



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KONTROLLÜ OLARAK SİRKADİYEN RİTMİ
BOZULAN SIÇANLARIN ADİPOZ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİNDEKİ POTANSİYEL
DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Fatma Elçin KINIKLI AFŞAR

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Eser ELÇİN

ANKARA

2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONTROLLÜ OLARAK SİRKADİYEN RİTMİ
BOZULAN SIÇANLARIN ADİPOZ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİNDEKİ POTANSİYEL
DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Fatma Elçin KINIKLI AFŞAR

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
19L0216002 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

2020

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“Kontrollü Olarak Sirkadiyen Ritmi Bozulan Sıçanların Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerinin Özelliklerindeki Potansiyel Değişimlerin İncelenmesi”** başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Fatma Elçin KINIKLI AFŞAR

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Adipoz Dokunun Özellikleri	2
1.1.1. Adipoz Dokunun Bileşenleri	2
1.1.2. Adipoz Dokunun Lokalizasyonu	4
1.1.3. Adipoz Dokudan Salgılanan Hormonlar	5
1.2. Biyolojik Saat	7
1.2.1. Ultradiyan Saat	8
1.2.2. İnfradiyan Saat	8
1.2.3. Diurnal Saat	8
1.2.4. Sirkadiyen Saat	8
1.2.4.1. Sirkadiyen Saatin Moleküler Mekanizması	10
1.2.4.2. Sirkadiyen Saat Bozukluğunun Neden Olduğu Metabolik Hastalıklar	13
1.3. Sirkadiyen Saat ve Adipoz Doku İlişkisi	14
1.3.1. Vardiyalı Çalışmanın Metabolizma Üzerindeki Etkileri	16
1.4. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	17
1.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaşması	19
1.4.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerde Osteojenik Farklılaşma	19
1.4.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Kondrojenik Farklılaşma	20
1.4.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerde Adipojenik Farklılaşma	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	22
2.1.1. Deney Hayvanlarının Özelliklerinin Belirlenmesi	22
2.2.1. Deney Hayvanlarının Beslenme Düzeni	22
2.2.2. Barınakların Tasarımı ve Işıklandırması	23
2.2.3. Deney Hayvanlarının Karanlık/Aydınlık Döngüleri ve Faz Kaymalarının Değiştirilmesi	25
2.2.4. Deney Hayvanlarının Numaralandırılması	30
2.3. Deney Hayvanlarının Fiziksel Özelliklerindeki Değişimlerin Belirlenmesi	32
2.3.1. Boy Ölçümü	32
2.3.2. Ağırlık Ölçümü	32
2.3.3. Vücut Kitle İndekslerinin (BMI) Değerlendirilmesi	32
2.3.4. Vücut Sıcaklık Ölçümü	33
2.4. Deney Hayvanlarının Kan Biyokimyası ve Hematolojik Ölçümlerinin Yapılması	33
2.5. Deney Hayvanlarının Ötenazisi, Organ ve Yağ Dokusu İzolasyonu	33

2.6. Sodyum Dedosil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS PAGE)	34
2.6.1. Deney Hayvanlarından Elde Edilen Serumdaki Leptin Hormonunun Tespiti	34
2.6.1.1. Jel Hazırlanması	34
2.6.1.2. Örnek Hazırlama	35
2.6.1.3. Koşturma Tamponunun Hazırlanması	36
2.6.1.4. Örneklerin Yürütülmesi	36
2.6.1.5. Boyama ve Boyayı Uzaklaştırma Solüsyonlarının Hazırlanması	36
2.7. Tam Kandan mRNA Elde Edilmesi ve cDNA Sentezlenmesi	37
2.7.1. Tam Kandan mRNA Elde Edilmesi	37
2.7.2. Agaroz Jel Hazırlanması	38
2.7.2.1. Tris Borik EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanması	38
2.7.2.2. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneğin Yürütülmesi	38
2.7.3. mRNA'dan cDNA Sentezlenmesi	38
2.8. Dokudan Eksplant Kültür Yöntemiyle Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	40
2.9. Karaciğer Dokusunun Hematoksilen ve Eozin Boyaları ile Boyanması	41
2.9.1. Hematoksilen Boyası Hazırlama	41
2.9.2. Eozin Boyası Hazırlama	41
2.9.3. Karaciğer Dokusunun Boyanması	41
3. BULGULAR	43
3.1. Boy Boy Ölçüm Bulguları	43
3.2. Ağırlık Değişim Bulguları	45
3.3. BMI Değişim Bulguları	47
3.4. Hemogram Bulguları	49
3.5. Kan Biyokimyası Bulguları	52
3.6. Sıçanların Organ Ağırlıklarının İncelenmesi	54
3.7. Serumda Leptin Varlığının Tespiti	55
3.8. Kandan mRNA İzolasyonu, Agaroz Jel Yürütmesi ve cDNA Sentez	55
3.9. Karaciğer Dokusunun Hematoksilen ve Eozin Boyalarıyla Boyanması	56
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
ÖZET	69
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	86

ÖNSÖZ

Biyolojik saatin canlıların metabolizması ve günlük aktiviteleri üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Biyolojik saatlerden birisi olan sirkadiyen saatte meydana gelen bozuklukların başta obezite olmak üzere hipertansiyon, diyabetes mellitus ve kansere neden olduğu araştırmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada kontrollü olarak sirkadiyen saat ritmi bozulan sıçanların fiziksel özellikleri, kan hemogram ve biyokimyasal değerleri, organları ve adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin özelliklerindeki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans kapsamında bana bu tez konusunu veren, araştırmanın sorumluluğunu yüklenebileceğime güvenen ve her adımda gelişime katkı sağlayan derslerini severek dinlediğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her türlü bilimsel desteği sağlayan ve laboratuvar desteğini de esirgemeyen Sayın Prof.Dr.Y.Murat ELÇİN'e,

Çalışmalarım sırasında benden desteğini ve bilgisini hiç esirgemeyen hocam Hatice ERCAN'a,

Evlatları olmaktan her zaman onur duyduğum ve akademisyen olarak örnek aldığım annem Prof Dr. Gülay KINIKLI ve azmine, işine bağlılığına hep hayranlık duyduğum babam Doç. Dr. Sami KINIKLI'ya,

Bana okumayı öğretip, eğitim hayatımdaki ilk temelleri atan dedem Hüseyin KINIKLI ve beni büyüten babaannem Meliha KINIKLI'ya,

Verdiği eğitim ve öğretimle beni lkököl sıralarından üniversiteye taşıyan lkököl öğretmenim Sayın Sevil ÇELİK'e,

Bana varlığıyla güç veren, sadece çalışma süresince değil tanıştığımız ilk günden bugüne kadar yardımlarını eksik etmeyen varlıklarından sonsuz güç aldığım değerli annem Gamze AFŞAR ve değerli babam Erdal AFŞAR'A,

Hayatımda aldığım büyük kararlardaki en büyük destekçim, yol gösterenim ve emin adımlarla ileri gitmemi sağlayan, her konuda ilham kaynağım Sevgili eşim Anıl AFŞAR'A,

Teşekkür ederim.



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre ve Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Yüzey Belirteçleri	19
Şekil 2.1. Çalışmada barınak olarak kullanılan kutulara açılan pencerelerin gösterilmesi.	24
Şekil 2.2. Çalışmada barınak olarak kullanılan kutuların perdeyle kapatılmış halinin gösterimi.	24
Şekil 2.3. Çalışmada barınak olarak kullanılan kutuların ışıklandırma düzeneğinin gösterimi	25
Şekil 2.4. Deney hayvanların numaralandırılmasının gösterimi.	31
Şekil 2.5. Sodyum dedosil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi düzeneğinin gösterimi. a) elektroforez kısmının gösterimi. b) Protein içerikli karışımın jel üzerindeki dağılım ve gösterimi	36
Şekil 3.1. Çalışma süresi boyunca yapılan ölçümlere göre grup içi ve gruplar arası boy değişim grafiği. * ile ifade edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.	45
Şekil 3.2. Çalışma süresi boyunca yapılan ölçümlere göre grup içi ve gruplar arası ağırlık değişim grafiği. * ile ifade edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.	47
Şekil 3.3. Çalışma süresi boyunca yapılan ölçümlere göre grup içi ve gruplar arası BMI değişim grafiği. * ile ifade edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.	49
Şekil 3.4. Serum leptin proteininin tespiti için yapılan SDS PAGE çalışmasının gösterimi	55
Şekil 3.5. Kandan elde edilen mRNA'nın %2'lik agaroz jelde yürütülmesi.	56
Şekil 3.6. Normal sıçan karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoksilen eozin ile boyanmış preparatlarının gösterimi. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme)	57
Şekil 3.7. Grup 1'deki sıçanların karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoksilen eozin ile boyanmış preparatları görülmektedir. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme)	57

- Şekil 3.8.** Grup 2'deki sıçanların karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoksilen eozin ile boyanmış preparatları görülmektedir. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme) 58
- Şekil 3.9.** Grup 3'teki sıçanların karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoksilen eozin ile boyanmış preparatları görülmektedir. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme) 58
- Şekil 3.10.** Sıçanlarda makroveziküler karaciğer yağlanması gösterimi (100 μm büyütme). 59
- Şekil 4.1.** Çalışmamızda yer alan sıçanların periton üzerinde ve organlar çevresinde biriken yağ dokusunun görünümü. 62



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Adipoz dokunun tiplerinin insan vücudundaki lokalizasyonu	4
Çizelge 1.2. Sirkadiyen moleküler mekanizmasının saat görevi ve düzenlenmesi	10
Çizelge 2.1. Sıçanların yemlerinin besin içeriği	23
Çizelge 2.2. Grup 1 Sıçanların faz döngülerinin gösterimi. Mavi bloklar karanlığı, sarı bloklar aydınlığı temsil etmektedir.	26
Çizelge 2.3. Grup 2 sıçanların faz döngülerinin gösterimi. Mavi bloklar karanlığı, sarı bloklar aydınlığı temsil etmektedir.	28
Çizelge 2.4. Grup 3 sıçanların faz döngülerinin gösterimi. Mavi bloklar karanlığı, sarı bloklar aydınlığı temsil etmektedir.	29
Çizelge 2.5. Kontrol grubu sıçanların faz döngülerinin gösterimi. Mavi bloklar karanlığı, sarı bloklar aydınlığı temsil etmektedir.	30
Çizelge 2.6. cDNA sentezi için hazırlanacak kalıp primer karışımının 1 reaksiyon için hazırlanma oranları.	39
Çizelge 2.7. Reverse transcriptase (RT) karışımı için eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları.	40
Çizelge 3.1. Çalışmanın ilk (0.gün), orta (35.gün) ve son (70.gün) günlerinde yapılan boy ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi	44
Çizelge 3.2. Çalışmanın ilk (0. gün), orta (35. gün) ve son (70. gün) günlerinde yapılan ağırlık ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi.	46
Çizelge 3.3. Çalışmanın ilk (0.gün), orta (35.gün) ve son (70.gün) günlerinde yapılan BMI ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi.	48
Çizelge 3.4 Sıçanların hematolojik parametrelerinin normal değerleri (Johnson ve ark., 1996)	50
Çizelge 3.5. Çalışmanın ilk (0. gün), orta(35. gün) ve son (70. gün) günlerinde test edilen hematolojik parametrelerin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak	

değerlendirilmesi.(-) olarak ifade edilen alanlarda analiz için yeterli kan örneği bulunmadığından çalışma yapılamamıştır.	50
Çizelge 3.6. Çalışmanın ilk (0. gün), orta(35. gün) ve son (70. gün) günlerinde yapılan biyokimya analizi değerlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi. (-) ile ifade edilen alanlarda analiz için yeterli kan örneği bulunmadığından çalışma yapılamamıştır.	52
Çizelge 3.7. Sıçanların biyokimyasal parametrelerinin normal değerleri	54
Çizelge 3.8. Sıçanlar kurban edildikten sonra çıkarılan organlar ve yağ dokusunun tartılarak ağırlıklarının değerlendirilmesi.	54



1. GİRİŞ

Canlıların fizyolojileri, metabolik aktiviteleri, davranış özellikleri ve hastalıkları biyolojik saatlerinde meydana gelen değişimlere bağlıdır. Tüm canlıların vücut faaliyetleri belirli bir döngü ve düzen içerisinde gerçekleşir. Yımdört saatlik periyotlarla gerçekleşen bu durum “biyolojik saat” olarak adlandırılır. Biyolojik saat içinde en önemlisi de sirkadiyen ritimde meydana gelen değişimlerdir. Sirkadiyen ritim 24 saat içerisinde aydınlık ve karanlığa bağlı olarak gerçekleşen olayları kontrol eder. Sirkadiyen ritmin metabolizma üzerinde nasıl bir etki yaptığı öne çıkan bir konudur. Bu tezde sirkadiyen ritim ile obezite arasında meydana gelen ilişki incelenmiştir. Çalışmamızda sirkadiyen ritmi kontrollü olarak bozulan sıçanların mezenkimal kök hücre özellikleri ve gen ifadelerindeki değişimler analiz edilmiştir. Oluşturulan deney grupları günümüzde vardiya sistemiyle çalışılan meslek grupları örnek alınarak hazırlanmıştır. A.Ü Etik kurulundan 2019-12-122/42 numaralı izin alınarak bu tez gerçekleştirildi. Bu çalışmada toplam 4 deney grubu olarak düzenlendi:

Grup 1: (12 saat ışık: 12 saat karanlık) (kontrol);

Grup 2: (her 5 günde bir 6 saat faz ilerlemesi ile 24 saat aydınlık-karanlık çevrimleri (Gelişmiş);

Grup 3: (her 5 günde bir 6 saat faz gecikmeleri olan 24 saat aydınlık-karanlık çevrimleri (Gecikmeli));

Grup 4: (her 5 günde bir faz kayması olan 24 saat açık-koyu çevrimler, alternatif faz ilerlemeleri ve gecikmeler (İleri-Gecikmeli).

Bu gruplardan alınan BMI, kan ve yağ dokusu örnekleri ile adipozik mezenkimal kök hücre üretilmeye çalışılmıştır. Ayrıca deney gruplarından elde edilen kan örnekleri, yağ ve karaciğer dokusu incelenmiştir.

1.1. Adipoz Dokunun Özellikleri

1.1.1. Adipoz Dokunun Bileşenleri

Adipoz doku bilinen adıyla “yağ dokusu”; lipidle dolu hücrelerden meydana gelen, etrafında kollajen liflerin oluşturduğu matriks, kan damarları, fibroblastlar ve immün hücreler bulunan gevşek bir bağ dokusudur (Rexford ve ark., 2000). Adipoz dokusu (yağ dokusu), mezodermal kökenli kompleks bir dokudur. Adipoz doku erişkin adipositler, preadipositler, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, yerleşik monosit/makrofajlar ve lenfositler gibi bir çok hücreyi barındırır (A. Schäffler ve ark., 2007; Zuk ve ark., 2001). İnsanlarda doğum öncesinde başlayan adipoz dokusu oluşumu insan yaşamı boyunca devam eder. Canlılarda oluşan adipoz dokusu kilo alındıkça vücudun belirli bölgelerinde toplanmaya başlar.

Adipoz dokuya gelişimsel yönden bakıldığında; beyaz ve kahverengi doku olmak üzere ikiye ayrılır (Ergün ve ark., 2005; Prunet-Marcassus ve ark., 2006 ve Rexford ve ark., 2000;). Beyaz adipoz doku (*uniloküler*) rengini genellikle hücre içerisindeki yağ damlacıklarında çözünme yeteneği olan vitaminlerin varlığına bağlı olarak alır. İçeriğindeki karotenoidlere bağlı olarak rengini alan doku, çıplak gözle de gözlenir (Bourin ve ark., 2013; Park ve ark., 2014). Beyaz adipoz dokunun bilinen en önemli görevleri enerji depolaması ve vücudun yakıt ihtiyacı olduğu zaman yağ asidi salgılamasıdır. Bu tip yağ dokusu genellikle normal glukoz homeostazını sağlamada ve inflamatuvar süreçlerde görev alır (Trayhurn ve ark., 2004).

Beyaz adipoz dokudan leptinin, anjiotensinojen, adipsin, asilasyon stimule edici protein, adiponektin, retinol bağlanma proteini, tümör nekrozis faktör alfa, interlökin 6, plasminojen aktivatör inhibitör 1 ve doku faktörü salgılanır. Bu proteinlerin bir kısmı inflamatuvar sitokinler, bir kısmı lipid metabolizmasında rol oynayan ve bazıları ise vasküler homeostaz ve kompleman sistemine katılan proteinlerdir. İçlerinden açlık ve obezite ile ilişkilendirilen **Leptin**; beyaz adipoz hücreleri tarafından salgılanan, enerji dengesinde kritik bir rol üstlenen ve beyaz adipoz dokusuna endokrin özellik

kazandıran bir hormondur (Trayhurn ve ark., 2001). Beyaz adipoz doku vücutta bulunduğu yere göre sınıflandırılır (Kim ve ark., 2016). Beyaz adipoz doku deri altında bulunduğu, subkutan yağ dokusu olarak adlandırılır. Deri altında subkutan olarak bulunan beyaz adipoz doku temel adipoz dokudur. Diğer yandan visseral beyaz adipoz doku ise iç organları sarmalar (Kim ve ark., 2016; Smorlesi ve ark., 2012;). Beyaz adipoz dokusu, kahverengi yağ dokusuna göre daha az sinir ve damar içerir. Visseral beyaz adipoz doku ve temel adipoz doku arasındaki en önemli fark visseral beyaz adipoz dokunun insülin hassasiyetinde bozulma, tip 2 diyabetes mellitus ve diğer obezite gibi metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmesidir (Gaich ve ark., 2013; Smorlesi ve ark., 2012).

Bir diğer adipoz dokusu tipi olan kahverengi adipoz doku (*multiloküler*), içerisinde çok sayıda mitokondri bulundurmaktadır (Bourin ve ark., 2013; Park ve ark., 2014). Kahverengi adipoz dokusunun görevi enerjiyi besinden ısıya dönüştürmektir. Bu adipoz doku tipi bebeklerin toplam vücut ağırlığının %2'sini oluşturur. Kahverengi adipoz dokunun temel iki görevi olan ısı üretimi ve doku içerisinde depolanma süreci, sempatik sinir sisteminin bir hormonu olan norepinefrin tarafından kontrol edilmektedir. Kahverengi adipoz doku tarafından ısı üretimi işlevi, organizma ekstra ısıya ihtiyaç duyduğunda aktive olur. Bu duruma örnek olarak doğum sonrası ve kış uykusundan uyanma dönemi verilebilir. Kahverengi adipositler sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri barındırarak, uncoupling Protein 1(UCP1) ifade ederler. Bu protein UCP, titremsiz termogenezden sorumludur (Saely ve ark., 2010).

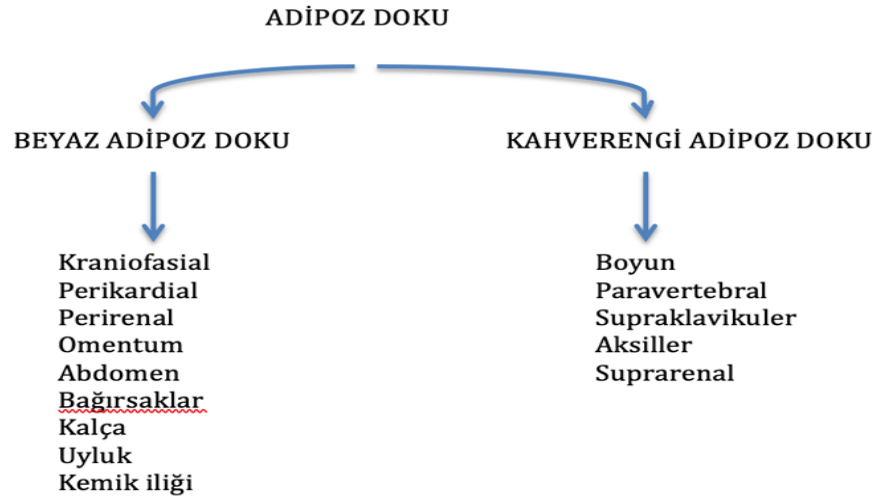
Bazı beslenme şekilleri de kahverengi dokunun aktivasyonuna yol açabilir. Örneğin; düşük proteinli diyetler leptin bağımlı adipoz dokusu depolanmasına yol açar. Kahverengi adipoz doku aktive olduğunda doku içinde yüksek miktarda yağ ve glukoz yakılır (Cannon ve ark.,2004). Erişkin bir insanda 50g kahverengi adipoz dokusunun uyarılması ile günlük enerji ihtiyacının %20'si karşılanır (Cypess ve ark.,2009). Günümüzdeki çalışmalar; kahverengi adipoz dokunun oksidatif fonksiyonu sayesinde bazal metabolizma hızını önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir. Bu durum enerji açığı yaratarak vücut kitle endeksini (BMI) azaltır (Saely ve ark.,2010). Kahverengi adipoz dokusunun değişmediği ve farklı bir adipoz

dokusu tipine dönüşmediği kabul edilmektedir (Bourin ve ark., 2013; Park ve ark., 2014).

1.1.2. Adipoz Dokunun Lokalizasyonu

Adipoz doku vücutta birçok bölgede bulunur. Beyaz adipoz doku derinin subkutan katmanı; kalp, böbrek ve sinir dokusunun çevresi; sarı kemik iliği, meme dokusu ve abdominal boşluk gibi bulunurken, kahverengi adipoz doku daha spesifik bölgelerde yer alır. Yetişkinlerde, sırt bölgesinde, boyunda, omuzda ve omurga etrafında küçük bir katman olarak kahverengi adipoz doku bulunur (Stephens ve ark.,2012). Erişkinlerde adipoz dokunun tiplerinin lokalizasyonu Çizelge 1.1.'de görülmektedir. Bebeklerde yağ doku dağılımı incelendiğinde daha yüksek miktarda kahverengi adipoz doku bulunur. Bebeklerdeki kahverengi yağ dokusu daha çok sırt bölgesinde toplanmıştır ve ısı üretimi için oldukça önemlidir (Park ve ark., 2014).

Çizelge 1.1. Adipoz dokunun tiplerinin insan vücudundaki lokalizasyonu (Stephens ve ark., 2012).



1.1.3. Adipoz Dokudan Salgılanan Hormonlar

Adipoz doku sadece yağ depolayan bir doku olarak düşünülmemelidir. Bilindiği gibi adipoz doku tüm metabolizmaya ile etki etmektedir (Kershaw ve ark.,2004). Bir endokrin organ olarak adipoz doku birçok hormonun sentez ve salgılanmasından sorumludur. Bu hormonlar besin alımı (leptin ve anjiotensin), insülin duyarlılığı ve inflamatuvar süreçler (tümör nekroz faktörü alfa, interlökin 6, resistin, visfatin, adiponektin) gibi vücudun en önemli mekanizmalarını kontrol ederler (Coelho ve ark.,2013). 1990'lı yılların ortasında leptinin keşfi ile adipoz dokudan salgılanan proteinlerin önemi ortaya çıkmıştır.

Leptin, hipotalamustaki spesifik hormonlar üzerinde etkilidir. Bu sebeple iştahı arttıran ve azaltan etkilere sahiptir. Leptin bağırsaktan salgılanan nöropeptid Y adı verilen iştah uyarıcısını ve kanabinoid nörotransmitter olan adandamini etkisiz hale getirir. Bunun yanı sıra leptin bir iştah baskılayıcısı olan α -melanosit uyarıcı hormonun sentezlenmesini de sağlar (Ashwini ve ark.,2010).

