, and diacyl derivatives of glycerol. *J Lipid Res* 1969, 10: 128–31.

92. Touchstone JC. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *J Chromatogr* 1995, 671: 169–95.

93. Nakamura W, Amada Y, Jimbo T, Otawa M. Studies on the streaming transparency of red blood cell suspension. *Jap J M. Sci Biol* 1958, 11: 161–8.

94. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959, 37(8): 911–17.

95. Mavis RD, Bell RM, Vagelos PR. Effect of phospholipase C hydrolysis of membrane phospholipids on membranous enzymes. *J Biol Chem* 1972, 247(9): 2835–41.

96. Blank ML, Cress EA, Piantadosi C, Snyder F. A method for the quantitative determination of glycerolipids containing O-alkyl and O-alk-1-enyl moieties. *Biochim Biophys Acta* 1975, 380: 208–18.

97. O’Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. *The Merck Index*. Thirteenth Edition. USA, 2001; 2072.

98. Snyder F, Piantadosi C, Malone B. The participation of I- and 2-isomers of o-alkylglycerols as acyl acceptors in cell-free systems. *Biochim Biophys Acta.* 1970, 202: 244–9.

99. Renkonen O. Chromatographic separation of plasmalogenic, alkyl-acyl, and diacyl forms of ethanolamine glycerophosphatides. *J Lipid Res* 1968, 87(3): 34–9

100. Dijk DJ, Duffy JF, Silva EJ, Shanahan TL, Boivin DB, Czeisler CA. Amplitude reduction and phase shifts of Melatonin, cortisol and other circadian rhythms after a gradual advance of sleep and light exposure in humans. *PLoS One* 2012, 7(2): 30037.

101. Bystrická Z, Ďuračková Z. Gas chromatography determination of fatty acids in the human erythrocyte membranes – A review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 2016, 115: 35–40.

102. 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.

103. Zoeller RA, Grazia TJ, LaCamera P, Park J, Gaposchkin DP, Farber HW. Increasing plasmalogen levels protects human endothelial cells during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 283: 671–9.

104. Zhao YZ, Liu XL, Shen GM, Ma YN, Zhang FL, Chen MT, Zhao HL, Yu J, Zhang JW. Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression via HIF-1-dependent mechanisms in HepG2 cell line. *Arch Biochem Biophys* 2014, 543: 40–7.

105. Grahb SA, Hayes AL, Rosen MJ, Patel SR. A pathway-based analysis on the effects of obstructive sleep apnea in modulating visceral fat transcriptome. *Sleep* 2013, 36: 23-30.

106. Narravula S, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$  expression during hypoxia. *J Immunol* 2001, 166: 7543–8.

107. Zhang HL, Zhang ZX, Xu YJ. Influence of hypoxia on peroxisome proliferator-activated receptor alpha and its mechanisms. *Chin J Tuberculosis and Respiratory Dis* 2003, 26(9): 535–8.

108. Tretyakov AV, Farber HW. Endothelial cell phospholipid distribution and phospholipase activity during acute and chronic hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993, 265(3): 770–80.

109. Kuypers FA. Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014, 28(2): 155–79.

110. Narla J, Mohandas N. Red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol* 2017, 39: 47–52.

111. Reed CF. Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog. *J Clin Invest* 1968, 47(4): 749–60.

112. Jiang XC. Phospholipid transfer protein: its impact on lipoprotein homeostasis and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2018, 59: 764-71.

113. Kunnen S, Eck MV. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis?. *J Lipid Res* 2012, 53(9): 1783–99.

114. 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.

115. Murakami M, Taketomi Y. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> and mast cells. *Allergol Int* 2015, 64(1): 4–10.