Adipoz doku tarafından sentezlenip salgılanan leptinin keşfi obezite tedavisi konusunda büyük bir gelişim sağlamıştır. Prototip olarak adipositlerden salgılanan leptinin adı, Yunanca kökenli bir kelime olan ve ince anlamına gelen "leptos" tan köken almaktadır. Leptin hormonu adipoz dokuyu sadece enerji depolayan bir organ olmaktan çıkarıp, bir endokrin doku özelliği kazanmasını sağlamıştır. Leptin, beyaz adipoz dokudan salgılanır ve vücuttaki yağ miktarı ile doğru orantılıdır. Diğer hormonlar gibi leptin de pulsatil düzende, sirkadiyen saat ritminde döngüde sentezlenir ve salgılanır. Leptin seviyesinin farklılıkları adipoz dokuda enerji depolanması ve kalori alımındaki akut değişimlere neden olur (Kelesidis ve ark., 2011). Leptin eksikliği olan kişilerde leptin replasmanı, enerji dengesinin kurulmasında, glukoz homeostazında, nöroendokrin ve kognitif bozuklukların tedavisinde oldukça etkili olmuştur (Farooqi ve ark.,1999; Farooqi ve ark., 2002; Licinio ve ark.,2004). Leptin geninde meydana gelen mutasyon ile inaktif olan leptin, rekombinant insan leptiniyle normalize edildikten sonra yeme alışkanlıkları düzelerek kilo kaybı engellenmiştir (Wabitsch ve ark.,2015). Leptinin obez insanların

tedavisindeki yerini anlamak için, leptin geninde herhangi bir mutasyon olmayan insanların incelendiği birçok klinik çalışma bulunmaktadır. Gastrik bypass ameliyatı geçiren hastalarda dış kaynaklı leptin tedavisi, kilo kaybıyla ilişkili ya hiçbir etki göstermemiş ya da çok az bir etkisi görülmüştür (Heymsfield ve ark.,1999; Lejeune ve ark.,2003). Bu sonuçlar obez hastaların halihazırda bozuk olan leptin düzeylerinin düzeltilmesi için dış kaynaklı leptin kullanımının vücut ağırlığı düzenlenmesine etki etmediğini göstermektedir. Çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda obez hastalarda tedavi olarak leptin kullanımı çok etikili görülmemektedir. Ancak açlık ve doyum ile ilgili sorunları olan hastalarda ise leptin kullanımı oldukça etkilidir (Kissileff ve ark., 2012; Rosenbaum ve ark., 2008).

Leptin yağ dokusundan salgılandığından, yağ dokusunda meydana gelen herhangi bir problem leptin serum düzeyini de etkilemektedir. Doğumsal veya kazanılmış yağ dokusunun dağılımında bozukluk (lipodistrofi), anormal veya hasar görmüş adipoz dokuyla karakterize olur. Bu durum yağ dokusunun depolanmasında bozuklukla seyreder. Kazanılmış yaygın dislipidemi insülin direncine, hiperglisemiye ve karaciğer yağlanmasına sebep olabilir. Kazanılmış serum lipid düzeyindeki bozukluğa sahip hastaların serum leptin seviyeleri düşüktür. Bu hastaların tedavisinde leptin kullanılmaktadır.

Birçok çalışma tip 2 diyabetes mellitus tedavisinde leptin kullanımının olumlu sonuç verdiğini göstermektedir (Mittendorfer ve ark., 2011; Moon ve ark., 2011). Ayrıca, bu çalışmalar leptin tedavisinin tip 1 diyabetes mellitus üzerinde etkili olabileceği de kanıtlanmıştır (Raskin ve ark., 1978). Bu bilgilerin yanı sıra Leptinin puberte ve menstrual siklus üzerinde de etkisinin bulunduğu bilinmektedir (Ashwini ve ark.,2010). Leptin seviyesi puberte öncesi artmakta ve leptin seviyesinde meydana gelen eksiklik pubertede gecikmeye neden olmaktadır (Yardımcı ve ark., 2019).

1.2. Biyolojik Saat

Tüm canlıların yaşamsal fonksiyonlarının doğru zamanda gerçekleştirilmesini sağlayan ve “*biyolojik saat*” adı verilen bir mekanizma bulunmaktadır (Şenel ve ark.,2008; Pfaff ve ark.,2018). Bu mekanizma, canlıların bulunduğu ortamdaki değişikliklerden en az düzeyde etkilenmelerini ve yaşadığı çevreye uyum göstermelerini sağlayarak hayatta kalma şanslarını arttırmaktadır. Biyolojik saat, canlıların belirli aralıklarla tekrar eden ve yaşadıkları çevreye adaptasyonlarını sağlayan fizyolojik olayları kontrol eder (Breed ve ark., 2017). Canlıların sahip oldukları bu biyolojik saat sayesinde hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlerler. Biyolojik saatin kontrolü altında hücre artışı veya azalışı, melatonin ve kortizol gibi hormonların üretilmesi, uyku – uyanıklık süresi, vücut sıcaklığının düzenlenmesi ve üreme fonksiyonlarının belirlenmesi gibi bir çok yaşamsal olay gerçekleşmektedir. Bu bağlamda doğadan çeşitli örnekler verilebilir: Bitkilerin sonbahar ve kış mevsiminde yapraklarını dökmesi, çiçekli bitkilerin bahar ve yaz mevsimlerinde çiçeklenmesi, kutup ayısı ve sincap gibi hayvanların kış uykusuna yatması, havalar soğduğunda kuşların daha sıcak ülkelere göç etmesi gibi daha birçok olay sayılabilir.

Dört çeşit biyolojik saat vardır:

1- Ultradiyen saat

2- İnfradiyen saat

3- Diurnal saat

4- Sirkadiyen saat

1.2.1. Ultradiyan Saat

Nabız, yeme, içme, mide ve solunum hareketleri, REM ve REM olmayan uyku dönemleri gibi bir günlük süre içerisinde birden fazla döngüsü olan ritimlerdir. Ultradiyan saatin periyodu 24 saatten daha kısadır (Stupfel ve ark.,1991). Ultradian saat genel olarak uyku araştırmalarında 90-120 dakikalık uyku fazları döngüsünü tanımlamak için kullanılır (Ja ve ark.,2002).

1.2.2. İnfradiyan Saat

Menstrual döngü, erkeklerde testesteron salınım döngüsü ve mevsimsel afektif bozukluk sendromu gibi periyodu, bir günlük süreden daha uzun olan saat çeşidine infradiyan saat denir (Young ve ark.,2000).

1.2.3. Diurnal Saat

Bir günlük yani 24 saatlik periyoda sahip olan biyolojik saat çeşidine diurnal saat adı verilir. Döngüler endojen olmadıkça, sirkadiyen ritm yerine diurnal ritm olarak adlandırılır (Viaterna ve ark., 2001).

1.2.4. Sirkadiyen Saat

Periyodu 24 saat olan biyolojik saat çeşidine sirkadiyen saat adı verilir. Bir biyolojik saatin sirkadiyen saat olabilmesi için belirtilmiş olan 3 özelliği karşılaması gerekir:

1-Öncelikle endojen serbest devinimli 24 saatlik bir periyot içerisinde gerçekleşmelidir.

2-Çevresel uyarılar ile faz değiştirebilmeli ve 24saatlik bir güne senkronize olabilmelidir.

3-Sıcaklık değişimlerini kompanze edebilmelidir (Johnson ve ark., 2004).

Sirkadiyen kelimesi (ing: *circadian*), latince kökenli ‘*circa diem*’ kelimesinden türetilmiştir. *Circa diem* kelimesi, günlük ya da yaklaşık bir gün anlamına gelmektedir. Dünyada bulunan tüm canlılarda mevcut olan sirkadiyen saat, canlıların buldukları ortama uyum sağlamak suretiyle hayatta kalmalarını temin eder (Bollinger ve ark., 2014). Sirkadiyen ritim dünyanın kendi eksenini etrafında yaklaşık 24 saat süren dönüşünün canlılar üzerinde oluşturduğu biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal ritimlerin tekrar edilmesi olarak da tanımlanmaktadır (Sözlü ve Şanlıer, 2017). Sirkadiyen saatin kontrol ettiği olayların başında, uyku-uyanıklık düzeni gelmektedir (Bollinger ve ark., 2014).

Canlılarda sirkadiyen saat ritmi genlerle ayarlanır ve bunlara saat genleri denir. Memelilerde saat genleri suprakiazmatik nükleusta ifade edilir. Birçok saat geni salınım biçiminde transkripsiyonel ve translasyonel seviyede ifade olur (Daan ve ark., 2001; Nuesslein-Hildesheim ve ark., 2000). Saat genlerinin ifadesi sadece suprakiazmatik nükleusta değil birçok dokuda gerçekleşir (Albrecht ve ark., 1997; Sun ve ark., 1997). Sirkadiyen genlerinin ifadesi periferik organlardan hücre kültürüne kadar birçok durumda meydana gelir. Bu durum sirkadiyen ritmin bir hücre veya hücre tipine özgü olarak gerçekleşmediğini gösterir (Balsalobre ve ark., 2000). Organizmadaki birçok olay üzerinde sirkadiyen ritmin etkileri bulunmaktadır. Örneğin; Pocock ve arkadaşlarının (1989), 7685 orta yaşlı sağlıklı İngiliz erkek bireyden açlık kanı alınarak 25 biyokimyasal ve hematolojik ölçüm yaptıkları çalışmalarında, ölçümlerin çoğunda diurnal farklılık gözlemlenmiş olup, bilirubin, fosfat ve trigliserit %5’ten daha fazla çeşitlilik göstermiştir. Serum bilirubin konsantrasyonu akşam üzeri azalan bir eğri göstermiş, sabah saat 6’dan sonra ortalama değerin %30 altına düşmüştür. Ortalama serum trigliserit ve fosfat konsantrasyonu gün boyunca sabit şekilde artmıştır. Potasyum, hemoglobin, hematokrit ve kırmızı hücre sayısı sabahları en yüksek değere ulaşmıştır. Üre, kreatinin konsantrasyonu ve beyaz

hücre sayısı akşamları daha yüksek bulunmuştur. Glukoz değerinin ise yemek saatlerine göre değişkenlik gösterdiği gözlemlenmiştir.

1.2.4.1. Sirkadiyen Saatin Moleküler Mekanizması

Sirkadiyen ritmin arkasındaki temel moleküler mekanizmalar Clock ve Bmal1 olarak adlandırılan iki transkripsiyon faktörü ve bunların hedefleri olan Per1, Per2, Per3 ve Cry1, Cry2 genlerine dayandırılmaktadır. Clock, Bmal1 ile heterodimerize olduğu zaman aktive olur. Bu sayede Per1, Per2, Per3, ve Cry1, Cry2 genlerinin transkripsiyonu sağlanır (Gery S ve ark., 2006; Hastings ve ark., 2007; Sancar ve ark., 2010; Lamont ve ark., 2007). Bu transkripsiyon faktörleri, genlerin düzenlenmesi ve saat görevleri Çizelge 1.2.'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Sirkadiyen moleküler mekanizmasının saat görevi ve düzenlenmesi (Beckett ve ark., 2009)

GEN	SAAT GÖREVİ	DÜZENLENMESİ
Per 1	PER/CRY etkileşimi, CLOCK/BMAL1 İnhibitörü	Retina ve periferik dokuda geçici olarak ışıkla indüklenir.
Per 2	PER/CRY etkileşimi, CLOCK/BMAL1 İnhibitörü	Retina ve periferik dokuda geçici olarak ışıkla indüklenir.
Per 3	PER/CRY etkileşimi,	Retina ve periferik dokuda ritmik olarak ifade olmaz veya haftalık ritmik ifade olur.
Cry 1	PER lerle etkileşim, CLOCK/BMAL1 İnhibitörü	İnsandaki sentezi ışık tarafından düzenlenir.
Cry 2	PER lerle etkileşim, CLOCK/BMAL1 İnhibitörü	İnsandaki sentezi ışık tarafından düzenlenir.
Tim	PER ile dimerize olmak	Belirli bir ritimde ifade olur.
Clock	Transkripsiyon faktörü	Belirli bir ritimde ifade olmaz.
Bmal1 (mop3)	Transkripsiyon faktörü	Sıçanlarda belirli bir ritimde ifade olurken farelerde belirli bir ritimde ifade olmayabilir.

Her bir saat genisaat döngüsü için aynı öneme sahipse bu genlerin her birinin yokluk mutasyonu ritm düzensizliğine sebep olmalıdır. Spesifik saat genlerinin kaybı veya mutasyonu periyot uzunluğunu değiştirebilir (Cry1, Cry2, Per1, Per3) yada

sirkadiyen ritmin yavaş (Clock,Per2) veya hızlı (Bmal1) olmasına yol açabilir (Zheng ve ark., 2001).

Memeli hayvanlarda sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde Cry1, Cry 2 genleri ve Per1 ve Per2 genleri birlikte çalışmaktadır. Bu genlerden Cry1 ve Cry2 genlerinin her ikisinde mutasyona uğradığı durumda, Per1 ve Per 2 genlerinde de mutasyon meydana gelmişse memeli hayvanlar sirkadiyen saat ritimlerini kaybetmiştir (Van der Horst ve ark.,1999; Viterna ve ark.,1999; Jin X ve ark.,2001). Ancak Per3 geninin delesyonu sirkadiyen saat ritmini ihmal edilebilecek seviyede değiştirmiştir (Shaerman ve ark., 2000). Bu durumla benzer olarak Per1/Per3 genlerinin her ikisi de mutant olan fareler ile Per 2/Per3 geninin her ikisi de mutant olan fareler yalnız Per1 ve yalnız Per2 mutant olan farelerin fenotipini göstermişleridir (Shaerman ve ark.,2000). Bu da sirkadiyen saat ritminin sağlanmasında saat genlerinin her birinin aynı öneme sahip olmadığını göstermektedir. Saat genlerinden sabit karanlıkta delesyonu, en hızlı ritm bozulmasına sebep olan Bmal1 genidir. Bmal1 delesyonunda, moleküler seviyede Suprakiazmatik nükleusta Per1 ve Per2 gen ifadesi görülmez. Bu durum Bmal1 geninin Per genlerini pozitif olarak düzenlediğini göstermektedir (Bunger ve ark.,2000). Dominant negatif Clock geni mutasyonunda, Bmal1 geninin Per genlerinin ifadesine etkisi; Clock/Bmal1 transkripsiyon faktör kompleksinin aktive edici rolü ile uyumlu olarak çalıştığı gösterilmiştir (Gekakis ve ark.,1995; King ve ark.,1997).

Cry1 ve Cry2 genleri olmayan farelerde yapılan çalışmalarda da ritm bozulması gözlemlenmiştir (Van der Horst ve ark.,1999; Vitaterna ve ark.,1994). Bu farelerin suprakiazmatik nükleuslarında ve periferik dokularında döngüsel olmayan, sabit Per1 ve Per2 ifade edilmektedir (Okamura ve ark.,1999). Cry1 ve Cry2 geni olmayan farelerle yapılan çalışmalar, Cry genlerinin Per genleri üzerinde negatif düzenleme etkisi olduğunu göstermektedir. Cry1 ya da Cry2 genleri olmayan fareler, periyot süreleri değişerek aritmik özellik gösterirler. Cry1 geni negatif olan farelerin periyot süreleri 24 saatten daha kısa iken; Cry2 geni negatif olan farelerin periyot süreleri 24 saatten daha uzundur (Daan ve ark.,2000; Pittendrigh ve ark.,1976). Per1 ve Per2 genlerinde delesyon olan farelerle Cry1 ve Cry2 genlerinde delesyon olan fareler

kıyaslandığında; Per1 ve Per2 genlerinde delesyon olan farelerde açıkça aritmi gözlemlenmiştir (Bae ve ark.,2001; Zheng ve ark.,1999). Bu bulgular Per1 ve Per2 genlerinin sirkadiyen saat ritmini sağlamadaki önemini göstermektedir.

Per 2 geninde meydana gelen bir mutasyon Per1 ve Cry1 geninin ifadesinin azalmasına ve Bmal1 geninin değişmesine sebep olur (Shearman ve ark., 2000, Zheng ve ark., 2001; Zheng ve ark.,1999). Bu bulgular Per2 geninin sirkadiyen genlerinin pozitif düzenleyicisi olmasıyla uyumludur (Shearman ve ark., 2000, Zheng ve ark., 1999). Per1 geninin Per2 genini posttranskripsiyonel olarak düzenlediği ve Per2'nin nükleer transportunu etkilediği bilinmektedir (Zheng ve ark., 2001). Per 2 proteininin azalması veya tamamen yok olması, Bmal1 transkripsiyonunu da değiştirmektedir (Shearman ve ark., 2000). Bundan dolayı Per1 mutant farelerde sabit olmayan faz kaymaları veya sirkadiyen saat ritminin bozulması ortaya çıkmaktadır (Bae ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2001). Sudo ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışmada da benzer bir şekilde sirkadiyen ritmin moleküler sürecini anlamak için sabit aydınlık ve sabit karanlık koşulları altında serbest hareketlilik sağlanan sıçanlarda, suprakiasmatik nükleusta, Per2 geninin mRNA'sı olan mPer2 düzeyi ve mPer2 protein düzeyi incelenmiştir. mPer2'nin sirkadiyen ifade ritmi 7 günlük sabit aydınlık koşulunda azalmış, buna bağlı olarak mPer2 proteini kısmen azalmış ve ifade tepe noktasının (peak) oluşumu gecikmiştir. mPer2 sirkadiyen ifadesi ve proteini ise 7 günlük sabit karanlık koşulu altında hafifçe azalmıştır. Uzun sabit aydınlık koşullarında SCN de (suprakiazmatik nükleus) yer alan mPer2 proteini ritmini kaybetmiştir. Öte yandan sabit karanlık ve sabit aydınlık koşullarında serebral kortekste yer alan mPer2 geni etkilenmemiştir. Sonuçlar SCN deki mPer2'nin sirkadiyen ifadesinin, davranışsal sirkadiyen saat ritminde sabit karanlık ve sabit aydınlık koşullarıyla uyumlu olduğunu göstermiştir.

Saat genlerinin posttranskripsiyonel olarak düzenlenmesi de bu genlerin proteinlerinin hücre içinde birikmesini engellemek açısından önemlidir. Proteinlerin birikmesi bu genlerin transkripsiyonel aktivitelerindeki dengeyi bozabilir. Bu durum da sirkadiyen saat ritminin bozulmasına sebebiyet verebilir. CKIE (Kazein kinaz 1 epsilon) DNA replikasyonu ve DNA tamirinde görev alan serin tireonin kinaz protein

ailesinden bir enzimdir (Fish ve ark., 1995). CKIE'nun bir kinazı kodlayarak Per2 geninin fosforilasyonuna katıldığı bilinmektedir. Farelerde CKIE'nda kısa periyot sürelerine neden olan bir mutasyon meydana geldiğinde bu mutasyona "Tau mutasyonu" adı verilir (Kloss ve ark.,1998). Tau mutasyonu bulunan farelerin periyot sürelerinin CKIE'na bağlı olarak gerçekleşmesi, saat genlerinin posttranskripsiyonel düzenlenmesinin önemini göstermektedir.

1.2.4.2. Sirkadiyen Saat Bozukluğunun Neden Olduğu Metabolik Hastalıklar

Anormal sirkadiyen ritm, obezite, tip 2 diyabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve kanser gelişmesiyle ilişkilendirilir (DeFronzo ve ark., 2011). Yaşam tarzını etkileyen bir faktör olarak sirkadiyen ritm değişiklikleri tip 2 diyabetes mellitusa sebep olmaktadır (Zimmet ve ark.,2019). Günümüzde vardiyalı çalışma, uyku yoksunluğu ve geceleri ışık aydınlatması gibi durumların neden olduğu sirkadiyen ritm bozuklukları pankreastaki beta adacık hücrelerini doğrudan veya dolaylı yoldan etkilediğinden tip 2 diyabetes mellitusa sebep olmaktadır. Sirkadiyen sistem yaşayan organizmaların en önemli biyolojik mekanizmalarından biridir ve aydınlık-karanlık döngüsüyle senkronize olur. Moleküler saat genleri birçok dokuda ifade edilir. Buna pankreasta yer alan beta adacık hücreleri de dahildir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada saat genlerinde meydana gelen mutasyon sonucu sirkadiyen ritm bozulduğunda beta adacık hücrelerinde sorunlar meydana gelmiş ve sıçanlarda tip 2 diyabetes mellitus gözlemlenmiştir (DeFronzo ve ark., 2011).

Hipertansiyon, diyabetes mellitus ve obezite birbirleriyle ilişkili metabolik bozukluklardır. Genetik geçmiş ve yaşam tarzı, dirençli hipertansiyona ve dirençli hipertansiyonla birlikte tip 2 diyabetes mellitusa sebep olabilir. Kişide tip 2 diyabetes mellitus varlığı genellikle komorbidite gelişimini destekler (Martins ve ark.,2011). Sirkadiyen ritmin metabolizmaya etki ettiği, karaciğer ve periferik dokularda enerji homeostazını düzenlediği bilinmektedir. Anahtar metabolik enzimler ve transkripsiyon aktivatörleri saat mekanizmasıyla etkileşim halindedir. Saat genlerinin

lipojenik ve adipojenik yollarla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Sirkadiyen genleri mutant olan hayvanlarda metabolik homeostazın bozulması bu ilişkiye verilebilecek bir örnektir (Dibner ve ark., 2015). Sirkadiyen saat başlıca yağ dokusunu etkiler ve obezite ile ilişkilendirilir. Sirkadiyen saatin beyaz ve kahverengi adipoz doku oluşumunu etkilediği düşünülmektedir. Adipoz doku, metabolik düzenleyicileri salgılar, bunlar adiponektin, resistin, visfatin ve leptindir. Bunlara ek olarak adipositler tarafından salgılanan metabolik faktörler gün ışığına bağlı olarak farklı düzeylerde ifade edilmektedirler. İnsülin, glukagon, adiponektin, kortikosteroidler, leptin ve grelin gibi birçok metabolik hormon sirkadiyen saat ritmine bağlı olarak salgılanmaktadır. Örneğin; adipoz dokudan salgılanan leptin beyin tarafından oluşturulan açlık hissine güçlü şekilde etki etmektedir. Leptin seviyesi aktif olmayan fazda yükselir. Gün ışığıyla aktifleşen hayvanlarda karanlık faz, “**aktif olmayan faz**” olarak adlandırılır. Gece saatlerinde “**aktif fazı**” yaşayan hayvanlarda ise leptin seviyesi orta ışıklı ortamda yükseliş gösterir. Leptin hormonunun salgılanması doğrudan sirkadiyen ritim ile ilişkilendirilmektedir. Biyolojik saatin bozulması metabolizmaya zarar verir ve obeziteye yol açar (Sherman ve ark., 2012). Kişilerin biyolojik saatlerindeki (*sirkadiyen ritmi*) önemli değişiklikler, obezitenin sebepleri arasında sayılmaktadır. (Martins ve ark.,2011

1.3. Sirkadiyen Saat ve Adipoz Doku İlişkisi

Sosyal jetlag çalışma ve izin günlerinde uyku uyanıklık süresinin farklılık göstermesi durumudur (Wittman ve ark., 2006). Sosyal jetlag adını; kişilerin çalışma günleri ve boş günleri arasındaki uyku uyanıklık sürelerinin farklılıklarının; seyahat sebebiyle ortaya çıkan jetlagle benzeşmesinden almaktadır. Seyahat sebebiyle ortaya çıkan jetlag durumunun aksine sosyal jetlag kişilerin çalışma hayatı sebebiyle olur. Seyahatlerde yaşanan zaman kaymaları sirkadiyen sistemde geçici problemlere neden olurken, sosyal jetlag sonucunda metabolizmada kronik problemler gözlemlenmektedir (Wittmann ve ark., 2006; Roenneberg ve ark., 2007). Sosyal Jetlag olan insanlarda BMI değerlerinin daha yüksek bulunmasının yanı sıra metabolik bozukluklar da gözlemlenmektedir (Keithve ark.,2006; McAllister ve ark.,2009;

Roenneberg ve ark., 2012). Sirkadiyen ritmin bozulması ile metabolik olayların yoğun şekilde gerçekleştiği adipoz doku sisteminin doğrudan etkilenmesi de kaçınılmazdır.

Genetik fare modeli, metabolizma ve sirkadiyen ritm arasındaki bağlantıyı açıkça göstermektedir. Örneğin, sirkadiyen geni olan Clock geninin işlev kaybı mutasyonu açısından homozigot olan sıçanlar çok yiyerek obezite, hiperglisemi ve dislipidemi geliştirirler (Turek ve ark., 2005). Clock geni mutant bu farelerde adipozit hipertrofisi ve bir metabolik sendrom göstergesi olan karaciğerde aşırı miktarda yağ birikimi gözlemlenir (Feng ve ark., 2011). Shi ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada; plazma insülin düzeyi yüksek serum glukoz düzeyi normal klempler kullanılarak insülin faaliyetinin sirkadiyen ritmi bulunmaya çalışılmıştır. Bu sebeple sirkadiyen saati bozulmuş Bmal1 knock out farelerle birlikte insülin faaliyetine odaklanılarak insülin faaliyeti ve bu faaliyetin özellikleri kaydedilmiştir. Sirkadiyen saat ritim problemi bmal1 knock out farelerde, bu genin paralogu olan bmal2 geninin ifadesiyle ile çözüldüğünden, insülin faaliyeti ve bu faaliyetin özellikleri korunmuştur. Bmal1 knock out fareler ve doğal fenotipe sahip fareler sabit ışık altında sirkadiyen saat açısından aritmi özelliği göstermektedir. Bu aritmik fareler yüksek yağlı diyetle beslendiklerinde obeziteye yatkın hale gelmiştir. Shi ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma, insülin faaliyeti ile sirkadiyen ritm arasında ilişki olduğunu gösteren belgeler sunmakta ve insülin faaliyetinin doğal ritmi bozulduğunda insülin direnci ile obezitenin ortaya çıktığını göstermektedir (Shi,Shu-Qun ve ark., 2013).

Birçok çalışma sirkadiyen ritm ile lipid biyosentezi ve metabolizma arasında bağ kurmayı hedeflemiştir (Turek ve ark., 2005; Zvonic S ve ark., 2006; D. Feng ve ark., 2011). Kemirgenlerde Clock geninin işlevini kaybetmesi dislipidemi gibi metabolik hastalıklara yol açtığı görülmüştür (Turek FW ve ark., 2005). Peroksizom proliferatör aktive olmuş reseptör alfa (PPAR α), memelilerde sirkadiyen saat ritmini düzenler (Hidenori ve ark., 2007). PPAR α transkripsiyon faktörünün ifadesinin ritmini kaybetmesi adipozit işlev düzenlenmesinin bozulmasına yol açar (Oishi K ve ark., 2005). İnsanlarda Clock geninin polimorfizmi ile obeziteye yatkınlık, Per2 polimorfizmiyle ise karımsal obezite geliştiği bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Scott EM ve ark., 2008., Garaulet M ve ark., 2010).

1.3.1. Vardiyalı Çalışmanın Metabolizma Üzerindeki Etkileri

Doğal fenotip farelerde normal aydınlık-karanlık döngüsünün bozulması, insanlar arasında vardiyalı çalışmayla ilişkilendirilmiştir. Bu da gece vardiyalı çalışanların artan vücut ağırlığını, hiperleptinemi ve artan insülin salgısını açıklamaktadır (Fonken ve ark., 2010; I.N. Karatsoreos ve ark., 2011).

Thorell ve Arkerstedt (1976) tarafından yapılan çalışmada potasyum, ürik asit, glukoz, kolesterol ve total lipid değerlerinin gece çalışma düzeninde arttığı gösterilmiştir (Theorell ve ark.,1976). Bu değerler gündüz çalışanlarda normal düzeyde bulunmuştur. Thorell ve Arkerstedt'in yaptığı çalışmanın (1976) sonuçları, gece çalışmanın katabolik bir etki yarattığını, kardiyovasküler ve metabolik sağlığı olumsuz etkilediğini göstermektedir (Theorell ve ark.,1976). Bir başka çalışma 46 polis üzerinde yapılmış, vardiya sisteminin metabolizmayı etkilediği gösterilmiştir. Gece çalışan polislerde, gündüz çalışan polisler göre serum trigliserit, glukoz ve ürik asit seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Orth-Gomer ve ark.,1983). BMI ve vardiyalı çalışma sisteminin ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada merkezi adipoz dokuda artış olduğu gözlemlenmiştir (Nakamura ve ark1997). Niedhammar ve arkadaşları (1996), 469 hemşire üzerinde 5 yıl süren bir çalışma yapmıştır. Deneye katılan hemşireler gece çalışma sıklıklarıyla orantılı bir şekilde kilo almışlardır (Niedmar ve ark.,1996). Koller ve arkadaşları (1978), Avusturalya'da bir petrol rafinerisinde çalışan 300 kişiyle yaptıkları çalışma sonucunda, gece vardiyasıyla endokrin ve metabolik sistem hastalıklarının ilişkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır (Koller ve ark., 1978). Nagaya ve arkadaşlarının (2002), vardiyalı çalışanlarda insülin direcinin durumunu ortaya koymak için yaptığı çalışmada, gece vardiyasında çalışan kişilerin çoğunda insülin direnci olduğu belirtilmiştir (Nagaya ve ark.,2002).

Peplonska ve arkadaşlarının (2015), yaptığı çalışmada, dönüşümlü gece vardiyasının vücut kitle indeksi ve karın yağlanmasına etkisi incelenmiştir. Kesitsel olarak yapılan çalışmada 40-60 yaş aralığında, 354'ü gece vardiyasında döngüsel olarak çalışan ve 370'i gündüz çalışan ebe ve hemşireler incelenmiştir. Deneklerin vücut ağırlığı, boyu, bel ve kalça çevresi ölçülmüştür. BMI, bel/kalça oranı ve bel/ boy

oranı hesaplanmıştır. Gece nöbeti sıklığı (>ayda 8 gün) ve kümülatif süresinin (>20 yıl) obeziteyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı şekilde nöbet sıklığı ve süresinin karın yağlanması ile ilişkisinin bulunduğu da gösterilmiştir (Peplonska ve ark., 2015). Benzer bir şekilde Danimarkalı sağlık çalışanlarıyla ve İtalyan demiryolu çalışanlarıyla yapılan çalışmada, obezite ve karın yağlanmasının gece nöbetleri ile ilişkisi gösterilmiştir (Kubo T ve ark., 201; Roos E ve ark., 2013; Suwazono Y ve ark., 2008). Bütün çalışmalar vardiyalı çalışma sistemiyle başta obezite olmak üzere birçok metabolik rahatsızlığın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

1.4. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Son yıllarda erişkin dokulardaki multipotent kök hücrelerle ilgili bir çok araştırma yapılmıştır (Gao ve ark.,2001; Zuk ve ark., 2002; Strem ve ark., 2005; Schaffler ve Büchler, 2007). Mezenkimal kök hücre ilk olarak Caplan tarafından öne çıkarılmış ve Friedenstein ve Owen (1970), tarafından tanımlanmıştır (Friedenstein ve ark., 1970). Mezenkimal kök hücreler yüzeylerinde CD105, CD73, CD90,CD29 ve CD 44 moleküllerini ifade ederken, CD45, CD14 ve CD34 belirteçlerinin ifade etmezler (Dominici ve ark., 2006). Mezenkimal kök hücrelerin öne çıkan kullanım alanı yenileyici tıptır. Temel olarak kök hücrelerin yenileyici tıp alanında kullanılabilmesi için belirli kriterlere sahip olmaları gerekmektedir:

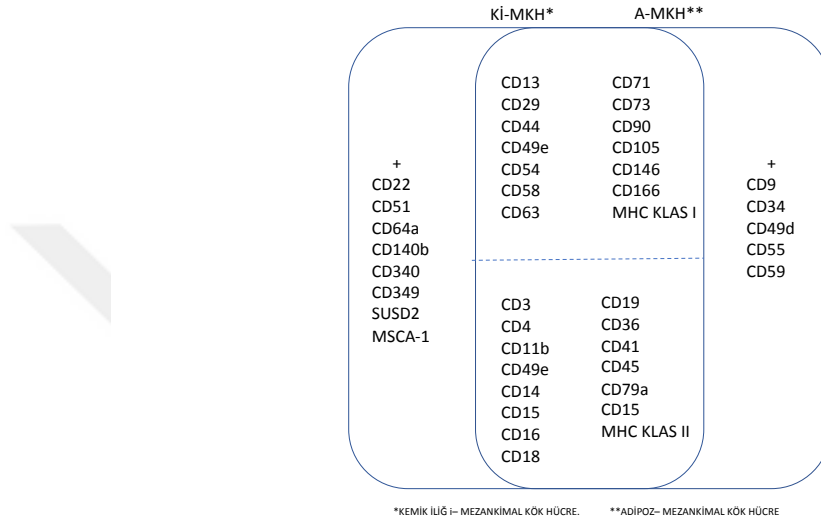
- Çok fazla sayıda bulunmalıdırlar.
- Minimal invaziv işlem uygulanarak toplanabilmelidirler.
- Bir çok hücre hattına dönüşüp çoğalabilmelidirler.
- Güvenilir ve etkili biçimde otolog veya allojenik alıcıya transplante edilebilmelidirler (Wei ve ark.,2000).

Erişkin mezenkimal kök hücreleri en yaygın kemik iliği ve adipoz dokudan izole edilirler. Buna rağmen kemik iliği, mezenkimal kök hücrelerin eldesinde ve çoğaltılmasında karşılaşılan dezavantajlar, yağ dokusu (adipoz doku) mezenkimal kök hücrelerinin kullanımı ile ilgiyi son yıllarda giderek artırmaktadır. Bu bağlamda dünya genelinde obezitenin artış göstermesi subkutan adipoz dokuya, ulaşılabilirliği ve çok miktarda bulunabilmesi iyi bir mezenkimal kök hücre kaynağı olmuştur (Bray ve ark., 2004). Zuk ve arkadaşları (2002) tarafından tanımlanan adipoz-kökenli mezenkimal kök hücrelerin günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik olarak etkinlikleri araştırılmaktadır (Zuk ve ark., 2002; Strem ve ark., 2005; Schaffler ve Büchler, 2007; Bunnell ve ark., 2008; Baer ve ark., 2012; Carvalho ve ark., 2012; Quimby ve ark., 2013; Ghorbani ve ark., 2014; Hayato ve ark., 2014; Perdisa ve ark., 2015; Elçin YM, 2016). Diğer mezenkimal kök hücrelere göre adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler daha yüksek hücresel aktiviteye sahip olup kültür ortamında hızla çoğaltılabilmektedirler. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kromozomal stabilitelerini korumak suretiyle daha yüksek pasaj sayılarına çıkabilme ve dolayısıyla daha fazla hücre eldesine imkan verme özellikleri vardır (Bourin ve ark., 2018;

Bruce ve ark., 2008; Bunnell ve ark., 2008; Wagnera ve ark., 2005). Bu özellikleri ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler, rejeneratif tıp için kullanışlı bir mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kabul edilmeye başlanmıştır (Gimble ve ark., 2003). Kökenine bağlı olarak mezenkimal kök hücrelerin gen ifadesi, yüzey epitoplari, kolonileşme, farklılaşma yeteneği ve terapötik potansiyelleri farklılık göstermektedir.

Mezenkimal kök hücrelerinin yüzey belirteçleri türlere bağlı olarak değişir (Mazurek ve ark., 2003; Banas ve ark., 2012). Bazı moleküllerin yüzey ifadesi in vivo ve in vitro olarak da değişebilir (Gronthos, ve ark., 2001). Fenotipik olarak mezenkimal kök hücrelerde CD29, CD44, CD90 ve CD105 pozitif olup hematopoyetik köken belirteçleri ve HLA-DR negatiftir (Kern ve ark., 2006). Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerini kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden ayıran bazı belirteçler bulunmaktadır. Adipoz kökenli kök hücreler, CD29, beta integrin ve CD 44 gibi klasik mezenkimal kök hücre belirteçlerini ifade ederler. Adipoz kökenli

mezenkimal kök hücre ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ortak olarak CD73, CD90, CD105 gibi yüzey belirteçlerini ifade ederken, adipoz kökenli mezenkimal kök hücreleri CD14, CD45 ve CD31 yüzey belirteçlerini ifade etmezler (Mitchell ve ark., 2006). Şekil 1.1.'de adipoz kökenli ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçleri gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücre ve adipoz mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri (Kocan, Beata ve ark., 2017).

1.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaşması

Mezenkimal kök hücreler uygun koşullarda kültür ortamında adipositlere, kondrositlere ve osteositlere farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir.

1.4.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerde Osteojenik Farklılaşma

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması proliferasyon, olgunlaşma ve mineralizasyon olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir (Lian ve ark., 1992). Proliferatif evrede mezenkimal kök hücreler oldukça mitotik özellik gösterirler. Bu evredeki mezenkimal kök hücreler H4 histon ve c-fos ifade ederler. Proliferatif evrede

ayrıca tip 1 kollajen, fibronektin ve TGF β genleri gibi ekstra selüler matriks üretiminde görev alan genler yüksek seviyededir (Aronow ve ark., 1990). Olgunlaşma aşamasına ekstra selüler matriks oluştuğundan, alkalın fosfataz, kollajen tip 1 ve osteopontin gibi ekstra selüler matriks yapımında görev alan proteinleri kodlayan genler aktive olmaktadır.

Osteopontin ve osteokalsin mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının mineralizasyon aşamasında ifade edilmektedir (Nuttelman ve ark., 2005).

1.4.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Kondrojenik Farklılaşma

Kıkırdak gelişimi kondroprogenitör hücrelerin kaderini belirleyen dengeleri düzenleyen morfojenik olaylar tarafından yönetilir. TGF- β , BMP (kemik morfojenik proteinleri), FGFler (fibroblast büyüme faktörü), Wnt ve Ihh gibi farklı sinyal molekülleri kondrojenik gelişimin düzenlenmesinde görev alır (Hui ve ark., 2008). Sox 5, Sox 6 ve özellikle Sox 9 anahtar kondrojenik transkripsiyon faktörleridir (Shibata ve ark.,2003). Mezenkimal Kök hücreler bu sinyal mekanizmalarıyla uygun koşullar altında fiziksel olarak sıkışarak yoğunlaşırlar. Yoğunlaşma sebebiyle mezenkimal kök hücrelerin kendilerini çevreleyen hücrelerle ve ekstra selüler matriksle hücresele etkileşimleri artar. Özellikle N- cadherin ve nöral hücre adezyon molekülü (N-CAM) aracılı hücre- hücre etkileşimi mezenkimal kök hücre yoğunlaşmasında önemli bir rol oynar (DeLise ve ark., 2002). Hücreler kümelenmeye başladığında, mezenkimal kök hücreler kollajen 1, fibronektin ve proteoglikan üretmeye başlar. Hücrelerin çevreleriyle güçlü etkileşimi sonucu mezenkimal kök hücreler kondroblastlara farklılaşırlar (DeLise ve ark., 2000). Yoğunlaşmış mezenkimal kök hücreler bir transkripsiyon faktörü olan Sox 9'u ifade ederek kondrojeneze katılan genleri kontrol eder ve progenitör hücrelerin kıkırdak özgü ekstra selüler matriks molekülleri salgılamasını sağlar (Quintana ve ark., 2008). Olgunlaşma aşamasından sonra birçok morfolojik ve fiziksel değişim meydana gelir.

Bu şekilde tipik kıkırdak sertliği ve esnemezliği ekstra selüler matris içeriğine bağlı olarak artar (Shibata ve ark., 2003).

1.4.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerde Adipojenik Farklılaşma

Adipojenez belirlenme ve olgunlaşma fazları olmak üzere 2 temel aşamada gerçekleşmektedir. Belirlenme fazı boyunca multipotent mezenkimal kök hücrelerin adipoz hücre hatları dışında başka soylara farklılaşma yetenekleri kaybolur (Rosen ve ark., 2006). Bu fazda preadipositler ve öncül hücreleri benzer morfoliji ve fenotipe sahiptir. Olgunlaşma fazında ise preadipositler olgun adipositlere farklılaşarak lipid sentezi ve taşınmasında, adiposit özgü proteinlerin salgılanmasında ve insülin duyarlılığında görev yapan sistemin çalışmasında görev alırlar (Rosen ve ark., 2000). Adipojenez düzenlenmesinde PPAR γ (peroksizom çoğaltıcı aktive olmuş reseptörü) ve CCAAT/ çoğaltıcı bağlanma ailesi proteinleri transkripsiyon faktörleri görev alır (Gimble ve ark.,1996).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

2.1.1. Deney Hayvanlarının Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışması kapsamında deneylerde kullanılan sıçanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından, Ankara Üniversitesi'nin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun kararına uygun olarak temin edilmiştir (Tarih: 29.06.2019, Karar no: 2019-12-122).

Yapılan araştırmalara göre memelilerde bir davranışın otomatik hale gelmesi en az 66 gün sürmektedir (Gardner ve ark.,2012; Lally ve ark.,2009; Lally ve ark.2011). Sıçanların uyku/uyanıklık döngüsüne bağlı olarak gelişen beslenme alışkanlıklarının otomatik hale gelmesi için çalışma süresi 70 gün olarak belirlenmiştir.

Metabolik özellikleri ve spontan obezite geliştirme yatkınlıkları göz önünde bulundurularak çalışmada albino wistar sıçanlar tercih edilmiştir (Newby ve ark.,1990). İstatistiksel olarak değerlendirmenin sağlıklı olması için çalışmaya 32 sıçan dahil edilmiştir. Dişi sıçanların menstruel döngülerinin ve hormonal değişimlerinin etkilerini dışlamak için ve obezite çalışmalarında ağırlıklı olarak erkek sıçanlar üzerinde araştırma yapılmış olması göz önünde bulundurularak, erkek sıçanlar seçilmiştir (Fernandes ve ark., 2016; Nilsson ve ark., 2012;).

2.2.1. Deney Hayvanlarının Beslenme Düzeni

Deney hayvanlarının yemleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından hazırlanan teknik şartname göz önünde bulundurularak, Korkuteli Yem Gıda Sanayi Ticaret Anonim Şirketi'nden temin

edilmiştir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından kullanılan yemlerin besin içerikleri Çizelge 2.1’ de belirtilmiştir. Günlük her hayvana 40 gram gelecek şekilde yem verilmiştir. Hayvanların yem ve suya serbest erişimleri sağlanmıştır.

Çizelge 2.1 Sıçanların yemlerinin besin içeriği

KULLANILAN HAMMADDELER		
Soya fasülyesi küspesi	Ham Yağ	%2.95
Mısır ve Buğday kepeği	Ham Küspe	%6.36
Arpa	Lysine	%1.32
Yonca Unu	Fosfor	%0.98
Pelet Bağlayıcı	Ham Protein	%23.50
Toksin Bağlayıcı	Ham Selüloz	%5,92
Kanatlı Minerali	Methionine	%0,43
Methionine	Kalsiyum	%0,88
Genetiği Değiştirilmiş Mısır	Sodyum	%0,05
Kolin		
Lizin		

2.2.2. Barınakların Tasarımı ve Işıklandırması

Çalışmada barınak olarak kullanılmak üzere 3 kutu tasarlanmıştır. Her bir kutu, kafeslerin ebatları göz önünde bulundurularak ve her kutuya 2 kafes sığacak şekilde; yüksekliği 50 cm, boyu 70 cm ve eni 90 cm olacak şekilde hazırlanmıştır. Hayvanların hava almalarını sağlamak için kutuların yanlarına 2 tane, üst kısmına 2 tane olmak üzere 10x20 cm’lik boyutlarda pencereler açılmıştır. Kutuların üst ve yan kısımlarında bulunan pencereler Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Kutular yerden 10 cm yüksek olacak şekilde alüminyum ayaklarla yükseltilmiştir. Kutunun ısı ve ışığı muhafaza etmesi açısından mdf ; yani sert veya yumuşak ahşap kalıntılarını parçalayıp ahşap plakaya çevirdikten sonra, yüksek ısı ve basınç altında mum ve reçine tutkal ile oluşan levha şeklinde tasarlanmış olan ahşap ürün kullanılmıştır. Açılan pencerelere hava geçirgenliğini daha iyi sağlaması için ipek şifon kumaştan 4 kat olmak üzere perde dikilmiştir. Sirkadiyen ritim deneylerinde loş ışık düzeyi kırmızı renk ışık ile sağlandığından; perdelerin rengi koyu kırmızı olarak tercih edilmiştir (Dauchy RT ve

ark.,2013). Kutunun perdeyle kapatılmış hali Şekil 2.2’de görülmektedir. Her bir kutunun iç sıcaklığı sabit ve 24 °C olarak tutulmuştur.

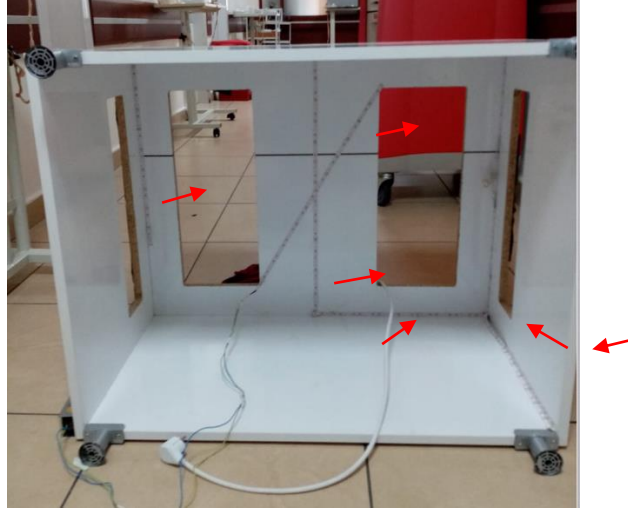


Şekil 2.1. Çalışmada barınak olarak kullanılan kutulara açılan pencerelerin gösterilmesi.



Şekil 2.2. Çalışmada barınak olarak kullanılan kutuların perdeyle kapatılmış halinin gösterimi.

Sıçanların aktif olmadıkları zaman dilimi için önceden yapılmış olan çalışmalara dayanarak ve sıçanların nokturnal hayvanlar olduğu bilgisi göz önünde bulundurularak; her bir kutunun ışıklandırması 350 lux olarak ayarlanmıştır (Vanderschuren ve ark.,1995, Lafollette ve ark.,2019, Guidelines for the Housing of Rats in Scientific Institutions, Animal Research Review Panel, Guideline 20, 2007). Işıklendirme için 3 çipli, 12 volt, gün ışığı şerit led (Amberled, Türkiye) kullanılmıştır. Kutuların ışıklandırma düzenekleri Şekil 2.3’te görülmektedir.



Şekil 2.3. Çalışmada barınak olarak kullanılan kutuların ışıklandırma düzeneğinin gösterimi.

2.2.3. Deney Hayvanlarının Karanlık/Aydınlık Döngüleri ve Faz Kaymalarının Değiştirilmesi

Deneyin ilk bir ayı içerisinde sirkadiyen ritmin aydınlık-karanlık döngü süresinden ziyade, hayvanların aktif- pasif zaman başlangıcının yani uyanma ve uyuma saatinin ritmi etkilemesini gözlemlemek adına; grupların uyanma ve uyuma saatleri değiştirilmiş, uyku ve uyanıklık süreleri sabit tutulmuştur (12hL:12hD). Bir ayın sonunda sıçanların normal karanlık-aydınlık döngüsünün 12 saat gündüz 12 saat gece olduğu kabul edilmiştir. Herrero ve arkadaşlarının (2015) sirkadiyen ritm üzerindeki çalışmaları temel alınarak sıçanlar; kontrol grubu, 6 saat ileri faz döngüsü, 6 saat geri faz döngüsü ve haftalık gece gündüz döngüsüne sahip olacak şekilde 4 farklı gece gündüz döngüsü programına göre gruplanmışlardır. Döngüleri ayarlamak için ayarlı dijital saati (Cata Ct 9182, Almanya) bulunan prizler kullanılmıştır.

Grup 1'deki sıçanların faz kayması bir hafta (6 saat geri) 6 saat gündüz 6 saat gece 6hL:6hD faz ve bir hafta münavebeli 3 saat gündüz 6 saat gece ve/ve ya 6 saat gündüz 3 saat gece olacak şekilde planlanmıştır. Çizelge 2.2'te Grup 1'de yer alan sıçanların faz kaymaları gösterilmiştir.

Grup 2'deki sıçanların faz kayması her hafta gece ve gündüz süreleri 6 saat artarak ilerleyecek şekilde ayarlanmıştır. (18hL:18hD faz, 24hL:24hD faz, 30hL:30hD faz, 36hL:36hD faz, 42hL:42hD faz, 48hL:48hD faz.). Çizelge 2.3.'te Grup 2'deki sıçanların faz kaymaları gösterilmiştir.



2.2.4. DeneY Hayvanlarının Numaralandırılması

DeneYe dahil edilen hayvanlar kuyruk kısmından asetat kalemiiyle dairesel işaretleme yapılarak numaralandırılmıştır. Bu işlem işaretin silinmemesi için her hafta tekrar edilmiştir. Sıçanların ait oldukları kutuyu belirtmek için kuyruğun proksimaline kutu numarası yazılmıştır. Örneğin; 2. Kutuda yer alan 2 numaralı sıçanın kuyruğunda işaretleme 2 sayısı ile başlayıp iki tane halkayla belirtilmektedir. Şekil 2.4’de deneY hayvanlarının numaralandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.4. DeneY hayvanların numaralandırılmasının gösterimi.

2.3. Deney Hayvanlarının Fiziksel Özelliklerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Deney hayvanlarının fiziksel özelliklerinin ölçümleri, kan alımı için hayvanlar etik kurallar kapsamında Ketazol ve Xylazin'den 5:1 oranında hazırlanan anestezi madde kullanılarak bayıldıktan sonra yapılmıştır.

2.3.1. Boy Ölçümü

Hayvanlar bayıldıktan sonra, boyları burun ucu ile anüs arasındaki mesafesi esas alınarak ölçülmüştür. Bu ölçümler deneyin 0'inci,35'inci ve 70'inci günlerinde tekrarlanmıştır.