116. Oma S, Mawatari S, Saito K, Wakana C, Tsuboi Y, Yamada T, Fujino T. Changes in phospholipid composition of erythrocyte membrane in alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2012, 2(1): 298–303.
117. Pretorius E, du Plooy JN, Bester J. A comprehensive review on eryptosis. *Cell Physiol Biochem* 2016, 39(5): 1977–2000.
118. Kuypers FA. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. *Am Society Hematol* 2007, 2007(1): 68–73.
119. Bueno AA, Brand A, Neville MM, Lehane C, Brierley N, Crawford MA. Erythrocyte phospholipid molecular species and fatty acids of Down syndrome children compared with non-affected siblings. *Br J Nutr* 2015, 113: 72–81.
120. Moraitou M, Dimitriou E, Zafeiriou D, Reppa C, Marinakis T, Sarafidou J, Michelakakis H. Plasmalogen levels in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2008, 41: 196–9.
121. Antoku Y, Sakai T, Tsukamoto K, Goto I, Iwashita H, Kuroiva Y. A study on erythrocyte membrane plasmalogen in myotonic dystrophy. *J Neurochem* 1985, 44: 1667–71.
122. Wang-Sattler R, Yu Y, Mittelstrass K, Lattka E, Altmaier E, Gieger C, Ladwig KH, Dahmen N, Weinberger KM, Hao P, Liu L, Li Y, Wichmann HE, Jerzy Adamski J, Suhre K, Illig T. Metabolic profiling reveals distinct variations linked to nicotine consumption in humans - first results from the KORA study. *PLoS One* 2008, 3: 1–10.
123. Barnea M, Haviv L, Gutman R, Chapnik N, Madar Z, Froy O. Metformin affects the circadian clock and metabolic rhythms in a tissue-specific manner. *BBA-Mol Basis Dis* 2012, 1822: 1796–806.
124. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Francois Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 2000, 289: 2344–7.
125. Szabo B. Antiandrogenic effect of isotretinoin: Is the retina involved in mechanism of action? *Med Hypotheses* 2007, 69: 1281–3.
126. Siques P, Brito J, Naveas N, Pulido R, De la Cruz JJ, Mamani M, Velarde FL. Plasma and liver lipid profiles in rats exposed to chronic hypobaric hypoxia: changes in metabolic pathways. *High Alt Med Bio* 2014, 15: 388–95.

## **EKLER**

### **EK 1. ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı** : Emine KOÇ

**Doğum Yeri/yılı** : Adıyaman/1988

**Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
2014

**Yüksek Lisans** : İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik  
Botanik Anabilim Dalı, 2015-2019

**Yabancı Dil** : İngilizce

**e-posta** : emikocc25@gmail.com

## EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ

### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan uykusu bozukluklarında eritrosit o-alkil /o-alk-1-enil gliserolipid oranlarının ince tabaka kromatografisi ile kantitatif analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2016/198

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Salim YOLOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan uykusu bozukluklarında eritrosit o-alkil /o-alk-1-enil gliserolipid oranlarının ince tabaka kromatografisi ile kantitatif analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2016/198


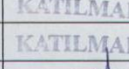
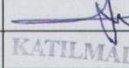
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2016/198	Tarih: 24.04.2019					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacı/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacı/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıyla katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Saim YOLOĞLU						

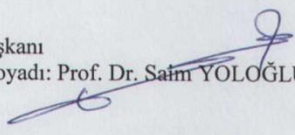
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma İle İlişkisi		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Saim YOLOĞLU (Başkan)	Biyoistatistik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İbrahim ŞAHİN	İç Hastalıkları	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sedat YILDIZ	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Barış OTLU	Mikrobiyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet GÜL	Histoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Cemalettin AYDIN	Genel Cerrahi	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hakan HARPULUOĞLU	Onkoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yılmaz TABEL	Çocuk Sağ. ve Hast.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		İnsan uyku bozukluklarında eritrosit o-alkil /o-alk-1-enil gliserolipid oranlarının ince tabaka kromatografisi ile kantitatif analizi							
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2016/198							
Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARATAŞ (raportör)	Tıp Tarihi ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sedat AKBAŞ	Anesteziyoloji Reanim.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Ecz. Necla DENİZ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Abdullah DEMİREL	Hukuk	Serbest Avukat	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hasan KONAN	Sivil Üye	MSD Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza: 