2.3.2. Ağırlık Ölçümü

Hayvanlar bayıldıktan sonra, ağırlıkları hassas teraziyle ölçülmüştür (Soehnle, Almanya). Bu ölçümler deneyin 0'inci,35'inci ve 70'inci günlerinde tekrarlanmıştır.

2.3.3. Vücut Kitle İndekslerinin (BMI) Değerlendirilmesi

Vücut Kitle İndeksi (BMI) formülü basitçe kg/m^2 olarak ifade edilebilir. Ağırlık birimi kilogram olarak alınırken; hesaplama da boy ise metre biriminden olmalıdır. Erişkin erkek wistar sıçanlar için normal vücut kitle indeksi sınıflandırmasının 0.45 ve 0.68 g/cm^2 aralığı olduğu bildirilmiştir (Novelli, E L B ve ark.,2007). BMI hesaplamaları deneyin 0'inci,35'inci ve 70'inci günlerinde tekrarlanmıştır.

2.3.4. Vücut Sıcaklık Ölçümü

Vücut termometresinin haznesi vazelinlendikten sonra anal bölgeden vücut ısısı ölçülmüştür (Medisana, Almanya). Bu ölçümler deneyin 0'ıncı,35'inci ve 70'inci günlerinde tekrarlanmıştır.

2.4. Deney Hayvanlarının Kan Biyokimyası ve Hematolojik Ölçümlerinin Yapılması

Etik kurallar kapsamında hayvanlar Ketazol ve Xylazin'den 5:1 oranında hazırlanan anestezi madde ile bayıltılmıştır. Hayvanların kanları bacak veninden, 500 ul'lik mor ve sarı kapaklı tüplere alınmıştır. Mor kapaklı EDTA'lı tüplere alınan kandan tam kan sayımı, sarı kapaklı jelli tüplere alınan kanlardan biyokimyasal analiz (ALT, ALP, Albümin, Glukoz ve Kolesterol) yapılmıştır (BD, ABD). Sarı kapaklı tüplere alınan kanlar; 12 dakika 3000 RPM'de (Elektro-mag, Türkiye) çevirilerek serumlarından ayrılmıştır. Tüpler Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarı'na soğuk zincir korunarak 1 saat içerisinde teslim edilmiştir. Kanlar laboratuvarında çalışıldıktan sonra sonuçlar teslim alınmıştır.

2.5. Deney Hayvanlarının Ötenazisi, Organ ve Yağ Dokusu İzolasyonu

Sıçanlara son ağırlık ölçümleri göz önünde bulundurularak, ötenazi işlemi öncesi kilo başına 12 mg Xylazine ve kilo başına 80 mg Ketamin olacak şekilde hazırlanan anestezi madde periton içerisine enjekte edilmiştir (Green CJ ve ark.,1981). Anestezi uygulamasını takiben sıçanlar tıraş edildikten sonra abdomende median kesi yapılarak organlar çıkarılmıştır. En son paravertebral bölgeden yağ dokusu izole edilmiştir. Çıkarılan doku ve organlar makroskopik olarak değerlendirilip, dokuların bir kısmı mikroskopik analizler için parafomaldehid ve CT analizi için glüteraldehid solüsyonlarına ayrı ayrı konulmuştur. Dokuların geri kalan kısmı ise molkeüler analiz ve hücre kültürü için sıvı azot içerisinde saklanmıştır.

2.6. Sodyum Dedosil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS PAGE)

2.6.1. Deney Hayvanlarından Elde Edilen Serumdaki Leptin Hormonunun Tespiti

2.6.1.1. Jel Hazırlanması

Sodyum dedosil sülfat (SDS PAGE) jel elektroforezi için koşturma ve yığıma jeli olmak üzere iki farklı jel hazırlanır. İlk olarak koşturma jeli hazırlanmıştır.

Koşturma jeli kullanacağımız amaca uygun olarak farklı yüzdelerde hazırlanır. Bu çalışmada 16 kDa (kiloDalton) ağırlığındaki leptin proteininin tayini için %12'lik poliakrilamid yürütme jeli kullanılmıştır. Yürütme jelini 10 mililitrelik hacimde elde etmek için %10'luk sodyum dedosil sülfat çözeltisi ve %10'luk amonyum persülfat çözeltisi hazırlanmıştır. Saf su 5 mililitre. Saf su miktarı 5 mililitre alınır olarak ölçülür ve tartılan SDS saf suya eklenerek karıştırılır. Saf su miktarı 5 mililitre olarak ölçülür ve %10'luk sodyum dedosil sülfat çözeltisi hazırlamak için 0,5 gram toz haldeki sodyum dedosil sülfat tartılır (Sigma Aldrich L3771, Almanya), tartılan amonyum persülfat saf suya eklenerek karıştırılır. Akrilamid/bisakrilamid solüsyonu hazırlamak için 3,2 mililitre su içerisine 4 mililitre akrilamid (%30) /bisakrilamid (%0,8) eklenir. Bu çalışmada akrilamid/bisakrilamid solüsyonu hazır olarak kullanılmıştır. Hazırlanan SDS çözeltisinden 0,1 mililitre jel için hazırlanan jel için hazırlanan sıvıya eklenir. Sıvının içerisine amonyum persülfat çözeltisinden de 0,1 mililitre eklenir. En son aşamada 10 mikrolitre TEMED (Sigma Aldrich T9281, Almanya) jeli katılaştırmak için eklenerek yürütme jeli üretimi tamamlanmış olur. Elektroforez tankına (BIO-RAD Second Dimension Mini Format Electrophoresis System, A.B.D.) ait camlar birleştirilerek, hazırlanan yürütme jeli bu camlar arasına dökülür ve donması beklenir. Yürütme jeli donduktan sonra üzerine pastör pipeti yardımıyla %20lik izopropanol (Sigma Aldrich I0398, Almanya) eklenip oda ısısında polimerize olması beklenir.

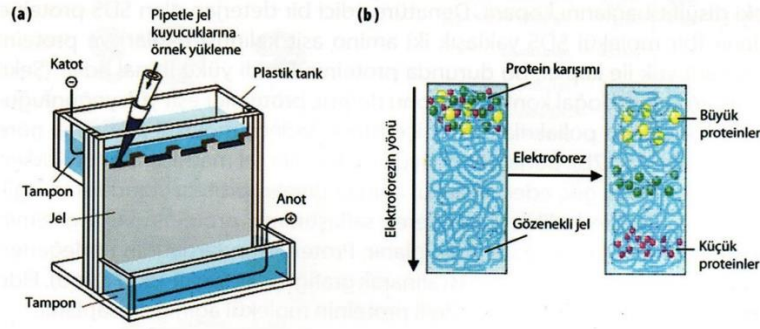
Polimerizasyon tamamlandıktan sonra fazla izopropanol çekitirilir ve %4 lük toplama jeli hazırlanmış olur.

Bu tez çalışmasında %4'lük toplama jeli kullanılmıştır. Toplama jelini 5 mililitrelik bir hacimde hazırlamak için 2,975 mililitre su kullanılmıştır. Toplama jelinin üretiminde 1,5 M Tris-HCl'ye ihtiyaç duyulacağından, bu tampon uygun molaritede hazırlanır ve 1,5 M Tris-HCl'den (Sigma Aldrich T5941, Almanya) 1,25 mililitresi hazırladığımız suya eklenir. Hazırlanan SDS çözeltisinden 0,05 mililitre ve amonyum persülfat çözeltisinden 0,05 mililitre sıvıya ilave edilir, akrilamid/bisakrilamid'den 0,67 mililitre karıştırılır. Son olarak 5 mikrolitre TEMED eklenerek toplama jeli yürütme jelinin üzerine dökülür.

2.6.1.2. Örnek Hazırlama

Örnekleri hazırlamak için öncelikle Laemmli'nin (1977) numune tamponu hazırlanır. Bu tamponu hazırlamak için önceden 1 M olarak hazırlanmış Tris HCl'den 0,6 mililitre alınır. %10'luk SDS karışımından 2 mililitresi ile karıştırılır. Sıvıya 1 mililitre %100 gliserol (Sigma Aldrich G5516, Almanya) eklenir. β –merkaptoetanolden (Sigma Aldrich M3148, Almanya) 0,267 mililitre ilave edilir. Son olarak 2,5 miligram bromofenol blue (Sigma Aldrich B0126, Almanya) eklendikten sonra su ile karışımın hacmi 5 mililitreye tamamlanır.

Örnekler 1:1 oranında laemmli tamponuyla seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler 5 dakika 95 derecedeki su banyosunda bekletilmiştir. Hazırlanan numuneler kuyucuklara yüklenir. Şekil 2.5'te sodyum dedosil sülfat poliakrilamid jel elektroforez düzeneği gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Sodyum dedosil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi düzeneğinin gösterimi. a) elektroforez kısmının gösterimi. b) Protein içerikli karışımın jel üzerindeki dağılım ve gösterimi (Yıldırım ve ark.,2007).

2.6.1.3. Koşurma Tamponunun Hazırlanması

Koşurma tamponunun hazırlanması için 3,025 gram Tris-base tartılır (Sigma Aldrich 10708976001, Almanya). Glisinden (Sigma Aldrich G4392, Almanya) 14,4 gram alınır. SDS'ten 1 gram eklenir ve total hacim suyla 1 litreye tamamlandıktan sonra pH 8,3'e ayarlanır. Tankın içi hazırlanan yürütme tamponuyla doldurulur.

2.6.1.4. Örneklerin Yürütülmesi

Örnekler önce 80 voltta 40 dakika ardından 200 voltta 100 dakika yürütülmüştür

2.6.1.5. Boyama ve Boyayı Uzaklaştırma Solüsyonlarının Hazırlanması

Koşurma işleminden sonra jel yaklaşık 1 gün boyama solüsyonu içerisinde bekletilir. Boyama solüsyonunu hazırlamak için 1,2 gram commasie brillant blue (Sigma Aldrich B0770, Almanya) tartılır. Glisial asetik asitten (Sigma Aldrich AX0074, Almanya) 46 mililitre alınır. Hazırlanan sıvıya 454 mililitre %50 metanol (Sigma Aldrich 494437, Almanya) eklenir. Koşurma işlemi biten jelin üzerine ilave edilerek 24 saat beklenir.

Fotoğraflama öncesi jel şeffaf bir görüntü alana kadar, boyayı uzaklaştırma solüsyonu içerisinde bekletilir. Boyayı uzaklaştırma solüsyonunu hazırlamak için 50 mililitre metanol, 75 mililitre glisial asetik asit ve 875 mililitre saf su karıştırılır.

2.7. Tam Kandan mRNA Elde Edilmesi ve cDNA Sentezlenmesi

2.7.1. Tam Kandan mRNA Elde Edilmesi

Çalışma gruplarından alınan kanlar 1,5 mL'lil EDTA'lı tüplere saklandı (BD Microtainer® MAP, A.B.D.) alınan kan örnekleri çok kısa bir süre içerisinde deneyde kullanılmak için -40 °C'de. Örnekler kullanılmaya başlanmadan önce oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı. Çözülen örnekler 10dk 3000g 'de yerçekimsiz santrifüjde çevrildi (Beckman Coulter Allegra X-30R, A.B.D.). Süpernatant kısmı atılarak her örneğe 2 mL steril PBS eklenir (Sigma Aldrich D8537, Almanya). Steril PBS eklendikten sonra 5 saniye vorteks yapılır (Thermo Fisher 88880017TS, A.B.D.). Süpernatant kısmı atılır. Pellet kısmı 240 µl TRI reagent eklenir (Sigma Aldrich 93289, Almanya). Pipetleme işlemi yapıldıktan sonra 18 µl Proteinaz K ilave edildikten sonra ependorf tüpü değiştirilerek 5 saniye vorteks yapılır (Thermo Fisher EO049, A.B.D.). Yeni ependorf tüpüne alınan örnek 500 rpm'de 55°C'de 10 dakika santrifüjlenir (Sigma Aldrich 3-18 KHS, Almanya). Örneğe 25,8 µl kloroform ilave edilerek vortekslenir (Sigma Aldrich C2432, Almanya). Kloroform ilave edildikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Örnekler 12000g'de 4°C sıcaklıkta santrifüj edilir. Süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktarılır. Elde edilen RNA miktarı nanodrop cihazı ile ölçülür (Thermo Fisher ND-ONE-W, Almanya).

2.7.2. Agaroz Jel Hazırlanması

2.7.2.1. Tris Borik EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanması

Trizma'dan (Sigma Aldrich 77-86-1, Almanya), 10,8 g, borik asitten (Sigma Aldrich B6668, Almanya) 5,5 g ve Na_2EDTA 'dan (Sigma Aldrich E5134, Almanya) 0,74 g tartılır. Hazırlanan toz karışım 1L saf su içerisinde çözündürülür. Solüsyonun pH değeri 8.3'e ayarlanır.

2.7.2.2. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneğin Yürütülmesi

Hazırlanan TBE solüsyonundan 100mL alınarak, içerisinde %2 oranında agaroz jel hazırlamak için 2 gram agaroz (Sigma Aldrich A9539, Almanya) eklenir ve çözdürmek için ısıtılır (. Hazırlanan çözelti bir miktar soğuduktan sonra elektroforez tankına (Bio Rad 170-4401, A.B.D.) dökülür ve donması beklenir. Hazırlanan mRNA örnekleri 70 voltta bir buçuk saat yürütülür.

2.7.3. mRNA'dan cDNA Sentezlenmesi

Alınan kan örneklerinden izole edilen mRNA'dan cDNA sentezlemek için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit kullanıldı (Roche 5081963001, Almanya). Nanodropla miktarı hesaplanan mRNA örneklerini eşit derişimde alabilmek adına hesaplama orantı hesabı yapıldı. Kontrol grubundan 35'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 9518.6 µg/ml, 1'inci grubun 35'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 17913.6 µg/ml, 2.'inci grubun 35'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 22778.4 µg/ml ve 3.'üncü grubun 35'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 33108.1 µg/ml'dir. Bu değerler göz önünde bulundurularak cDNA karışımı için kontrol grubundan 7,8 µL (6X), 1'inci gruptan 3,9 µL, 2'gruptan 3,9 µl ve 3'üncü gruptan 3,9 µl olmak üzere mRNA örneği

alındı. Aynı hesaplamalar her grup için 70'inci günde alınan kanlar için yapıldı. Kontrol grubundan 70'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 33108.1 µg/ml, 1'inci grubun 35'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 34557.7 µg/ml, 2'inci grubun 35'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 19153.3.4 µg/ml ve 3'üncü grubun 35'inci günde alınan kandan izole edilen mRNA miktarı 30847.9 µg/ml'dir. Bu değerler göz önünde bulundurularak cDNA karışımı için kontrol grubundan 2.6 µL, 1'inci gruptan 2,6 µL, 2'gruptan 3,9 µl ve 3'üncü gruptan 2,6 µl olmak üzere mRNA örneği alındı. Her bir mRNA örneği için vial 5, vial 6 ve saf su'dan eklenerek son hacim 11,4 µl olacak şekilde kalıp primer karışımı hazırlandı. Kalıp primer karışımının 1 reaksiyon için hazırlanma oranları Çizelge 2.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. cDNA sentezi için hazırlanacak kalıp primer karışımının 1 reaksiyon için hazırlanma oranları.

İlave Edilecekler	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	1ng-4 µg
Anchored-oligo(<i>dT</i>) ₁₈ -Primer, -50 pmol/µl (vial5)	1 µl	2.5 µM
Random Hexamer rimer, -600 pmol/µl	2 µl	60 µM
Saf Su	Değişken	Toplam hacime bağlı
Toplam Hacim	11.4 µl	

Karışım hazırlandıktan sonra 65°C 'de 10 dakika kapak ısıtılmış şekilde termal döngüz cihazında ısıtılır. Bu işlemin sonucunda RNA ikincil yapıları denatüre edilir. 10 dakika ısıtma işleminin sonucunda buz tüpe konularak reaksiyon durdurulur. Bu aşamadan sonra kalıp primer karışımına çizelge 2.7.'de belirtilen diğer kimyasallar eklenerek reverse transcriptase (RT) karışımı hazırlanır.

Çizelge 2.7. Reverse transcriptase (RT) karışımı için eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları.

İlave Edilecekler	Hacim	Son Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x konsantrasyonunda (vial 2)	4 µl	1x 8 mM MgCl ₂
	0,5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10mM (vial 4)	2 µl	1 mM each
DTT (vial 7)	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (vial1)	1,1 µl	22 U
Toplam Hacim	20 µl	

Karışım hazırlandıktan sonra kapak ısıtılmış şekilde termal döngü cihazında ısıtılır. Daha sonra reaksiyon başlatmak için karışım 10 dakika 29°C’de ve takiben 48°C’de 60 dakika inkübe edilir. Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase’ı inaktive etmek için tüpler 85°C’de 5 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için tüpler buz üzerine alınır. Bu işlemden sonra örnekler -25°C’de saklanabilir.

2.8. Dokudan Eksplant Kültür Yöntemiyle Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Doku eksplant kültür işleminin tamamı steril hava kabini içerisinde gerçekleştirilir. Sıçanlardan elde edilen adipoz dokuyu koymak için %10 fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich F6178, Almanya), %0.4 penisilin-streptomisin (Sigma Aldrich P4333, Almanya) içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium / Ham’s F12 (DMEM / F12) (Sigma Aldrich D5030, Almanya) besiyeri hazırlanır. Hazırlanan besiyeri içerisinde adipoz doku bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılır. Doku parçaları kontaminasyon riskini engellemek için cam petri kaplarıyla yıkanır. Adipoz doku parçaları 6 kuyucuklu kültür kaplarına alınarak üzerlerine birer damla %20 FBS, %0.1 penisilin-streptomisin içeren besiyeri damlatılmıştır. Dokuların kültür kabı yüzeyine tutunması ve uygun ortam oluşması için dokular 37°C’de ve %5 CO₂ %95 hava içeren kültür ortamında 20 dakika inkübe edilir. Bu işlemden sonra dokuların

üzerine tüm yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde %20 FBS, % 0.1 penisilin-streptomisin içeren besiyeri damlatılarak dokular bir gece inkübasyonda bekletildi. İşlem başlangıcının ertesi gününden itibaren kültürün takibi mikroskopik olarak yapılmış ve beşinci günde adipoz doku parçaları kültürden uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa % 20 FBS, % 0.2 penisilin-streptomisin içeren besiyeri eklenerek bir gün daha inkübasyona devam edildi. Daha sonra standart tripsinizasyon işlemi uygulanarak hücreler kaldırılıp 75 cm^2 'lik kültür kaplarının ekildi.

2.9. Karaciğer Dokusunun Hematoksilen ve Eozin Boyaları ile Boyanması

2.9.1. Hematoksilen Boyası Hazırlama

Kristal hematoksilenden (Sigma Aldrich H3136, Almanya) 1 g tartılarak %95'lik 10ml etil alkolde (Sigma Aldrich 32205, Almanya) çözdürülür. Distile sudan 200ml alınarak kaynatılır ve potasyum alum (Sigma Aldrich P79712, Almanya) bu sıcak su içerisinde eklenir. İki ayrı karışım yavaş bir şekilde mor renk alana kadar karıştırılır ve kaynatılır. Karışıma 0.5 g merkürük oksit (Sigma Aldrich 203793, Almanya) ilave edilir. Karışımın bulunduğu kap soğutulur ve üzerine birkaç damla asetik asit (Sigma Aldrich A6283, Almanya) eklenir.

2.9.2. Eozin Boyası Hazırlama

Distile sudan 20ml alınarak içerisinde 1 g eozin-y (Sigma Aldrich E-4009-5G) eritilir. Hazırlanan karışıma 595'lik etil alkol ve 5ml asetik asit eklenir.

2.9.3. Karaciğer Dokusunun Boyanması

Parafinden çıkarılan dokular %95'lik, %80'lik ve %70'lik alkollerle 10'ar dakika süreyle yıkanır. Dokular hazırlanan hematoksilen boyasının bulunduğu kaba

alınıp 5 dakika tutulur. Hematoksilende bekletilen dokular boyadan çıkarılarak akan su altında 10 dakika yıkanır. Yıkanan dokular asit alkole batırılarak mavi renk alana kadar burada bekletilir. Bu işlemden sonra dokular tekrar 10 dakika boyunca akan suyun altında yıkanır. Dokular eozin boyasının olduğu ortamda 4 dakika boyunca bekletilir. Dokulardaki fazla eozini uzaklaştırmak için sırasıyla %70'lik ve %80'lik etil alkole dokular daldırılıp çıkarılırken %90'lık etil alkolde dokular 20 dakika bekletilir. Dokular alkolden uzaklaştırılarak xylol (Sigma Aldrich 534056, Almanya) içerisine eklenir ve 10'ar dakika arayla 3 kez dokunun içerisinde bulunduğu xylol yenilenir. Bu işlemden sonra dokular tek tek entellan ((Sigma Aldrich 1079600500, Almanya) ile yapıştırılıp kurumaya bırakılır.



3. BULGULAR

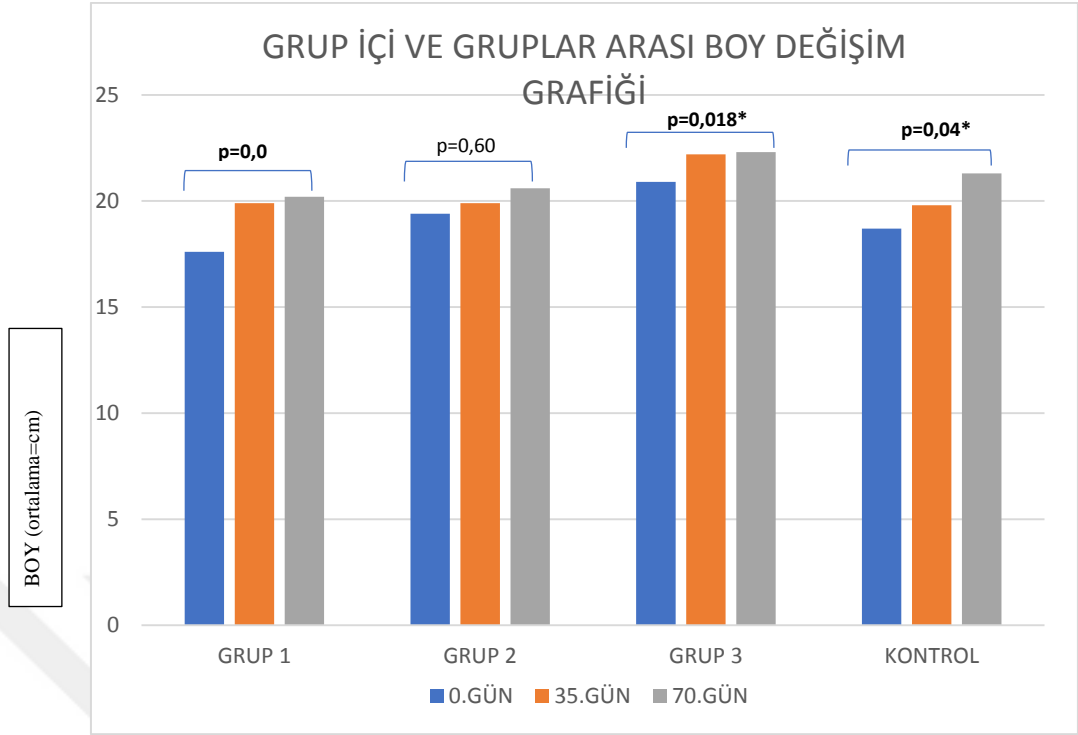
3.1. Boy Ölçüm Bulguları

Çalışma süresi boyunca 3 kez sıçanların BMI değerlerinin değişimlerini hesaplamak için sıçanların boyları ölçülmüştür ve santimetre cinsinden kaydedilmiştir. Çalışmanın ilk günü (0.gün)için Grup 1'deki sıçanların boy ortalamaları $17,6\text{cm} \pm 1,2\text{cm}$ (standart sapma) iken ortancası 18cm [$2,5\text{cm}$ (çeyrekler arası aralık)]'dir. Aynı şekilde Grup 2 için ortalama $19,4\text{ cm} \pm 1,6\text{cm}$ (standart sapma) ve ortanca 19 [$2,55\text{cm}$ (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama $20,9\text{cm} \pm 2,5\text{cm}$ (standart sapma) ve ortanca $20,5\text{cm}$ [3cm (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama $18,7\text{cm} \pm 1,3\text{cm}$ (standart sapma) ve 19cm [1cm (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. Çalışmanın ilk günü (0. gün) istatistiksel açıdan anlamlı olarak ($p=0,011$) en uzun boylu sıçanlar Grup 3'te bulunurken, en kısa boylu sıçanlar Grup 1'de yer almıştır. Çalışmanın ortasında (35. gün) Grup 1'deki sıçanların boy ortalaması $19,9\text{cm} \pm 1,7\text{cm}$ (standart sapma) iken ortancası 20cm [$1,75\text{ cm}$ (çeyrekler arası aralık)]'dir. Grup 2 için 35. günde ortalama $19,9\text{cm} \pm 1,3\text{ cm}$ (standart sapma) ve ortanca $19,5$ [2cm (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama $22,2\text{ cm} \pm 1,6\text{cm}$ (standart sapma) ve ortanca 22cm [$0,75\text{ cm}$ (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama $19,8\text{cm} \pm 1,6\text{cm}$ (standart sapma) ve ortanca 19cm [2cm (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki karşılaştırma 35. Günde anlamlı olarak ($p=0,018$); en uzun boylu sıçanlar Grup 3'te yer alırken, en kısa boylu sıçanlar Kontrol Grubunda yer almaktadır. En az uzayan sıçanlar Grup 2'de gözlemlenirken, en çok uzayan sıçanlar Grup 1'de bulunmaktadır. Çalışmanın son günü (70. Gün), Grup 1'deki sıçanların boy ortalamaları $20,2\text{cm} \pm 1,9\text{cm}$ (standart sapma) iken ortancası $20,5$ [$2,75\text{cm}$ (çeyrekler arası aralık)]'dir. Aynı şekilde Grup 2 için ortalama $20,6\text{cm} \pm 1,9\text{cm}$ (standart sapma) ve ortanca 20 [3cm (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama $22,3\text{cm} \pm 1,9\text{cm}$ (standart sapma) ve ortanca 22 [2cm (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama $21,3\text{cm} \pm 2,2\text{cm}$ (standart sapma) ve 21cm [4 cm (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. Gruplar

arasındaki boy farkları istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak son 35 günlük süre içerisinde en fazla boyu uzayan Kontrol Grubu olup, bunu Grup 2 ‘deki sıçanlar takip etmiştir . En az uzayan sıçanlar ise Grup 3’te yer almaktadır.Yetmiş günlük çalışma süresi içerisinde gruplar kendi içlerinde kıyaslandığında Grup 1, Grup 3 ve Kontrol Grubu’nda yer alan sıçanların boy değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ve Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Şekil 3.1.’de grup içi ve gruplar arası boy değişimi ifade edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmanın ilk (0.gün), orta (35.gün) ve son (70.gün) günlerinde yapılan boy ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Grup 1(cm) X±Sd	Grup 2 (cm) X±Sd	Grup 3 (cm) \bar{X}±Sd	Kontrol (cm) X ± Sd	Gruplar arasındaki karşılaştırma için p değeri
Boy 0.Gün	17,6± 1,2 18 (2,5)	19,4 ±1,6 19 (2,5)	20,9± 2,5 20,5 (3)	18,7± 1,3 19 (1)	0,011
Boy 35.Gün	19,9 ±1,7 20 (1,75)	19,9± 1,3 19,5 (2)	22,2 ±1,6 22 (0,75)	19,8± 1,6 19 (2)	0,018
Boy 70.Gün	20,2 ±1,9 20,5 (2,75)	20,6 ±1,9 20 (3)	22,3± 1,9 22 (2)	21,3 ±2,2 21 (4)	0,266
Grup içi P değeri	0,004	0,060	0,018	0,004	



Şekil 3.1. Çalışma süresi boyunca yapılan ölçümlere göre grup içi ve gruplar arası boy değişim grafiği. * ile ifade edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.

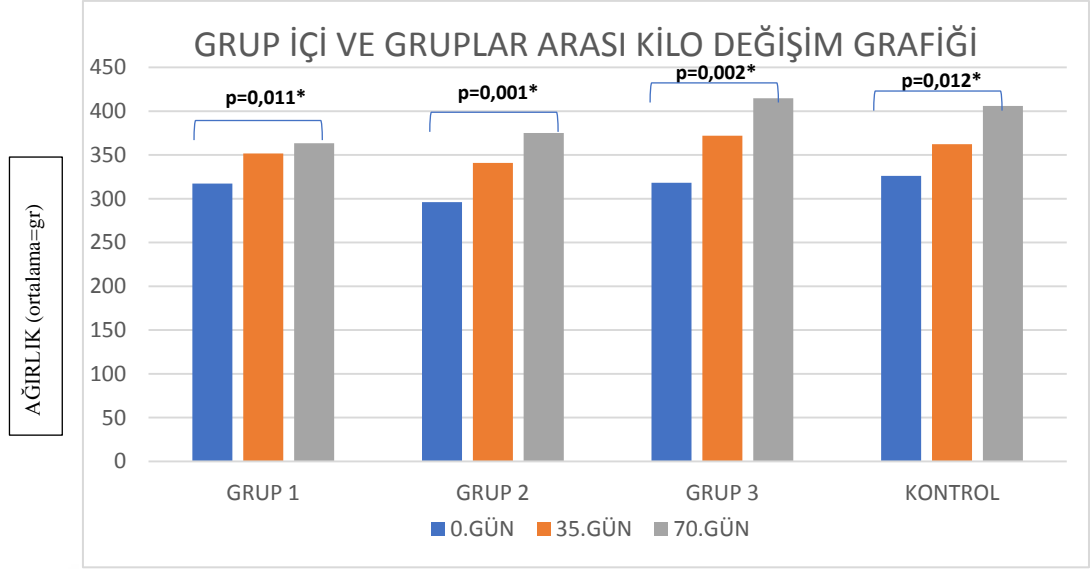
3.2. Ağırlık Değişim Bulguları

Sıçanların ağırlık değişimlerini belirlemek ve BMI değerlerini hesaplamak için çalışma süresi boyunca 3 kez ağırlıkları tartılmıştır ve gram cinsinden kaydedilmiştir. Deneyin ilk günü (0.gün) için Grup 1'deki sıçanların kilo ortalamaları $317,3g \pm 37,1g$ (standart sapma) iken ortancası $316g$ [64g (çeyrekler arası aralık)]'dir. Aynı şekilde Grup 2 için ortalama $296,2g \pm 48,7g$ (standart sapma) ve ortanca $302,5g$ [57,7g (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama $318,2g \pm 64,6g$ (standart sapma) ve ortanca $298g$ [73,7g (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama $326,1g \pm 50,1g$ (standart sapma) ve $310g$ [42,5g (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. Gruplar arasında çalışmanın ilk gününde (0. gün) gruplar arası kilo farklılıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Çalışmanın ortasında (35. gün) Grup 1'deki sıçanların ağırlık ortalaması $351,8g \pm 45,1g$ (standart sapma) iken ortancası $344,5g$ [38,7g (çeyrekler arası aralık)]'dir. Grup 2 için 35. günde ortalama $341g \pm 25,4g$ (standart sapma) ve ortanca $302,5g$ [57,7g (çeyrekler

arası aralık)], Grup 3 için ortalama 372g \pm 28,3g (standart sapma) ve ortanca 371,5g [34,2g (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama 362,3g \pm 59,1g (standart sapma) ve ortanca 348g [43g (çeyrekler arası aralık)]olarak bulunmuştur. Çalışmanın son günü (70. Gün), Grup 1'deki sıçanların ağırlık ortalamaları 363,4g \pm 40g (standart sapma) iken ortancası 359,5g [51g (çeyrekler arası aralık)] 'dir. Aynı şekilde Grup 2 için ortalama 375,1g \pm 20,2g (standart sapma) ve ortanca 381g [26g (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama 414,8g \pm 30,6 g(standart sapma) ve ortanca 407,5 g [43g(çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama 406g \pm ,159,3g(standart sapma) ve 392g [59g (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. Her bir grup kendi içinde 0. gün, 35. gün ve 70. gündeki ölçümler açısından kıyaslandığında kilo değişimleri anlamlı olmasına karşın gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı sonuca ulaşamamıştır (p>0,05) (Çizelge 3.2/ Şekil 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışmanın ilk (0. gün), orta (35. gün) ve son (70. gün) günlerinde yapılan ağırlık ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

AĞIRLIK (gr)	Grup 1 $\bar{X}\pm Sd$	Grup 2 $\bar{X}\pm Sd$	Grup 3 $\bar{X}\pm Sd$	Kontrol $\bar{X}\pm Sd$	Gruplar arasındaki karşılaştırma için p değeri
Kilo 0.Gün	317,3 \pm 37,1 316 (64)	296,2 \pm 48,7 302,5 (57,7)	318,2 \pm 64,6 298 (73,7)	326,1 \pm 50,1 310 (42,5)	0,751
Kilo 35.Gün	351,8 \pm 45,1 344,5 (38,7)	341 \pm 25,4 342 (49)	372 \pm 28,3 371,5 (34,2)	362,3 \pm 59,1 348 (43)	0,206
Kilo 70.Gün	363,4 \pm 40 359,5 (51)	375,1 \pm 20,2 381 (26)	414,8 \pm 30,6 407,5 (43)	406 \pm ,1 59,3 392 (59)	0,039
Grup içi P değeri	0,011	0,001	0,002	0,012	



Şekil 3.2. Çalışma süresi boyunca yapılan ölçümlere göre grup içi ve gruplar arası ağırlık değişim grafiği. * ile ifade edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.

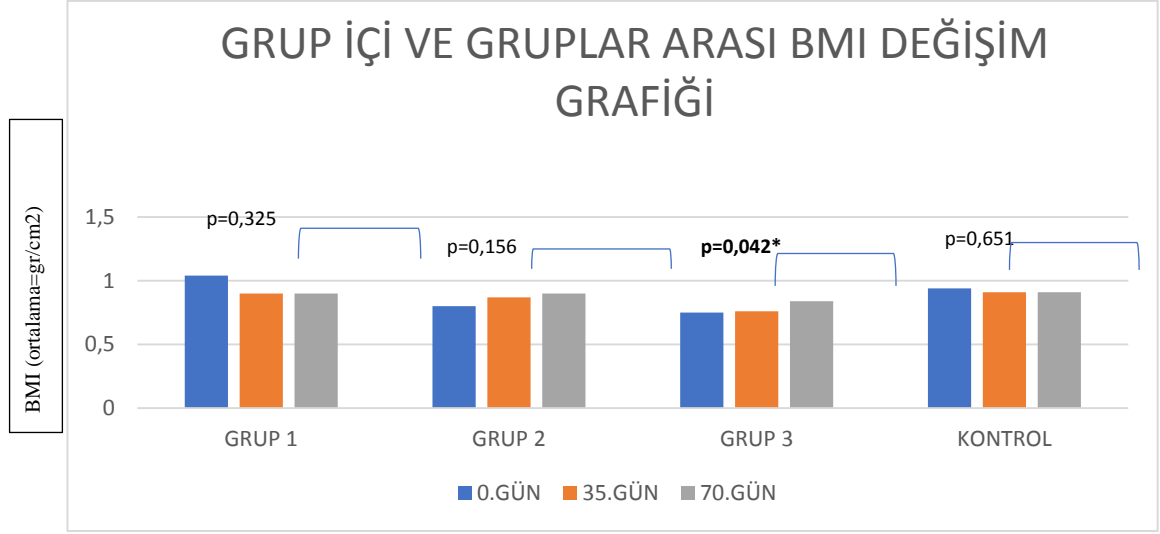
3.3. BMI Değişim Bulguları

Çalışma süresi boyunca sıçanların obezite değerlendirmelerinin yapılması amacıyla vücut ağırlığı/ boy^2 formülü kullanılarak 3 farklı zamanda BMI'leri hesaplanmıştır. Çalışmanın ilk günü (0. gün) için Grup 1'deki sıçanların BMI ortalamaları $1,04 \text{ g/cm}^2 \pm 0,21 \text{ g/cm}^2$ (standart sapma) iken ortancası $1,03 \text{ g/cm}^2$ [35 g/cm^2 (çeyrekler arası aralık)]'dir. Aynı şekilde Grup 2 için ortalama $0,80 \text{ g/cm}^2 \pm 0,18 \text{ g/cm}^2$ (standart sapma) ve ortanca $0,80 \text{ g/cm}^2$ [$0,28 \text{ g/cm}^2$ (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama $0,75 \text{ g/cm}^2 \pm 0,20 \text{ g/cm}^2$ (standart sapma) ve ortanca ve $0,78 \text{ g/cm}^2$ [$0,35 \text{ g/cm}^2$ (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama $0,94 \text{ g/cm}^2 \pm 0,20 \text{ g/cm}^2$ (standart sapma) ve $0,89 \text{ g/cm}^2$ [$0,35 \text{ g/cm}^2$ (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. Gruplar arasında çalışmanın ilk gününde (0. gün) gruplar arası BMI farklılıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Çalışmanın ortasında (35. gün) Grup 1'deki sıçanların BMI ortalaması $0,90 \text{ g/cm}^2 \pm 0,12 \text{ g/cm}^2$ (standart sapma) iken ortancası $0,87 \text{ g/cm}^2$ [$0,13 \text{ g/cm}^2$ (çeyrekler arası aralık)]'dir. Grup 2 için 35. günde ortalama $0,87 \text{ g/cm}^2 \pm 0,12 \text{ g/cm}^2$ (standart sapma) ve ortanca $0,85 \text{ g/cm}^2$ [$0,18 \text{ g/cm}^2$ (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama $0,76 \text{ g/cm}^2 \pm 0,1 \text{ g/cm}^2$ (standart sapma) ve ortanca $0,79 \text{ g/cm}^2$

[0,12 g/cm² (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama 0,91 g/cm² ±0,11 g/cm² (standart sapma) ve ortanca 0,93 g/cm² [0,19 g/cm² (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. Çalışmanın son günü (70. Gün), Grup 1'deki sıçanların BMI ortalamaları 0,90 g/cm² ± 0,17 g/cm² (standart sapma) iken ortancası 0,89 g/cm² [0,24 g/cm² (çeyrekler arası aralık)] 'dir. Aynı şekilde Grup 2 için ortalama 0,90 g/cm² ± 0,16 g/cm² (standart sapma) ve ortanca 0,90 g/cm² [0,28 g/cm² (çeyrekler arası aralık)], Grup 3 için ortalama 0,84 g/cm² ± 0,13 g/cm² (standart sapma) ve ortanca 0,85 g/cm² [0,2 g/cm² (çeyrekler arası aralık)] ve son olarak Kontrol Grubu için ortalama 0,91 g/cm² ±0,15 g/cm² (standart sapma) ve 0,84 g/cm² [0,24 g/cm² (çeyrekler arası aralık)] olarak bulunmuştur. İlk 35 gün içinde en çok kilo alan sıçanlar Grup'3 te yer alırken, Grup 1'deki sıçanlar en az kilo alanlardır. İkinci 35 gün içinde ise en çok kilo alan sıçanlar kontrol grubu sıçanları olurken, en az kilo alan hayvanlar yine Grup 1 'de yer almıştır. Sıçanların BMI değerlerindeki değişimin istatistiksel bulguları Çizelge 3.3'te gösterilmekte ve bu bulguların grafiksel ifadeleri Şekil 3.3'te yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Çalışmanın ilk (0.gün), orta (35.gün) ve son (70.gün) günlerinde yapılan BMI ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

BMI (gr/cm ²)	Grup 1 $\bar{X} \pm Sd$	Grup 2 $\bar{X} \pm Sd$	Grup 3 $\bar{X} \pm Sd$	Kontrol $\bar{X} \pm Sd$	Gruplar arasındaki karşılaştırma için p değeri
BMI 0.Gün	1,04± ,21 1,03 (0,35)	0,80± 0,18 0,80 (0,28)	0,75 ±0,20 0,78 (0,35)	0,94 ±0,20 0,89 (0,35)	0,067
BMI 35.Gün	0,90 ±0,12 0,87 (0,13)	0,87 ±0,12 0,85 (0,18)	0,76 ±0,1 0,79 (0,12)	0,91 ±0,11 0,93 (0,19)	0,071
BMI 70.Gün	0,90± 0,17 0,89 (0,24)	0,90± 0,16 0,90 (0,28)	0,84± 0,13 0,85 (0,2)	0,91 ±0,15 0,84 (0,24)	0,981
Grup içi P değeri	0,325	0,156	0,042	0,651	



Şekil 3.3. Çalışma süresi boyunca yapılan ölçümlere göre grup içi ve gruplar arası BMI değişim grafiği. * ile ifade edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.

3.4. Hemogram Bulguları

Kontrollü olarak sirkadiyen saat ritmi değiştirilmiş sıçanların periferik kan elemanları ve indirekt olarak kemik iliğindeki değişiklikleri gözlemlemek amacıyla çalışma süresi boyunca sıçanların hemogram takibi yapılmıştır. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Kontrol Gruplarından çalışmanın ilk günü (0. Gün), ortası (35. gün) ve son günü (70. Gün) alınan kanlarla yapılan hemogram değerlendirmeleri Çizelge 3.5'teki gibidir. Analiz için yeterli sayıda örnek olmadığından, değerlerin karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır ($p > 0,05$). Sıçanların hematolojik parametrelerinin normal değerleri Çizelge 3.4 de gösterilmektedir.

Çizelge 3.4 Sıçanların hematolojik parametrelerinin normal değerleri (Johnson ve ark., 1996)

ERİTROSİT SAYISI	6.76-9.75 x 10 ⁶ /mm ³
LÖKOSİT SAYISI	6.6-12.6x10 ³ /mm ³
HEMOGLOBİN	11.5-16.1g/dL
NÖTROFİL	1.77-3.38 x10 ³ /mm ³
LENFOSİT	4.78-9.12 x10 ³ /mm ³
EOZİNOFİL	0.03-0.08 x10 ³ /mm ³
MONOSİT	0.01-0.04 x10 ³ /mm ³
BAZOFİL	0.00-0.03 x10 ³ /mm ³
TROMBOSİT	150-460 x10 ³ /mm ³

Çizelge 3.5. Çalışmanın ilk (0. gün), orta(35. gün) ve son (70. gün) günlerinde test edilen hematolojik parametrelerin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi.(-) olarak ifade edilen alanlarda analiz için yeterli kan örneği bulunmadığından çalışma yapılamamıştır.

	Grup 1 X±Sd	Grup 2 X±Sd	Grup 3 X±Sd	Kontrol X±Sd	Gruplar arasındaki karşılaştırma için p değeri
WBC 0.Gün	12,2 - 12,2 (-)	10 ±0,70 10 (-)	23,1 ±12,2 23,1 (-)	27,2± 12,4 27,2 (-)	0,169
WBC 35.Gün	6,25± 0,49 6,25	6,05± 1,06 6,05	7,2 ±0,85 7,2	5,65± 1,20 5,65	0,380
WBC 70.Gün	5,4 ±0,56 5,4	4,2 ±4,95 4,2	6,45 ±0,35 6,45	8,8 ±1,55 8,8	0,252
Grup içi P değeri	-	0,223	0,223	0,135	
Lym 0.Gün	8,2 - 8,2 -	7,55 ±0,21 7,55	17 ±10,9 17	18,9± 8,5 18,9	0,169
Lym 35.Gün	3,9± 1 3,9	4,25± 0,8 4,25	4,95 ±0,8 4,95	3,95 ±0,91 3,95	0,668
Lym 70. Gün	3,75± 0,64 3,75	2,8 ±3,39 2,8	4,6± 0,42 4,6	5,85 ±0,78 5,85	0,198
Grup içi P değeri	-	0,223	0,223	0,135	

Çizelge 3.5. devamı Çalışmanın ilk (0. gün), orta(35. gün) ve son (70. gün) günlerinde test edilen hematolojik parametrelerin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi.(-) olarak ifade edilen alanlarda analiz için yeterli kan örneği bulunmadığından çalışma yapılamamıştır.

Mono 0.Gün	0,5 0,5	0,55 ±0,07 0,55	1 ±0,14 1	1,3 ±0,70 1,3	0,198
Mono 35. Gün	0,35 ±0,21 0,35	0,40 ±0,14 0,40	0,45± 0,35 0,45	0,4 - 0,4 -	0,988
Mono 70.Gün	0,45 ±0,7 045	0,30 ±0,28 0,30	0,45 ±0,07 0,45	0,60± 0,14 0,60	0,435
Grup içi P değeri	-	0,156	0,223	0,135	
RBC 0.Gün	9,1± 0,8 9,1	9,15± 1,34 9,15	7,41± 0,33 7,41	8,94 ±2,2 8,94	0,418
RBC 35.Gün	7,94 ±0,36 7,94	7,85± 0,7 7,85	7,99 ±1,01 7,99	6,33 ±0,29 6,33	0,261
RBC 70. Gün	8 ±0,07 8	4,15± 5,22 4,15	7,79± 0,26 7,79	8,43± 0,07 8,43	0,139
Grup içi P değeri	0,223	0,223	0,223	0,223	
Gran 0.Gün	1,6 - 1,6 -	1,9 ±0,42 1,9	5,15± 1,2 5,15	7,05 ±3,18 7,05	0,169
Gran 35.Gün	2 ±0,71 2	1,4 ±0,14 1,4	1,8 ±0,28 1,8	1,3 ±0,28 1,3	0,224
Gran 70.Gün	1,2 - 1,2	1,1 ±1,27 1,1	1,4 - 1,4 -	2,35± 0,92 2,35	0,310
Grup içi P değeri	-	0,223	0,135	0,135	
Grup içi P değeri	0,223	0,135	0,223	0,135	
MCV 0.Gün	58,3± 2,26 58,3	53,7 ±3,81 53,7	66,2 ±11,9 66,2	58,3± 6,58 53,5	0,321
MCV 35.Gün	50,2± 0,28 50,2	49,4± 1,97 49,4	48,9 ±1,69 48,9	48,4 ±0,99 48,4	0,509
MCV 70.Gün	27,1± 31,1 27,1	47,6 ±3,11 47,6	45,6 ±0,63 45,6	46,2 ±1,91 46,2	0,801
Grup içi P değeri	0,135	0,223	0,135	0,135	
Hb 0.Gün	20,8 ±3,53 20,8	18,9 ±0,99 18,9	21,8± 0,63 21,8	21,5 21,5	0,482
Hb 35. Gün	15,6 ±0,99 15,6	14,9 ±1,98 14,9	14,9 ±2,33 14,9	12 ±0,42 12	0,252
Hb 70. Gün	15,4 15,4	7,8 ±9,75 7,8	14,7 ±0,21 14,5	15,5 15,5	0,097
Grup içi P değeri	0,223	0,135	0,223	-	

Çizelge 3.5 devamı Çalışmanın ilk (0. gün), orta(35. gün) ve son (70. gün) günlerinde test edilen hematolojik parametrelerin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi.(-) olarak ifade edilen alanlarda analiz için yeterli kan örneği bulunmadığından çalışma yapılamamıştır.

Hct 0.Gün	53,1 ±6,71 53,1	48,8± 3,74 48,8	48,9 ±6,64 48,9	51,5 ±6,85 51,5	0,682
Hct 35.Gün	39,8± 2,05 39,8	38,8± 5,02 38,8	39,2± 6,36 39,2	30,6± 0,77 30,6	0,261
Hct 70.Gün	39,6 ±0,21 29,6	18,9± 23,5 18,9	35,6± 0,70 35,6	39 ±1,27 39	0,139

3.5. Kan Biyokimyası Bulguları

Çalışma süresi boyunca yağ, karbonhidrat ve protein metabolizmalarındaki sirkadiyen saat ritminin etkilerini takip edebilmek amacıyla biyokimyasal analizler yapılmıştır. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Kontrol Gruplarından deneyin ilk günü (0. Gün), ortası (35. gün) ve son günü (70. Gün) alınan kanlarda çalışılan alkalen fosfataz (ALP), alanin amino transferaz (ALT), Albumin, Glukoz ve Kolesterol değerlendirmeleri Çizelge 3.6.'daki gibidir. Analiz için yeterli sayıda örnek olmadığından, değerlerin karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 3.6. Çalışmanın ilk (0. gün), orta(35. gün) ve son (70. gün) günlerinde yapılan biyokimya analizi değerlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi. (-) ile ifade edilen alanlarda analiz için yeterli kan örneği bulunmadığından çalışma yapılamamıştır.

	Grup 1 X±Sd	Grup 2 X±Sd	Grup 3 X±Sd	Kontrol X±Sd	Gruplar arasındaki karşılaştı- rma için p değeri
ALP 0.Gün	200 200	232 232	244 244	96 ±90,5 96	0,284
ALP 35.Gün	138 138	236 ±154,1 236	187± 80,6 187	119,5± 7,78 119,5	0,290
ALP 70.Gün	74,5 ±92,6 74,5	145,5 ±55,9 145,5	111,5± 19,1 111,5	112,5± 24,7 112,5	0,801
Grup içi P değeri	-	-	-	1	

Çizelge 3.6. devamı Çalışmanın ilk (0. gün), orta(35. gün) ve son (70. gün) günlerinde yapılan biyokimya analizi değerlerinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi. (-) ile ifade edilen alanlarda analiz için yeterli kan örneği bulunmadığından çalışma yapılamamıştır.