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

### EK 3. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

#### MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Sizi.....Prof.Dr.Tayfun Güldür tarafından yürütülen "İnsan uyku bozukluklarında serum o-alkil/o-alk-1-enil gliserolipid oranlarının ince tabaka kromatografisi ile kantitatif analizi" başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmamızın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Eğer anlayamadığımız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkında sahipsiniz. Çalışmadan ayrılmanız durumunda herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmayacak olup, hiçbir hak kaybına uğramadan araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen **Araştırma amacı** ile kullanılacaktır. **Araştırma yayınlansa bile isminiz ve kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli kalacak ve 3. bir şahısa verilmeyecektir.** Sizlerden biyolojik materyaller (kan, idrar, doku vs.) alındığı takdirde materyallerin neler olduğunu, hangi amaçla alındığı ve analizlerinin nerede yapılacağına dair bilgiler (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması) verilecektir. Hazırladığımız Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu, gönüllü veya kanuni temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içermez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülüğün kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

18 yaşının altındaki katılımcı/gönüllülerin, velayet veya vesayetindeki yasal temsilcilerine gerekli açıklamalar yapılarak bilgilendirildi. Çalışma için gerekli İzin/Onam alındı. **Çalışmaya katılmamız, soruları yanıtlamanız, araştırmaya katılım için onam/onay verdiğiniz anlamına gelmektedir.** Size verilen formlardaki soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayınız.

1. Araştırmamızın açık adı: "İnsan uyku bozukluklarında serum o-alkil/o-alk-1-enil gliserolipid oranlarının ince tabaka kromatografisi ile kantitatif analizi"
2. Gönüllüye çalışmamızın bir araştırma olduğunu açıkladınız mı? Evet
3. Araştırmamızın amacı nedir? İnsan uyku bozukluklarında teşhiste kullanılacak kan lipid parametrelerinin araştırılması.
4. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre nedir? Kan numunesi alımı için gerekli süre.
5. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı nedir? 60.
6. Varsa araştırmada uygulanacak tedaviler nelerdir? Uygulanacak tedavi yoktur.
7. Varsa farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma ihtimali var mı? Uygulanacak tedavi yoktur.

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

8. Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dâhil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümünü anlayabileceği ifadelerle açıklayınız: Koldan kan numunesi alınacaktır.
9. Araştırmanın deneysel kısımlarını açıklayınız: Kan hücrelerinde ve/veya serumda kromatografik yöntemle fosfolipid analizi gerçekleştirilecektir.
10. Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar dahil olmak üzere) açıklayınız: Kan alımı dışında herhangi bir girişim yapılmayacaktır. Beklenen bir risk yoktur.
11. Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığına gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirilecek mi? Evet.
12. Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve risklerini açıklayınız: Herhangi bir alternatif yöntem veya tedavi uygulanmayacaktır.
13. İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa gönüllüye verilecek tazminat (sigorta) ve / veya sağlanacak tedaviler, gereken masraflar..... tarafından karşılanacaktır.
14. Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler ..... tarafından karşılanacaktır .
15. Gönüllülerin sorumlulukları nelerdir, yazılı olarak listeyerek gönüllüye imzalatmış mı? Gönüllülerin sorumlulukları kan örneği vermektir.

**ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLARDA ARANACAK KİŞİ**

Uygulama süresince, zorunlu olarak araştırma katıldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da araştırma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki veya diğer rahatsızlıklarınız için herhangi bir saatte adresi ve telefonu aşağıda belirtilen ilgili hekime ulaşabilirsiniz.

**İstediginizde Günün 24 Saati Ulaşılabilir Araştırmacınızın Adres ve Telefonları:**

Dr. Hilal Ermiş.....

İş: .....3806..... Cep: (Mutlaka doldurulmalıdır. İş telefonu yeterli değildir)

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

**ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI**

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ		İMZASI:
ADI-SOYADI		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

**ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI**

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum ve çocuğuma anlayacağı şekilde açıkladım. Çocuğumun araştırmadan istediği zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğini biliyorum. Çocuğumun Anne/ Baba veya yasal vasi (kanuni temsilci) olarak araştırmaya gönüllü olarak katılmasına hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla kabul ediyorum.

VELİ/ VASI (Varsa)		İMZASI:
ADI-SOYADI		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ARAŞTIRMACI		İMZASI:
ADI-SOYADI ve GÖREVİ		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		