ALT 0.Gün	56 56	68 68	300 300	40± 22,6 40	0,317
ALT 35.Gün	48 48	51,5± 3,53 51,5	50 50	51 51	0,449
ALT 70.Gün	65 ±11,3 65	56 56	50,5± 3,53 50,5	51,5± 6,36 51,5	0,143
Grup içi P değeri	-	-	-	-	
Albumin 0.Gün	3,56 3,56	2,8 2,8	2,96 2,96	3,2 ±0,17 3,2	0,284
Albumin 35. Gün	3,7 3,7	3,65± 0,21 3,65	3,65 ±0,07 3,65	3,5 3,5	0,661
Albumin 70. Gün	3,52 ±0,09 3,52	3,29 ±0,01 3,29	3,30± 0,18 3,30	3,30 ±0,21 3,30	0,261
Grup içi P değeri	-	-	-	-	
Glukoz 0.Gün	192 192	188 188	212 212	186 ±14,1 186	0,532
Glukoz 35. Gün	278 278	255 ±1,41 255	293 293	294 294	0,284
Glukoz 70.Gün	283± 8,48 283	294± 11,3 294	265± 24 265	298,5± 3,53 298,5	0,212
Grup içi P değeri	-	-	-	-	
Kolesterol 0.Gün	76 76	32 32	36 36	44 ±16,9 44	0,443
Kolesterol 35Gün	50 50	61,5 ±6,36 61,5	53,5 ±4,94 53,5	55± 11,3 55	0,555
Kolesterol 70.Gün	57 ±11,3 57	47 ±4,24 47	47 ±21,2 47	52,5± 12 52,5	0,788
Grup içi P değeri	-	-	-	0,135	

Sıçanların kan biyokimyasal parametrelerinin normal değerleri Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. Sıçanların biyokimyasal parametrelerinin normal değerleri (Johnson ve ark., 1996)

TOTAL PPROTEİN	5.6-7.6 gr/dL
ALBUMİN	3.8-4.8 gr/dL
GLÜKOZ	50-135 mg/dL
BUN	15-21 mg/dL
KREATİNİN	0.2-0.8 mg/dL
ALT	17.5-30.2 U/L
AST	47.7-80.8 U/L
ALKALEN FOSFATAZ	56.8-128 U/L
KOLESTEROL	40-130 mg/dL

3.6. Sıçanların Organ Ağırlıklarının İncelenmesi

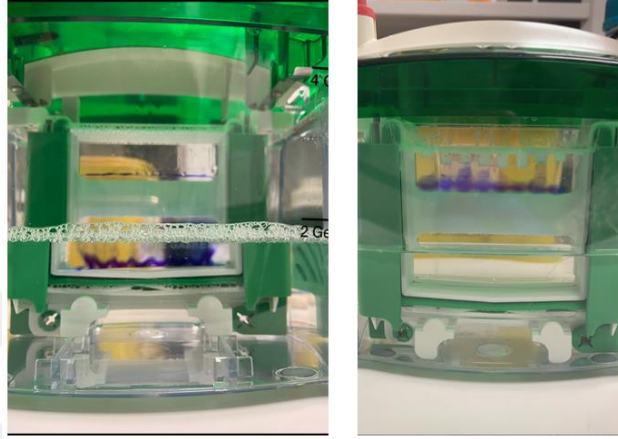
Tüm gruptaki sıçanlar sakrifiye edildikten sonra karaciğer, beyin, paravertebral yağ dokusu ve organ çevresindeki yağ dokusu çıkarılarak tartılmıştır. Gruplar arasında bu organların ve yağ dokusunun ağırlık ortalamaları Çizelge 3.8'de gösterilmektedir. Belirtilen organların ve yağ dokusunun ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç çıkmamaktadır.

Çizelge 3.8. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra çıkarılan organlar ve yağ dokusunun tartılarak ağırlıklarının değerlendirilmesi.

DOKU AĞIRLIĞI	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	KONTROL	Gruplar Arası P Değeri
KARACİĞER	12,66±2,88	17,35±0,21	18,70±1,83	16,98±0,11	0,104
BEYİN	3,57±0,38	3,80±0,27	3,90±0,28	3,24±0,02	0,198
PARAVERTEBRAL YAĞ DOKUSU	1,26±0,48	6,28	3,61±0,61	4,31±2,39	0,185
ORGAN ÇEVRESİNDEKİ YAĞ DOKUSU	3,48±0,82	4,85±1,20	5,11±1,60	-	0,208

3.7. Serumda Leptin Varlığının Tespiti

Tüm gruplardaki sıçanlardan 35'inci ve 70'inci günde alınan kanlardan serum elde edilerek SDS PAGE analizi yapılmış ve tüm grupların serumunda leptin proteininin varlığı tespit edilmiştir. Serum leptin tespiti için yapılan SDS PAGE çalışması Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Serum leptin proteininin tespiti için yapılan SDS PAGE çalışmasının gösterimi

3.8. Kandan mRNA İzolasyonu, Agaroz Jel Yürütmesi ve cDNA Sentez

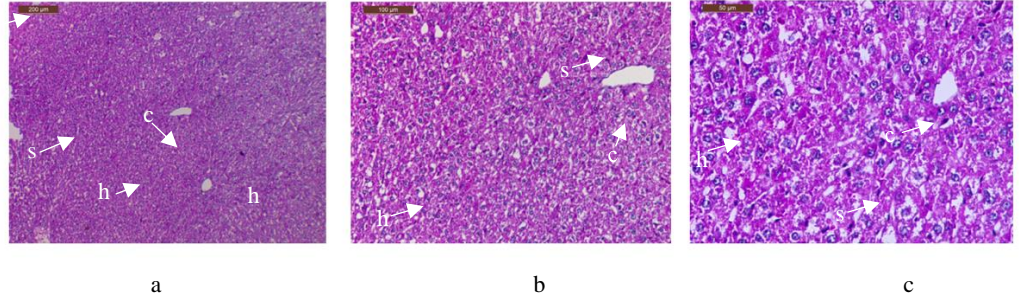
Sıçanlardan 35'inci ve 70'inci günde alınan kanlardan mRNA izole edilmiş ve izole edilen mRNA %2'lik agaroz jelde yürütüldüğünde herhangi bir kontaminasyon veya RNA kırılmasına rastlanmamıştır. Çalışılan agaroz jelin görüntüsü Şekil 3.5'de gösterilmiştir. Elde edilen mRNA'dan cDNA sentezlenmiştir. Pandemi süreci sebebiyle sarfiyat sorunu giderilemediğinden elde edilen cDNA'dan PCR çalışması yapılamamıştır.



Şekil 3.5. Kandan elde edilen mRNA'nın %2'lik agaroz jelde yürütülmesi.

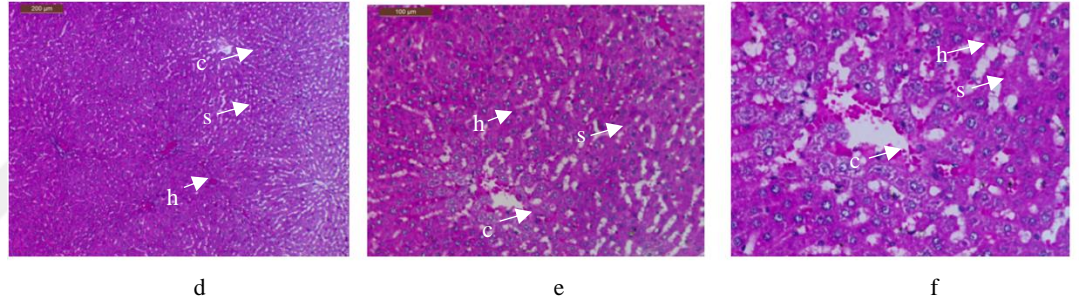
3.9. Karaciğer Dokusunun Hematoksilen ve Eozin Boyalarıyla Boyanması

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra karaciğer dokusu çıkarılmış ve parafinlenmiştir. Dokular hematoksilen ve eozin boylarıyla boyanmış, santral venler, hepatositler ve sinüoitler gösterilmiştir. Grup 3'te daha belirgin olmak üzere Grup 2'de de diğer gruplardan farklı olarak makroveziküler yağ infiltrasyonu gözlemlenmiştir. Fibroz doku ve inflamatuvar hücre artışına rastlanmamıştır. Tüm grupların karaciğer dokularının hematoksilen ve eozin boylarıyla boyanmış hali çizelge 3.6., çizelge 3.7, çizelge 3.8 ve çizelge 3.9.'da gösterilmiştir. Şekil 3.10'da makroveziküler yağlanma bulguları gösterilmiştir.



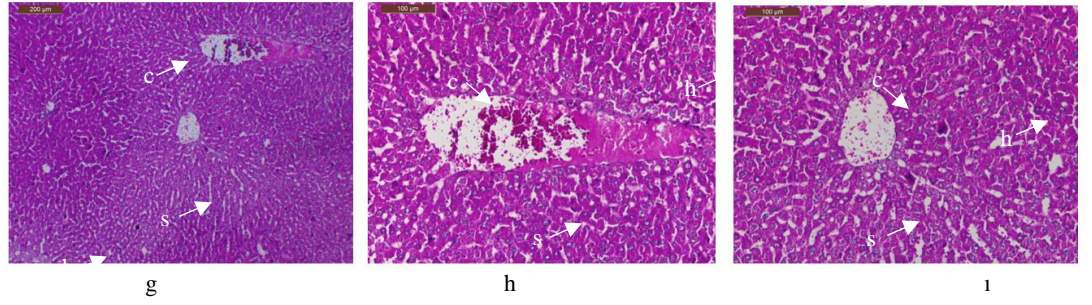
Şekil 3.6. Normal sıçan karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoksilin eozin ile boyanmış preparatlarının gösterimi. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme)

- a- Sıçan karaciğerin genel yapısı
b- Sıçan karaciğerin detaylı görüntüsü
c-b deki şeklin detayı
Oklardaki işaretlemeler:
c: central vein
s:sinosoid
h: hepatosit



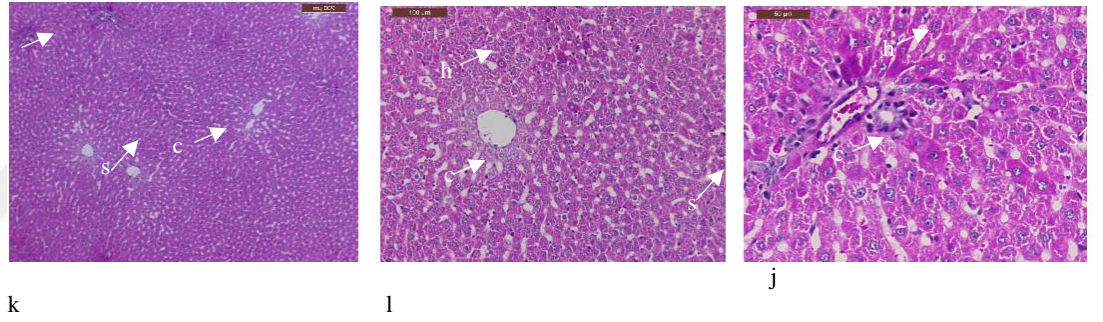
Şekil 3.7. Grup 1'deki sıçanların karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoksilin eozin ile boyanmış preparatları görülmektedir. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme)

- d- Sıçan karaciğerin genel yapısı
e- Sıçan karaciğerin detaylı görüntüsü
f-e deki şeklin detayı
Oklardaki işaretlemeler:
c: central vein
s:sinosoid
h: hepatosit



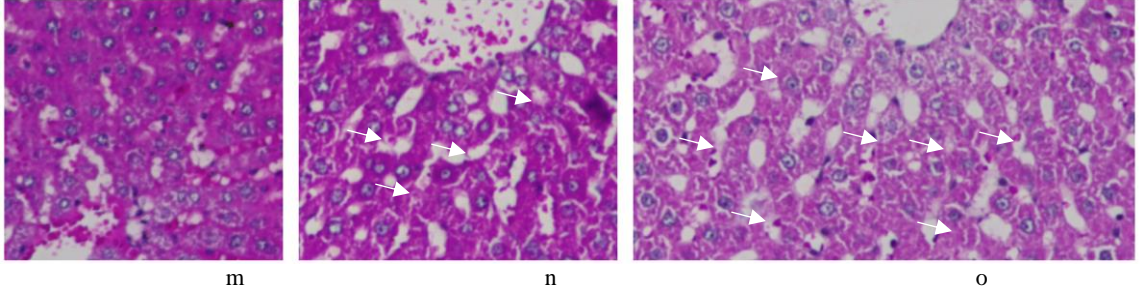
Şekil 3.8. Grup 2'deki sıçanların karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoxilen eozin ile boyanmış preparatları görülmektedir. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme)

g- Sıçan karaciğerin genel yapısı
h- Sıçan karaciğerin detaylı görüntüsü
ı-h deki şeklin detayı
Oklardaki işaretlemeler:
c: central vein
s:sinosoid
h: hepatosit



Şekil 3.9. Grup 3'teki sıçanların karaciğerlerinin 70'inci gündeki hematoxilen eozin ile boyanmış preparatları görülmektedir. (Sırasıyla 200, 100 ve 50 μm büyütme)

j- Sıçan karaciğerin genel yapısı
k- Sıçan karaciğerin detaylı görüntüsü
l-k deki şeklin detayı
Oklardaki işaretlemeler:
c: central vein
s:sinosoid
h: hepatosit



Şekil 3.10. Sıçanlarda makroveziküler karaciğer yağlanması (100 μm büyütme).

m: Grup 1’de yer alan sıçanların normal karaciğer dokusu

n: Grup 2’de yer alan sıçanların makroveziküler karaciğer yağlanması

o: Grup 3’te yer alan sıçanların makroveziküler karaciğer yağlanması



4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kontrollü olarak sirkadiyen ritmi değiştirilen sıçanlardan elde edilen yağ dokularından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin, kök hücre özellikleri ve gen ifadelerindeki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 7 günde bir karanlık/aydınlık döngüleri değiştirilen sıçanların BMI değerleri, yağ dokusu miktarı, hemogram ve kan biyokimyası değerleri, böbrek ve karaciğer fonksiyonları ile birlikte serum leptin seviyesi ve mezenkimal kök hücrelerinde meydana gelen değişimlerin incelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada öncelikle; deney hayvanlarının sirkadiyen ritminin bozulması hedeflendi ve sıçanlar toplam 4 gruba ayrılarak, karanlık/aydınlık ritimleri değiştirildi. Grup 1'deki sıçanların saat döngüsü planlanırken gece vardiyalı çalışanların uyku ve uyanıklık döngüleri göz önüne alındı. Sağlık çalışanları, polisler, rafineri ve demiryolu çalışanları örnek alındı. Grup 2'de yer alan sıçanların döngüsüne benzer bir döngüye gündelik hayatta örnek oluşturabilecek bir durum olmamakla birlikte, sıçanların aktif pasif döngülerinin ışıktan etkilendiğini bilinerek faz döngüsü tasarlandı (Devan ve ark., 2001). Grup 3'teki sıçanların aydınlık karanlık süreleri sabit tutuldu ancak aktif ve pasif faz süreleri en uzun olacak şekilde ayarlandı. Bu grup negatif kontrol grubu olarak düşünüldü. Sıçanların normal karanlık-aydınlık döngüsünün 12 saat gündüz 12 saat gece olduğu kabul edilerek, Grup 4'te bulunan kontrol hayvanlarının döngüsü doğal ritminde devam etti (Herrero ve ark., 2015). Sıçanların uyku/uyanıklık döngüsüne bağlı olarak gelişen beslenme alışkanlıklarının otomatik hale gelmesi literatürle desteklenecek şekilde 70 gün olarak belirlenmiştir (Gardner ve ark.,2012; Lally ve ark.,2009; Lally ve ark.2011)). Bu sürenin sonunda sıçanların sirkadiyen ritm döngülerinin bozulduğu kabul edilerek sıçanlar kurban edilmektedir.

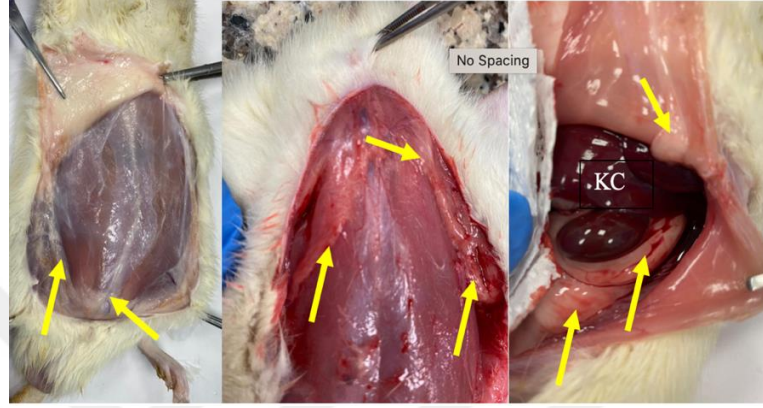
Sıçanların kilo alım süreci verilen yemeğin kalitesi, sıçanların barındıkları kafesin büyüklüğü, sıcaklık, nem ve ışık değişikliklerinden etkilenir (Nistiar ve ark., 2012). Sirkadiyen saat enzim aktivitelerini, hormonları ve transport mekanizmasını kontrol ederek metabolizmayı etkiler (Froy ve ark.,2012). Sirkadiyen genlerinin

lipojenik ve adipojenik yollarla ilişkisi olduğu, sirkadiyen genleri mutant olan hayvanlarda metabolik homeostazın bozulmasıyla ortaya konmuştur (Dibner ve ark., 2015). Sıçanlarda sirkadiyen ritmin değiştirilmesinin kilo alımına yol açtığı literatürde gösterilmiştir (Arble ve ark.,2012). Çalışmamızda, gruplar arasında sıçanların ışık ile bozulan sirkadiyen ritmi ve kilo artışları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Grup içi kilo artışı değerlendirmelerimizde her dört grup için anlamlı bir istatistiksel kilo artışı saptanmıştır. Grup 3'te yer alan sıçanlar 0-35 gün aralığında diğer gruplardaki sıçanlara göre daha çok kilo almıştır. Grup 1'deki ler ise 0-35 gün aralığında en az kilo alan sıçanlardır. Kontrol Grubu'nun 35-70 gün aralığında diğer gruplara göre kilo artışı diğer gruplara göre daha fazla olurken, Grup 1'deki sıçanlar diğer gruplara göre daha az kilo almıştır. Grup 3'te yer alan sıçanların gece gündüz döngüsünün düzensiz olması literatürle uyumlu olarak bu sıçanlarda kilo artışına sebep olmuştur.

Sirkadiyen saat ritminde meydana gelen önemli değişiklikler obezitenin sebeplerinden birisidir (Martins ve ark., 2011). Dünya Sağlık Örgütü BMI değerinin obezite tanımlanırken dikkate alınmasını önermektedir (Deurenberg ve ark.,2002). Aydınlik/karanlık döngüsünün bozulması BMI değerinin yüksekliği ile ilişkilendirilmiştir (Baron ve ark., 2012). Erişkin erkek wistar sıçanlar için normal vücut kitle indeksi sınıflandırmasının 0.45- 0.68 g/cm² aralığı olduğu bildirilmiştir (Novelli ve ark., 2007). Bu veriler göz önüne alındığında; çalışmamızın başlangıcından itibaren sıçanlar BMI değerleri açısından obezdir. Sıçanların ağırlıkları ve BMI değerleri tüm gruplarda artmıştır. BMI değerindeki en fazla değişim Grup 3'teki sıçanlarda kaydedilmiştir. Grup 3'te meydana gelen BMI değerindeki fazla artışın aktif ve pasif faz süresinin uzunluğundan kaynaklandığı söylenebilir.

BMI değeri ve vücut yağ oranı klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda genelde obezite belirteci olarak kullanılan parametrelerdir (Smalley ve ark., 1990; -Spiegelman ve ark.,1992). BMI bir ağırlık belirteciyken yağlanmayla ilgili fazla bilgi vermez. BMI değeri vücut yağının ağırlığını ve yağsız ağırlığını ayrı ayrı direkt olarak ifade etmez (Kvist ve ark., 1988; Baumgartner ve ark.,1995). BMI, abdominal yağlanma ve visseral yağlanmayla dolaylı olarak ilişkilidir (Bouchard ve ark., 1994). Çalışmamızda

Grup 3'te yer alan sıçanlarda BMI değerlerinde artış görülmüştür. Sıçanlar sakrifiye edildiğinde literatürle uyumlu olarak Grup 3'teki sıçanlarda periton üzerinde ve organ çevresinde yaygın yağlanma gözlemlenmiştir. Sıçanlarda gözlemlenen periton üzerinde ve organ çevresindeki yağlanma Şekil 4.1 'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Çalışmamızda yer alan sıçanların periton üzerinde ve organlar çevresinde biriken yağ dokusunun görünümü.

Sirkadiyen saat ritminin bozulması immnolojik dengeyi de etkiler (Tsujimura ve ark., 2009). Sirkadiyen saat ritminin bozulmasıyla sempatik sistem aktive olduğundan, immünolojik denge inflamasyon tarafına kayar (Mullington ve ark., 2010). Bu bağlamda uyku süresindeki azalma periferik kanda beyaz kan hücrelerinin artmasına sebep olur (Lasselin ve ark., 2015). Periferik kandaki lökositlerin sayısını periyodik olarak değiştiren faktörlerden biri de sirkadiyen saat ritminde meydana gelen değişikliklerdir. Sirkadiyen saat ritmine bağlı olarak böbrek üstü bezlerinden salgılanan kortikosteroid seviyesi de artmaktadır. Kortikosteroidlerin etkisiyle periferik kanda dolaşan lökosit ve trombositlerin sayısı artar, lenfosit ve monositlerin sayısı azalır (Katsutaka ve ark., 2006). Çalışmanın 0. Gününde 4 grup sıçandan alınan kanlardaki hemogram sonuçları muhtemelen bir laboratuvar aksaklığından dolayı beklenmedik seviyelerde bulunmuştur. Ancak bu sırada sıçanların sirkadiyen ritimleri henüz değiştirilmeye başlanmamıştır. Çalışmanın 35. ve 70. günlerin alınan kanlardan çalışılan hemogram parametreleri normal sınırlara yaklaşmıştır, ancak literatürde belirtilen şekilde bir değişim gözlemlenmemiştir. Başlangıçta tüm gruplarda lökosit sayısı normalin üzerindeyken 35. Gündeki ölçümlerde normal değerler arasında bulunmuştur. Sirkadiyen saat ritminde meydana gelen bozulmalar sonucu ortaya çıkan

strese bağlı olması muhtemel şekilde 70. günde Grup 3 hariç diğer gruplarda lökosit sayısının normal değerler altına düşmesine sebep olmuş olabilir. Grup 3'ün 70. günde alınan kan örneklerine göre lökosit seviyesi normal değer aralığında bulunmuştur.

Sirkadiyen saat ritminin karaciğer üzerinde de etkileri vardır (Abdelmalek ve ark., 2007). Sirkadyen saat ritminde meydana gelen bozukluklar karaciğerde lipid metabolizması, karbonhidrat metabolizması ve karaciğer hücre rejenerasyonu üzerinde etkilidir (Calrk ve ark., 2002; Diehl ve ark.,2002). Karaciğer yağlanması nendenlerinden birisi de sirkadiyen saat ritmindeki değişime bağlı olarak meydana gelen metabolik sendromlardır (Jou ve ark., 2008). Karaciğer yağlanmasına bağlı olarak hepatosit hasarı meydana geldiğinde periferik kanda ALT ve ALP değerlerinde artış olması beklenir (Montagnese ve ark., 2009; Steindl ve ark., 1995). Çalışmanın 0.gün, 35. gün, 70. günlerinde alınan kanlar sonucunda ALP ve ALT değerlerinin normalden yüksek olması, başlangıçtan itibaren sıçanların obez olması ve karaciğer yağlanmasıyla açıklanabilir. Ancak sirkadiyen saat ritmi bozulduktan sonraki dönemde 35. Güne kadar ALP ve ALT düzeylerinde hafif bir azalma gözlemlenirken, 35. ve 70. Gün arasında bu değerler tekrar artış eğilimi göstermiştir. Sirkadiyen ritmin 35. günden sonra etkisini değerler üzerinde daha net göstermesi muhtemeldir. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra karaciğerlerinden alınan kesitlerin hematoksilen ve eozin boyasıyla boyanması sonucunda Grup 3'te daha belirgin olmak üzere Grup 2 ve Grup 3'teki sıçanlarda makroveziküler karaciğer yağlanması görülmüştür. Özellikle aydınlık7karanlık süresi uzun tutulan bu sıçanlarda gözlemlenen makroveziküler yağlanma ALP ve ALT değerlerinin serum düzeyindeki yüksekliğiyle uyumludur. Karaciğer yağlanmasında görmeyi beklediğimiz perisünizoidal inflamatuvar hücre artışına rastlanmamıştır. Hepatosteatozun (karaciğer yağlanması) geç dönemlerinde karaciğerde fibrosizde gözlemlenebilir. Sıçanlardan alınan örneklerde fibrosiz gözlemlenmemiştir.

Kronik karaciğer hastalıklarında karaciğerin albümin sentez kapasitesinin azalmasına bağlı olarak hipoalbünemi gelişebilir (Gatta ve ark., 202). Bazı hastalıklarda böbrekten ve ya bağırsaktan abüminin kaybedilmesine ve ek olarak akut inflamasyonun göstergesi olarak da serum albümin seviyesi düşebilir (Bochatay ve

ark., 2015). Sirkadiyen saat ritminde meydana gelen bozukluklarda immünolojik dengenin inflamasyon tarafına kaymış olması ve sempatik aktivitenin hakim olması nedeniyle serum albümin düzeyinin düşmesi beklenir (Mullington ve ark., 2010). Bunun yanı sıra sirkadiyen saat ritmindeki bozuklukların karaciğer yağlanması ve hatta daha ileri dönemde karaciğer sirozuna yol açabilmesi sebebiyle siroz gelişmiş canlılarda da serum albümin seviyesi düşer (Montagnese ve ark., 2009). Çalışmamızda yer alan sıçanların serum albümin düzeyleri çalışmanın başından itibaren normal değerlerin altındadır. Bu da karaciğerin yağlanmasına bağlı albümin sentez rezervinin düşüklüğündense ve muhtemelen immünolojik dengenin inflamasyon tarafında yer almasındandır. Çalışma boyunca grupların albümin seviyeleri sürekli düşük saptanmış olup ancak literatüre uygun olacak şekilde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Obeziteyi tanımlamak için çoğunlukla BMI, kalça çevresi ölçümü, iç organ yağlanması gibi parametreler kullanılsa da yapılan çalışmalar obezite ve serum lipid profili ilişkisinin altını çizmektedir (Amato ve ark., 2010; Bozorgmanesh ve ark., 2011; Karakaş ve ark., 2012; Rizzo ve ark., 2012; Sneider ve ark., 2010; Stepien ve ark., 2011). Serum kolesterol düzeyinin yüksekliğiyle BMI değeri arasında pozitif bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (Gostynski ve ark., 2004). Çalışmamızda deneyin 0. günü, 35. günü ve 70. gününde sıçanlardan alınan kan örneklerinde kolesterol değerleri normal değerler arasında kalarak, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir.

Sirkadiyen saat ritminde meydana gelen değişiklikler obezite, tip 2 diyabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserle ilişkilendirilir (DeFronzo ve ark., 2005). Hipertansiyon, diyabetes mellitus ve obezite birbirleriyle ilişkili metabolik bozukluklardır. Komorbidite gelişimini genellikle diyabetes mellitusun varlığı destekler (Martins ve ark.,2011). Vardiyalı çalışma ve uyku yoksunluğu gibi durumlar sirkadiyen saat ritmi bozukluklarına neden olduğunda, pankreastaki beta adacık hücreleri doğrudan veya dolaylı yoldan etkilendiğinden tip 2 diyabetes mellitusun gelişmesinin destelemektir (Zimmet ve ark.,2019). Gece vardiyalı çalışanlarda gündüz çalışanlara göre potasyum, ürik asit, glukoz, kolesterol ve total lipid değerlerinin arttığı gösterilmiştir (Orth-Gomer ve ark.,1983; Theorell ve ark.,1976).

Çalışmamızda deneyin 0. günü, 35. günü ve 70. gününde sıçanlardan alınan kan örneklerinde glukoz, normal değerlerin üzerinde olup; ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Glukoz değerlerinin tüm gruplar için sirkadiyen saat ritmi değişiklikleri yapılmadan önce de yüksek olması sıçanların deneyin başından itibaren muhtelemen obezitenin eşlik ettiği diyabetin varlığını desteklemektedir. Artışlar istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte en çok artışın aktif pasif faz süresi en uzun tutularak sirkadiyen saat ritmi bozulan Grup 3'teki sıçanlarda meydana geldiği görülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyolojik saat ritmini anlamaya ve aynı zamanda insan biyolojisi üzerindeki etkilerini araştırmaya duyulan ilgi giderek artmaktadır. Biyolojik saat ritim çeşitlerinden birisi olan sirkadiyen saat ritmi dünyanın kendi eksenini etrafında 1 tam dönüşü boyunca geçen sürenin canlılar üzerinde meydana getirdiği biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal ritimlerin tekrar edilerek devam etmesidir. Sirkadiyen saatin bozulması obezite, tip 2 diyabetes mellitus, kalp ve damar hastalıkları ve kanser gibi birçok metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Günümüz koşullarında gece vardiyalı çalışanların, uyku bozukluğu bulunanların ve gece uykusunda ışığa maruz kalanların sirkadiyen saat ritimleri bozuktur. Bu bilgiler ışığında planlanan tez çalışmada, vardiyalı çalışma koşulları göz önünde bulundurularak aydınlık/karanlık süreleri farklı olacak şekilde 4 grup sıçan oluşturulmuştur.

Grup 1'in aydınlık/karanlık süresi kısa tutularak döngü sık değiştirilmiştir. Grup 2'nin karanlık ve aydınlık süreli düzenli olarak arttırılmıştır. Grup 3'ün aydınlık/karanlık süresi sabit tutulmuş ancak ışık ve karanlık maruziyeti uzun süreli olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kontrollü olarak sirkadiyen ritmi bozulan sıçanların çalışma sürecinde 0. Gün, 35. Gün ve 70. Günlerde obezite değerlendirmesi yapmak için ağırlıkları ve boyları ölçülmüş, BMI değerleri hesaplanmıştır. Sirkadiyen saat ritminin bozulmasının kilo artışına sebep olduğu bilinmektedir. Çalışmada gruplar arasında sıçanların sirkadiyen ritmi ve kilo artışları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Grup içi kilo artışı değerlendirmelerimizde her dört grup için anlamlı bir istatistiksel kilo artışı saptanmıştır. Grup 3'te yer alan sıçanlar çalışmanın ilk 35 günü içinde diğer sıçanlara göre daha çok kilo almışlardır. Bu süreçte diğer gruplara göre en az kilo olan sıçanlar ise Grup 1'de yer almaktadır. Kontrol Grubunda çalışmanın 35-70 gün aralığında diğer gruplara göre kilo artışı daha fazla olurken, Grup 1'deki sıçanlar diğer gruplara göre daha az kilo almışlardır. Boy ve kilo verileri kullanılarak, grupların BMI değerleri hesaplanmıştır. Çalışmanın başlangıcında tüm grupların BMI değerleri

normal değerlerin üzerindedir ve çalışma suresince BMI değerleri tüm gruplarda artış göstermiştir. Çalışma sonucunda BMI değerindeki en fazla değişim Grup 3'te yer alan sıçanlarda kaydedilmiştir.

Sirkadiyen ritmin sebep olduğu tahmin edilen metabolik bozuklukların anlaşılması için sıçanlardan çalışmanın başı, ortası ve sonunda kan alınarak değerlendirmelerde bulunulmuştur. Bu değerlendirmeler sonucunda sirkadiyen saat ritminin değiştirilmesine bağlı serum biyokimyası ve hemogram değerlerinde farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Başlangıçta tüm gruplarda lökosit sayısı normalin üzerindeyken 35. Gündeki ölçümlerde normal değerlerin altında bulunmuştur. Çalışmanın sonunda yapılan ölçümlere göre Grup 3 hariç diğer gruplarda lökosit sayısı normal değerlerin altına düştüğü, Grup 3'n 70. Günde alınan kan örneklerinde lökosit seviyesinin normal değerler aralığında bulunduğu saptanmıştır. Karaciğer yağlanması bağlı hepatosit hasarı meydana geldiğinde periferik kanda ALT ve ALP değerlerinde artış beklenir. Yapılan alışmalarda ALP ve ALT düzeylerinde 35. Günde hafif bir azalma gözlemlenirken, 70. Günde yapılan ölçümlerde bu değerler artış eğilimi göstermiştir. Akut inflamasyon belirteci olarak serum albümin düzeyi azalır. Çalışmanın başında, ortasında ve sonunda yapılan değerlendirmelere göre tüm gruplarda serum albümin seviyesinin normal değerlerden daha düşük olduğu saptanmıştır ve çalışma boyunca grupların albümin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olabilecek bir değişiklik tespit edilmemiştir. Sıçanların serum albümin düzeylerinin düşüklüğü, sirkadiyen saat ritmindeki bozulmanın immünolojik dengeyi inflamasyon tarafına kaydırmasına bağlı olabilir.

Obezite ile serum lipid profili arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Çalışmanın 0. günü, 35. günü ve 70. gününde yapılan analizlerde kolesterol değerleri normal değerler arasında kalarak, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir. Sıçanlarda obezite bulunduğu halde serum kolesterol düzeyleri artmamıştır.

Sirkadiyen ritimde meydana gelen bozuklukların pankreastaki beta adacık hücrelerini ve serum glukoz seviyesini doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği

bilinmektedir. Çalışmamızın 0. günü, 35. günü ve 70. gününde yapılan sıçanların biyokimyasal analizlerinde serum glukoz, seviyesi normal değerlerin üzerinde bulunmuş olup; ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa serum glukoz düzeyi en yüksek olan sıçanlar Grup 3'te yer almaktadır.

Bu çalışmanın kapsamında bizim planlamadığımız ama bir çok çalışmadan belirtilen şekilde biyokimyasal ve hemogram değerlendirmelerinin gün içerisindeki değişimlerinin göz önünde bulundurulması bazı bulgulardaki değişiklikleri yorumlamayı kolaylaştırabilir.

Memelilerin ortalama 70 günde davranışları otomatize ettiği düşünülerek deney süresi planlanmıştır, ancak sirkadiyen saat ritminin sebep olduğu değişiklikleri daha iyi gözlemlemek için çalışma süresi daha uzun planlanabilir.

İnsanlarda benzeri bir çalışma planlanırken obeziteyi tanımlamak için BMI değeri ile birlikte kalça-bel oranı, serum HDL ve LDL değerleri de bilinmelidir.

ÖZET

Kontrollü Olarak Sirkadiyen Ritmi Bozulan Sıçanların Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerinin Özelliklerindeki Potansiyel Değişimlerin İncelenmesi

Canlıların fizyolojileri, metabolik aktiviteleri, davranış özellikleri ve hastalıkları biyolojik saatlerinde meydana gelen değişimlere bağlıdır. Bu biyolojik saatler içerisinde sirkadiyen saat ritmi tüm canlıların buldukları ortama uyum sağlamak suretiyle hayatta kalmalarını temin eder. Sirkadiyen saat ritminde meydana gelen bozuklukların obeziteye neden olduğu bilinmektedir. Sunulan tez çalışmasında sirkadiyen ritmi kontrollü olarak değiştirilen wistar sıçanlardan elde edilen fiziksel verilerin değişimleri, bu sıçanlardan alınan kanların ve çıkarılan yağ dokularının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada erkek wistar sıçanların sirkadiyen saat ritmlerini değiştirmek için, günümüzde vardiyalı çalışan meslek gruplarının çalışma saatleri örnek alınarak aydınlık/karanlık döngüsü planlandı. Çalışmanın başında ortasında ve sonunda olmak üzere sıçanların fiziksel özellikleri ve kan değerlerindeki değişimler takip edildi. Döngü sonucu değişen biyolojik aktiviteler otomatik davranış haline geldiğinde sıçanlar kurban edildi. Sıçanlardan adipoz doku ve organlar çıkarıldı ve tartıldı. Sıçanların adipoz dokusundan mezenkimal kök hücre elde etmek amacıyla hücre kültürü yapıldı. Sıçanların karaciğerlerinden alınan kesitler hematoksilin eosin boyasıyla boyandı. Çalışmanın ilk, orta ve son günlerinde sıçanlardan alınan kanların hemogram ve biyokimyasal analizleri yapıldı. Elde edilen kanlardan mRNA izole edilerek cDNA sentezlendi ve kanda leptin varlığını göstermek için serumlardan SDS PAGE çalışıldı.

Çalışma sonucunda sirkadiyen ritmi kontrollü olarak bozulan sıçanlarda kilo artışı ve buna bağlı olarak BMI değerlerinde değişiklik kaydedilmiştir. Sıçanlardan alınan kanlarla yapılan SDS PAGE analizinde bir obezite belirteci olan leptin proteininin varlığı saptanmıştır. Aydınlık/karanlık döngüsü en uzun olan sıçanlarda yani grup 2 ve grup 3'te karaciğerde makrovezikler ve mikroveziküler yağlanma yaygın olarak gözlenmiştir. Bu durum ALT ve ALP değerlerinin serumdaki yüksekliğini açıklamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Adipoz doku, karaciğer yağlanması, mezenkimal kök hücre, obezite, sirkadiyen ritim

SUMMARY

The Propertien of Adipose Mesenchymal Stem Cells of Rats Whose Circadian Rhythm is Impaired

The physiology, metabolic activities, behavioral characteristics and diseases of living things depend on changes in their biological clocks. Among these biological clocks, the circadian clock rhythm ensures that all living things survive by adapting to their environment. It is known that disorders occurring in the circadian clock rhythm cause obesity. In the presented thesis, it was aimed to investigate the changes of physical data obtained from wistar rats whose circadian rhythm was changed in a controlled manner, the blood taken from these rats and the extracted fat tissues.

In this study, to change the circadian clock rhythms of male wistar rats, the light / dark cycle was planned based on the working hours of the occupational groups who work by shifts today. Physical properties and changes in blood values of the rats were followed at the beginning, at the mid and at the end of the study. Rats were sacrificed when biological activities changed as a result of the cycle became automatic behavior. Adipose tissue and organs were removed from the rats and weighed. Cell culture was performed to obtain mesenchymal stem cells from the adipose tissue of rats. Sections taken from the livers of rats were stained with hematoxylin eosin stain. In the first, middle and last days of the study, hemogram and biochemical analyzes of blood taken from rats were done. Through isolating mRNA from the bloods obtained cDNA was synthesized and SDS PAGE from serum was studied to demonstrate the presence of leptin in the blood..

As a result of the study, weight gain and accordingly changes in BMI values were recorded in rats whose circadian rhythm deteriorated in a controlled manner. The presence of leptin protein, as an obesity marker, was detected in SDS PAGE analysis performed in blood from rats. Macrovesicular lipoidosis is observed the livers of the rats which has the longest light/ dark cycle. This results are coherent with the blood biochemicals.

Key words: adipose tissue, circadian rhythm, , liver lipoidosis, mesenchymal stem cells, obesity

KAYNAKLAR

- AHİMA, REXFORD S. “Adipose Tissue as an Endocrine Organ.” *Obesity*, vol. **14**, 2006, doi:10.1038/oby.2006.317.
- ALBRECHT U, SUN ZS, EICHELE G, AND LEE CC. “A Differential Response of Two Putative Mammalian Circadian Regulators, mper1 and mper2, to light.” *Cell* **91**: 1055–1064, 1997.
- ALBRECHT, URS. “Invited Review: Regulation of Mammalian Circadian Clock Genes.” *Journal of Applied Physiology*.” 2002; no. 3. vol. **92**: pp. 13481355.doi:10.1152/jappphysiol.00759.2001
- ALENGHATT, K. MEYERS, S.E. MULLİCAN, K. LEİTNER, A. ADENİJİ ADELE, J. AVİLA, M. BUČAN, R.S. AHİMA, K.H. KAESTNER, M.A. LAZAR.” Nuclear Receptor Corepressor And Histone Deacetylase 3 Govern Circadian Metabolic Physiology.” *Nature*, 2008; **456**: pp. 997-1000
- ALHADLAQ, ADEL, AND JEREMY J. MAO. “Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics.” *Stem Cells and Development*, 2004; vol. **13**, no. 4, pp. 436–448., doi:10.1089/scd.2004.13.436
- ANTUNES LC, LEVANDOVSKI R. , DANTAS G. , W. CAUMO, M.P. HİDALGO. “Obesity And Shift Work: Chronobiological Aspects” *Nutr. Res. Rev.*, 2010; **23**: pp. 155-168
- ARBLE DM, J. BASS, A.D. LAPOSKY, M.H. VİTATERNA, F.W. TUREK. “Circadian timing of food intake contributes to weight gain.” *Obesity (Silver Spring)*, 2009;**17**: pp. 2100-2102
- BAE K, JİN X, MAYWOOD ES, HASTINGS MH, REPERT SM, WEAVER D. “Differential Functions Of Mper1, Mper2, And Mper3 İn The SCN Circadian Clock.” *Neuron* 2001;**30**: 525–536.
- BAER PC, GEİGER H. “Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, And Heterogeneity” 2012; *Stem Cells Int.* 2012;2012:812693.doi: 10.1155/2012/812693.
- BALSALOBRE A, BROWN SA, MARCACCİ L, TRONCHE F, KELLENDONK C, REİCHARDT HM, SCHU TZ G, AND SCHİBLER U. “Resetting Of Circadian Time İn Peripheral Tissues By Glucocorticoid Signaling” *Science* 2000;**289**: 2344–2347.
- BANAS A, “Purification Of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells And Differentiation Toward Hepatic-Like Cells, ” *Methods in Molecular Biology*, 2012;vol. **826**, pp. 61 – 72.

- BASS J, TAKAHASHI J.S. “Circadian Integration Of Metabolism And Energetics” *Science*, (2010), **330**; pp. 1349-1354
- BECKETT M, RODEN LC. “Mechanisms By Which Circadian Rhythm Disruption May Lead To Cancer” *South African Journal of Science* 105, November/December 2009;**10**: 415-20.
- BOER-MARTINS, LEANDRO B. “Relationship of Autonomic Imbalance and Circadian Disruption with Obesity and Type 2 Diabetes in Resistant Hypertensive Patients.” *Cardiovascular Diabetology*, 2011;vol. **10**, no. 1. doi:10.1186/1475-2840-10-24.
- BOLLINGER, T, U SCHIBLER. “Circadian Rhythms – from Genes to Physiology and Disease.” *Swiss Medical Weekly*, 2014, doi:10.4414/smw.2014.13984.
- BORGS L, BEUKELAERS P, VANDENBOSCH R, BELACHEW S, NGUYEN L, MALGRANGE B. “Cell « circadian » cycle: New role for mammalian core clock genes” *Cell Cycle*. 2009;**8(6)**:832–7
- BORRUEL S, MOLTO JF, ALPANES M, FERNANDEZ-DURAN E, VAREZ-BLASCO F, LUQUE-RAMÍREZ M. “Surrogate Markers Of Visceral Adiposity In Young Adults: Waist Circumference And Body Mass Index Are More Accurate Than Waist Hip Ratio, Model Of Adipose Distribution And Visceral Adiposity Index” *PLoS One* 2014; **9**: e114112 10.1371/journal.pone.0114112
- BOTH SK, MUIJSENBERG A. J. ., VAN BLITTERSWIJK C. A, DE BOER J., DE BRUIJN J. D., “A Rapid And Efficient Method For Expansion Of Human Mesenchymal Stem Cells,” *Tissue Engineering*, 2007;vol. **13**, no. 1, pp. 3–9.
- BOUCHER, HELENE “Circadian Clock Genes Modulate Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation, Migration and Cell Cycle.” *Plos One*, July 2016; vol. **11**, no. 1, doi:10.1371/journal.pone.0146674.
- BOURIN P, BRUCE A. BUNNELL, LOUIS CASTEILLA, MASSIMO DOMINICI, ADAM J. KATZ, KEITH L. MARCH, HEINZ REDL, J. PETER RUBIN, KOTARO YOSHIMURA & JEFFREY M. GIMBLE. “Stromal Cells From The Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction And Culture Expanded Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells: A Joint Statement Of The International Federation For Adipose Therapeutics And Science (IFATS) And The International Society For Cellular Therapy (ISCT)” *Cytotherapy*, 2013; **15**: 641-648.
- BRAY GA. “Medical Consequences of Obesity” *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:2583–2589
- BREED, MICHAEL D. “Introduction.” *Conceptual Breakthroughs in Ethology and Animal Behavior*, 2017, pp. xxiii-xxxvi., doi:10.1016/b978-0-12-809265-1.00090-3.

- BRUCE A. BUNNELL M.F. , GAGLIARDI C., PATEL B. , RİPOLL C. “Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Expansion And Differentiation” *Methods* ,2008 ;**45** :115–120
- BUNGER MK, WILSBACHER LD, MORAN SM, CLENDENIN C, RADCLIFFE LA, HOGENESCH JB, SIMON MC, TAKAHASHI JS, AND BRADFIELD CA. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000;**103**: 1009–1017.
- BUNNELL B A, FLAAT , M., GAGLIARDI C., PATEL B. C., RİPOLL, “Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Expansion And Differentiation,” *Methods*, 2008;vol. **45**, no. 2, pp. 115–120.
- BUXTONOM, S.W. CAİN, S.P. O’CONNOR, J.H. PORTER, J.F. DUFFY, W. WANG, C. A. CZEISLER, S.A. Shea A. “Adverse Metabolic Consequences In Humans Of Prolonged Sleep Restriction Combined With Circadian Disruption” *Sci. Transl. Med.*, 2012; **4**: p. 29ra43
- CANNON B., JAN NEDERGAARD J. “Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance.” *Physiological Reviews*, 2004;vol. **84**, no. 1, pp. 277–359., doi:10.1152/physrev.00015.2003.
- CARVALHO PP, MANUELA E. GOMES, R., REIS L., JEFFREY M. GIMBLE. “Adipose Tissue-Derived MSCs: Moving to the Clinic” *Mesenchymal Stromal Cells*, 2012, pp 663-681.
- CHOUDHERY MS, M. BADOWSKI, A. MUISE, J. PIERCE, AND D. T. HARRIS, “Donor Age Negatively Impacts Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Expansion And Differentiation,” *Journal of Translational Medicine*, 2014;vol. **12**, p. 8-22
- COELHO M. , OLIVEIRA T., FERNANDES R. “State of the Art Paper Biochemistry of Adipose Tissue: an Endocrine Organ.” *Archives of Medical Science*, 2013;vol. **2**, pp. 191–200., doi:10.5114/aoms.2013.33181.
- COSTA MJ, SO AY-L, KAASIK K, KRUEGER KC, PILLSBURY ML, FU Y-H. “Circadian Rhythm Gene Period 3 Is an Inhibitor of the Adipocyte Cell Fate” *J Biol Chem*. 2011;**286**(11):9063–70. 10.1074/jbc.M110.164558
- DAAN S, ALBRECHT U, VAN DER HORST GTJ, ILLNEROVA’ H, ROENNEBERG T, WEHR TA, AND SCHWARTZ WJ. “Assembling A Clock For All Seasons: Are There M And E Oscillators In The Genes?” *J Biol Rhythms* 2001;**16**: 105–116.
- DEFRONZO RA, ABDUL-GHANI MA. “Preservation Of Beta-Cell Function: The Key To Diabetes Prevention.” *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;**96**:2354–66.
- DAUCHY RT, WREN MA, DAUCHY EM, HANIFIN JP, JABLONSKI MR, WARFIELD B, BRAINARD GC, HILL SM, MAO L, OOMS TG, DUPEPE LM, BLASK DE. “Effects Of Spectral Transmittance Through Red-Tinted Cages On Circadian

Metabolism And Physiology In Nude Rats.” *J Am Assoc Lab Anim Sci* , 2013; **52**:745–755.

DÌ LORENZO L, DE PERGOLA G, ZOCCHETTI C, L'ABBATE N, BASSO A, PANNACCIULLI N, CIGNARELLI M, GÌORGINO R, SOLEO L. “Effect Of Shift Work On Body Mass Index: Results Of A Study Performed In 319 Glucose-Tolerant Men Working In A Southern Italian Industry.” *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; **27(11)**:1353-8.

DÌ TARANTO G., CÌCÌONE , C., VÌSCONTÌ G. “Qualitative And Quantitative Differences Of Adipose-Derived Stromal Cells From Superficial And Deep Subcutaneous Lipospirates: A Matter Of Fat,” *Cytotherapy*, 2015; vol. **17**, no. 8, pp. 1076–1089.

DÌASCRO DD, VOGEL RL, JOHNSON TE, WÌTHERUP KM, PÌTZENBERGER SM, RUTLEDGE SJ, PRESCOTT DJ, RODAN GA, SCHMÌDT A. “High Fatty Acid Content in Rabbit Serum Is Responsible for the Differentiation of Osteoblasts Into Adipocyte-Like Cells” *J Bone Miner Res*. 1998;**13**:96–106

DÌBNER, C., SCHÌBLER U. “Circadian Timing of Metabolism in Animal Models and Humans.” *Journal of Internal Medicine*, June 2015;vol. 277, no. **5**, , pp. 513–527., doi:10.1111/joim.12347.

EÌCHLER H., STOEVE J., KLÜTER H., BÌEBACK K. “Comparative Analysis Of Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, Or Adipose Tissue,” *Stem Cells*, 2006;vol. **24**, no. 5, pp. 1294–1301.

ELÇİN YM (editör): “Kök Hücre Araştırmaları Ve Biyoetik Raporu.” *Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları*, TÜBA Raporları No: **20** Ankara, Mart 2016;80 sayfa, ISBN 978-9944-252-76-8.

ESQUÌROL Y, BONGARD V, MABÌLE L, JONNÌER B, SOULAT JM, PERRET B. “Shift Work And Metabolic Syndrome: Respective Impacts Of Job Strain, Physical Activity, And Dietary Rhythms.” *Chronobiol Int* 2009; **26**: 544–559. 10.1080/07420520902821176

FAROOQÌ IS, JEBB SA, LANGMACK G, LAWRENCE E, CHEETHAM CH, PRENTÌCE AM, HUGHES IA, MCCAMÌSH MA, O'RAHÌLLY S. “Effects Of Recombinant Leptin Therapy In A Child With Congenital Leptin Deficiency.” *N Engl J Med*. 1999;**341**:879-884; PMID:10486419. doi:10.1056/NEJM199909163411204.

FAROOQÌ IS, MATARESE G, LORD GM, KEOGH JM, LAWRENCE E, AGWU C, SANNA V, JEBB SA, PERNA F, FONTANA S. “Beneficial Effects Of Leptin On Obesity, T Cell Hyporesponsiveness, And Neuroendocrine/Metabolic Dysfunction Of Human Congenital Leptin Deficiency.” *J Clin Invest*. 2002;**110**:1093-1103; PMID:12393845. doi:10.1172/JCI0215693

- FENG D, T. LIU, Z. SUN, A. BUGGE, S.E. MULLICAN, T. ALENGHAT, X.S. LIU, M.A. "LazarA circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism" *Science*, 2011;**331**: pp. 1315-1319
- FISH KJ, CEGIELSKA A, GETMAN ME, LANDES GM, VIRSHUP DM. "Isolation And Characterization Of Human Casein Kinase I Epsilon (CKI), A Novel Member Of The CKI Gene Family". *The Journal of Biological Chemistry*. June 1995;**270** (25): 14875–83.
- FONKEN LK, WORKMAN J.L. , WALTON J.C. , WEIL Z.M. , MORRIS J.S. ,
- HAIM A. , NELSON R.J. "Light At Night Increases Body Mass By Shifting The Time Of Food Intake" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; **107**: pp. 18664-18669
- FRESHNEY, RI. 2000. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3rd edition; Wiley-Liss, New York.
- FROY O. "The circadian clock and metabolism." *Clin Sci (Lond)*. 2011; **120** (2): 65-72. 10.1042/CS20100327.
- GARAULET M, CORBALÁN-TUTAU MD, MADRID JA, BARAZA JC, PARNELL LD, LEE Y-C. "PERIOD2 Variants Are Associated With Abdominal Obesity, Psycho-Behavioral Factors, And Attrition In The Dietary Treatment Of Obesity." *J Am Diet Assoc*. 2010;**110**(6):917–21. 10.1016/j.jada.2010.03.017
- GATTA A, VERARDO A, BOLOGNESI M. "Hypoalbuminemia." *Intern Emerg Med*. 2012; Suppl **3**:S193-9.doi: 10.1007/s11739-012-0802-0.
- GESTA S, TSENG Y. H., KAHN C. R., "Developmental Origin Of Fat: Tracking Obesity To Its Source," *Cell*, 2007;vol. **131**, no. 2, pp. 242–256.
- GEKAKIS N, SAEZ L, DELAHAYE-BROWN AM, MYERS MP, SEHGAL A, YOUNG MW, WEITZ CJ. "Isolation Of Timeless By PER Protein Interactions: Defective Interaction Between Timeless Protein And Long-Period Mutant PERL." *Science*, 1995;**270**: 811–815.
- GERY S, KOMATSU N, BALDJYAN L, YU A, KOO D, KOEFFLER HP. "The Circadian Gene Per1 Plays An Important Role In Cell Growth And DNA Damage Control In Human Cancer Cells." *Mol Cell* , 2006;**22**(3):375-82.
- GHORBANI A, JALALI S.A., VAREDI M. "Isolation Of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells Without Tissue Destruction: A Non-Enzymatic Method Tissue And Cell." *Cell* 2014;**46**:54–58
- GIMBLE JM, FLOYD ZE, BUNNELL BA. "The 4th Dimension And Adult Stem Cells: Can Timing Be Everything?" *J Cell Biochem*. 2009;**107**(4):569–78. 10.1002/jcb.22153

- GIMBLE JM. “Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine .”*Expert Opin Biol Ther.* 2003;3:705–713.
- GOH G, GRACE B.. “Episodic Ultradian Events—Ultradian Rhythms.” *Biology*, 2019;vol. 8: p. 15., doi:10.3390/biology8010015.
- GREEN CB, TAKAHASHI J.S. , BASS J. “The Meter Of Metabolism” *Cell*, 2008;**134** ; pp. 728-742
- GREEN, C. J., “Ketamine Alone and Combined with Diazepam or Xylazine in Laboratory Animals: a 10 Year Experience.” *Laboratory Animals*, 1981; vol. **15**, no. 2, pp. 163–170. doi:10.1258/002367781780959107.
- GRIMALDI B, BELLET MM, KATADA S, ASTARITA G, HIRAYAMA J, AMIN RH. “PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR γ .” *Cell Metab.* 2010;**12**(5):509–20. 10.1016/j.cmet.2010.10.005
- GRONTHOS, P. J. SIMMONS, S. E. GRAVES, P. G. ROBEY, “Integrin-Mediated Interactions Between Human Bone Marrow Stromal Precursor Cells And The Extracellular Matrix,” *Bone* , 2001;vol. **28**, no. 2: pp. 174 –181.
- HASTINGS M, O’NEILL JS, MAYWOOD ES.: “Circadian Clocks: Regulators Of Endocrine And Metabolic Rhythms.” *J Endocrinol* 2007;**195**(2):187-98.
- HAUNER, H, ENTENMANN G., WABITSCH M., GAILLARD D., AIHAUD G, NEGREL R., PFEIFFER E.F. “Promoting Effect of Glucocorticoids on the Differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells Cultured in a Chemically Defined Medium.” *Journal of Clinical Investigation*, Jan. 1989 ;vol. **84**, no. 5: pp. 1663–1670., doi:10.1172/jci114345.
- HAYATO K, RIE T., TAKESHI K., SHUMPEI I., TSUYOSHI I., TAKAHIRO O. “Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells In Regenerative Medicine Treatment For Liver Cirrhosis-Focused On Efficacy And Safety In Preclinical And Clinical Studies.” *JSM Regenerate Medicine* 2014, **2**(1):1012
- HEALTH CANADA. “Canadian Guidelines for Body Weight Classification in Adults. “Ottawa: Minister of Public Works and Government Services Canada; 200
- HERRERO L, VALCARCEL L, ADRESSA DA SILVA C, ALBERT N, NOGUERA A, CAMBRAS T, SERRA D. “Altered Circadian Rhythm and Metabolic Gene Profile in Rats Subjected to Advanced Light Phase Shifts.” *Plos One*, Feb. 2015; vol. **10**, no. 4, , doi:10.1371/journal.pone.0122570
- HEYMSFIELD SB, GREENBERG AS, FUJIOKA K, DIXON RM, KUSHNER R, HUNT T, LUBINA JA, PATANE J, SELF B, HUNT P. “Recombinant Leptin For Weight Loss In Obese And Lean Adults: A Randomized, Controlled, Dose-Escalation Trial”. *JAMA*. 1999;**282**:1568-1575; PMID:10546697. doi:10.1001/jama.282.16.1568

- HOBSON JA, PACE-SCHOTT EF "The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning". *Nat. Rev. Neurosci.* September 2002; **3** (9): 679–93. doi:10.1038/nrn915.
- JOHNSON-DELANEY, C." *Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians*" 1996, Zoological Education Network
- JURGENS WJ, M. J. OEDAYRAJSINGH-VARMA, M. N. HELDER . "Effect Of Tissue-Harvesting Site On Yield Of Stem Cells Derived From Adipose Tissue: Implications For Cell-Based Therapies," *Cell and Tissue Research*, 2008; **vol. 332**, no. 3, pp. 415–426.
- KANG SK, PUTNAM LA, YLOSTALO J, POPESCU IR, DUFOUR J, BELOUSOV A. J. " Neurogenesis of Rhesus Adipose Stromal Cells" *Cell Sci.* 2004;**117**:4289–4299.
- KARATSOREOS IN, S. BHAGAT, E.B. BLOSS, J.H. MORRISON, B.S. MCEWEN. "Disruption Of Circadian Clocks Has Ramifications For Metabolism, Brain, And Behavior" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011;**108** :pp. 1657-1662
- KELESIDIS, THEODORE. "Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications." *Annals of Internal Medicine*, 2010 ;**vol. 152**: no. 2, p. 93., doi:10.7326/0003-4819-152-2-201001190-00008.
- KIM B, B. LEE, M. K. KIM: "Gene Expression Profiles Of Human Subcutaneous And Visceral Adipose-Derived Stem Cells," *Cell Biochemistry and Function*, 2016;**vol. 34** :pp. 563–571.
- KING DP, ZHAO Y, SANGORAM AM, WILSBACHER LD, TANAKA M, ANTOCH MP, STEEVES TDL, VITATERNA MH, KORNHAUSER JM, LOWERY PL, TUREK FW, AND TAKAHASHI JS." Positional Cloning Of The Mouse Circadian Clock Gene. "*Cell* , 1997; **89**: 641–653.
- KISSILEFF HR, THORNTON JC, TORRES MI, PAVLOVICH K, MAYER LS, KALARI V, LEIBEL RL, ROSENBAUM M. "Leptin Reverses Declines In Satiety In Weight-Reduced Obese Humans." *Am J Clin Nutr.* 2012;**95**:309-317; PMID:22237063. doi:10.3945/ajcn.111.012385.
- KLOSS B, PRICE JL, SAEZ L, BLAU J, ROTHENFLUH A, WESLEY CS, AND YOUNG MW. "The Drosophila Clock Gene Double-Time Encodes A Protein Closely Related To Human Casein Kinase I." *Cell* , 1998; **94**: 97–10.
- KNUTSON KL, A.M. RYDEN, B.A. MANDER, E. VAN CAUTER. "Role Of Sleep Duration And Quality In The Risk And Severity Of Type 2 Diabetes Mellitus." *Arch Intern Med.* 2006 Sep 18; 166 (16): 176874. doi: 10.1001 /archinte .166 .16.1768.

- KOCAN B, MARIAZR A, TABARKIEWICZ J, OCHIYA T, ZABCZYK A, "Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential." *Stem Cells International*, 2017; **2017**: 1-13., doi:10.1155/2017/1653254.
- KOHSAKAA, A.D. LAPOSKY, K.M. RAMSEY, C. ESTRADA, C. JOSHU, Y. KOBAYA SHI, F.W. TUREK, J. BASS. "High-Fat Diet Disrupts Behavioral And Molecular Circadian Rhythms In Mice" *Cell Metab.*, 2007;6: pp. 414-421
- KOLLER M, KUNDI M, CERVINKA R. "Field Studies Of Shift Work At An Austrian Oil Refinery. I. Health And Psychosocial Wellbeing Of Workers Who Drop Out Of Shift Work." *Ergonomics* ,1978;**21**:835–847
- KONDRATOV RV, SHAMANNA RK, KONDRATOVA AA, GORBACHEVA VY, ANTOCH MP. "Dual Role Of The CLOCK/BMAL1 Circadian Complex In Transcriptional Regulation." *FASEB J.* 2006; **20**(3):530–2
- KUBO T, OYAMA I, NAKAMURA T, SHIRANE K, OTSUKA H, KUNIMOTO M. "Retrospective Cohort Study Of The Risk Of Obesity Among Shift Workers: Findings From The Industry-Based Shift Workers' Health Study, Japan." *Occup Environ Med* , 2011; **68**: 327–331. 10.1136/oem.2009.054445
- LAFOLLETTE MR, SWAN MP, SMITH RK, HICKMAN DL, GASKILL BN. "The Effects of Cage Color and Light Intensity on Rat Affect during Heterospecific Play." *Applied Animal Behaviour Science*, 2019; vol. **219**: p. 104834., doi:10.1016/j.applanim.2019.104834.
- LALIKOS JF, LI YQ, ROTH TP, DOYLE JW, MATORY WE, LAWRENCE WT. J. SURG. "Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation." *Res.* 1997;**1997**:95–100. doi: [10.1016/j.ymeth.2008.03.006](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.006)
- LAMIA KA, K.F. STORCH, C.J. "Weitzphysiological Significance Of A Peripheral Tissue Circadian Clock" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008;**105** : pp. 15172-15177
- LAMONT EW, JAMES FO, BOIVIN DB, CERMAKIAN N. "From Circadian Clock Gene Expression To Pathologies." *Sleep Med* 2007;8(6):547-56.
- Le JEUNE MP, HUKSHORN CJ, SARIS WH, WESTERTERP-PLANTENGA MS. "Effect Of Dietary Restraint During And Following Pegylated Recombinant Leptin (PEG-OB) Treatment Of Overweight Men." *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;**27**:1494-1499; PMID:14634680. doi:10.1038/sj.ijo.0802431.
- LICINIO J, CAGLAYAN S, OZATA M, YILDIZ BO, DE MIRANDA PB, O'KIRWAN F, WHITBY R, LIANG L, COHEN P, BHASIN S. "Phenotypic Effects Of Leptin Replacement On Morbid Obesity, Diabetes Mellitus, Hypogonadism, And Behavior In Leptin-Deficient Adults." *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;**101**:4531-4536; PMID:15070752. doi:10.1073/pnas.0308767101.

- LIU, Y. "Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention." *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 15, no. 1, Jan. 2004, pp. 1–12., doi:10.1097/01.asn.0000106015.29070.e7.
- LLOYD D., STUPFEL M. "The Occurrence And Functions Of Ultradian Rhythms." *Biol. Rev.* 1991;**66**:275–299. doi: 10.1111/j.1469-185X.1991.tb01143.x
- MACAGNAN J, PATTUSSI MP, CANUTO R, HENN RL, FASSA AG, OLINTO MT. "Impact Of Nightshift Work On Overweight And Abdominal Obesity Among Workers Of A Poultry Processing Plant In Southern Brazil." *Chronobiol Int*, 2012; **29**: 336–343. 10.3109/07420528.2011.653851
- MATSUO T, YAMAGUCHI S, MITSUI S, EMI A, SHIMODA F, OKAMURA H. "Control Mechanism Of The Circadian Clock For Timing Of Cell Division In Vivo." *Science*. 2003;**302**(5643):255–9.
- MAZUREK T, L. ZHANG, A. ZALEWSKI. "Human Epicardial Adipose Tissue Is A Source Of Inflammatory Mediators," *Circulation*, 2003;vol. **108** : pp. 2460–2466.
- MENDEZ-FERRER S, LUCAS D, BATTISTA M, FRENETTE PS. "Haematopoietic Stem Cell Release Is Regulated By Circadian Oscillations." *Nature*. 2008;**452**(7186):442–7. 10.1038/nature06685
- MITCHELL JB, K. MCINTOSH, S. ZVONIC. "Immunophenotype Of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes In Stromal-Associated And Stem Cell-Associated Markers," *Stem Cells*, 2006; vol. **24**: pp. 376 –385.
- MITTENDORFER B, HOROWITZ JF, DEPAOLI AM, MCCAMISH MA, PATTERSON BW, KLEIN S. "Recombinant Human Leptin Treatment Does Not Improve Insulin Action In Obese Subjects With Type 2 Diabetes." *Diabetes*. 2011;**60**:1474-1477; PMID:21411512. doi:10.2337/db10-1302.
- MOON HS, MATARESE G, BRENNAN AM, CHAMBERLAND JP, LIU X, FIORENZA CG, MYLVAGANAM GH, ABANNI L, CARBONE F, WILLIAMS CJ. "Efficacy Of Metreleptin In Obese Patients With Type 2 Diabetes: Cellular And Molecular Pathways Underlying Leptin Tolerance." *Diabetes*. 2011;**60**:1647-1656; PMID:21617185. doi:10.2337/db10-1791.
- NAGAYA T, YOSHIDA H, TAKAHASHI H, KAWAI M. "Markers Of Insulin Resistance In Day And Shift Workers Aged 30–59 Years." *Int Arch Occup Environ Health* 2002;**75**:562–568
- NAKAMURA K, SHIMAI S, KIKUCHI S. "Shift Work And Risk Factors For Coronary Heart Disease In Japanese Blue-Collar Workers: Serum Lipids And Anthropometric Characteristics." *Occup Med*, 1997;**47**:142–146.

- NİEDHAMMER I, LERT F, MARNE MJ. "Prevalence Of Overweight And Weight Gain İn Relation To Night Work İn A Nurses' Cohort." *Int J Obesity* , 1996;**20**:625–633
- NOVELLİ E L B, DINIZ Y S, GALHARDI C M. "Anthropometrical Parameters and Markers of Obesity in Rats." *Laboratory Animals*, 2007; vol. **41**: pp. 111–119., doi:10.1258/00236770779399518
- NUESSELEİN-HİLDESHEİM B, O'BRIEN JA, EBLİNG FJP, MAYWOOD ES, AND HASTINGS MH. "The Circadian Cycle Of Mper Clock Gene Products İn The Suprachiasmatic Nucleus Of The Siberian Hamster Encodes Both Daily And Seasonal Time." *Eur J Neurosci*, 2000, **12**: 2856–2864.
- OİSHİ K, SHİRAİ H, İSHİDA N. "CLOCK İs Involved İn The Circadian Transactivation Of Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor A (Ppara) İn Mice." *Biochem J*. 2005;**386**(3):575.
- OKAMURA H, MİYAKE S, SUMİ Y, YAMAGUCHİ S, YASUI A, MUIJTJENS M, HOEIJMAKERS JHJ, AND VAN DER HORST GTJ. "Photic İnduction Of Mper1 And Mper2 İn Cry-Deficient Mice Lacking A Biological Clock." *Science*, 1999, **286**: 2531–2534.
- ORTH-GOMER K. "Intervention On Coronary Risk Factors By Adapating A Shift Work Schedule To Biological Rhythmicity." *Psychosom Med*, 1983;**45**:407–415.
- PARK A, WON KON KİM, KWANG-HEE BAE. "Distinction Of White, Beige And Brown Adipocytes Derived From Mesenchymal Stem Cells." *World Journal of Stem Cells*, 2014; **6**(1) :33-42.
- PEPLONSKA B, BUKOWSKA A, SOBALA W. "Association of Rotating Night Shift Work with BMI and Abdominal Obesity among Nurses and Midwives." *Plos One*, 2015; vol. **10**: doi:10.1371/journal.pone.0133761.
- PERDISA F, NATALIA GOSTYŃSKA, ALİCE ROFFİ, GIUSEPPE FİLARDO, MAURİLİO MARCACCI, ELİZAVETA KON. "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Articular Cartilage: A Systematic Review on Preclinical and Clinical Evidence " *.Stem Cells International*. 2015; Volume **2015**, Article ID 597652.
- PETROVIC N, WALDEN T B, SHABALINA I G, TIMMONS J A, CANNON B, NEDERGAARD J. "Chronic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-Containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes." *Journal of Biological Chemistry*, 2009;vol. **285**: pp. 7153–7164., doi:10.1074/jbc.m109.053942.
- PFAFF D W. "Hormonal Secretions and Responses Are Affected by Biological Clocks." *Principles of Hormone/Behavior Relations*, 2004, pp. 181–194., doi:10.1016/b978-012553149-8/50040-5.

- PHIPPS AM. "Handbook of anthropometry: Physical Measures of Human Form in Health and Disease." 2012; 1703–1723
- PITTENDRIGH CS AND DAAN S. "A Functional Analysis Of Circadian Pacemakers In Nocturnal Rodents. V. Pacemaker Structure: A Clock For All Seasons." *J Comp Physiol [A]* 1976; **106**: 333–355.
- POCOCK S J, ASHBY A, SHAPER A G, WALKER M, BROUGHTON P M. "Diurnal Variations in Serum Biochemical and Haematological Measurements." *Journal of Clinical Pathology*, Jan. 1989; vol. **42**: pp. 172–179., doi:10.1136/jcp.42.2.172.
- PRUNET-MARCASSUS B, COUSIN B, D. CATON, M. ANDRÉ, L. PÉNICAUD, AND L CASTEILLA. "From Heterogeneity To Plasticity In Adipose Tissues: Site-Specific Differences," *Experimental Cell Research*, 2006;vol. **312**: pp. 727–736.
- QUIMBYJM, TRACY L WEBB, LAUREN M HABENICHT, STEVEN W DOW. "Safety And Efficacy Of Intravenous Infusion Of Allogeneic Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells For Treatment Of Chronic Kidney Disease In Cats: Results Of Three Sequential Pilot Studies ." *Stem Cell Research & Therapy*, 2013, **4**:48
- RASKIN P, UNGER RH. "Hyperglucagonemia And Its Suppression. Importance In The Metabolic Control Of Diabetes." *N Engl J Med*. 1978;**299**:433-436; PMID:683275. doi:10.1056/NEJM197808312990901
- RODBELL M. Metabolism of Isolated Fat Cells. II. The Similar Effects of Phospholipase C (Clostridium Perfringens Alpha Toxin) and of Insulin on Glucose and Amino Acid Metabolism *J Biol Chem*. 1966;**241**:130–139
- ROOS E, LALLUKKA T, RAHKONEN O, LAHELMA E, LAAKSONEN M. "Working Conditions And Major Weight Gain-A Prospective Cohort Study." *Arch Environ Occup Health* , 2013; **68**: 166–172. 10.1080/19338244.2012.686931
- ROSENBAUM M, SY M, PAVLOVICH K, LEIBEL RL, HIRSCH J. "Leptin Reverses Weight Loss-Induced Changes In Regional Neural Activity Responses To Visual Food Stimuli." *J Clin Invest*. 2008;**118**:2583-2591; PMID:18568078. doi:10.1172/JCI35055.
- ROSENWALD, MATTHIAS, AND CHRISTIAN WOLFRUM. "The Origin And Definition Of Brite Versus White And Classical Brown Adipocytes." *Adipocyte*, 2013;vol. **3**: pp. 4–9., doi:10.4161/adip.26232.
- RUBÍO D, J. GARCÍA-CASTRO, M. C. MARTÍN. "Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation," *Cancer Research*, 2005;vol. **65**: pp. 3035–3039.
- RUDIC RD, P. MCNAMARA, A.M. CURTIS, R. C. BOSTON, S. PANDA, J. B. HOGENESCH, G. A. FITZGERALD. "BMAL1 And CLOCK, Two Essential Components Of The Circadian Clock, Are Involved In Glucose Homeostasis." *PLoS Biol.*, 2004;**2**: p. e377

- SADACCA LA, K.A. LAMIA, A.S. DELEMOS, B. BLUM, C.J. WEITZ. "An Intrinsic Circadian Clock Of The Pancreas Is Required For Normal Insulin Release And Glucose Homeostasis In Mice." *Diabetologia*, 2011;**54**: pp. 120-124
- SAELY C H, GEIGER K, DREXEL H. "Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review." *Gerontology*, 2012; vol. **58** : pp. 15–23., doi:10.1159/000321319.
- SANCAR A, LINDSEY-BOLTZ LA, KANG TH, REARDON JT, LEE JH, OZTURK N. "Circadian Clock Control Of The Cellular Response To DNA Damage." *FEBS Lett* , 2010;**584**(12):2618-25.
- SCHÄFFLER A AND C. BÜCHLER. "Concise Review: Adipose Tissue Derived Stromal Cells—Basic And Clinical Implications For Novel Cell-Based Therapies," *Stem Cells*, 2007;vol. **25**, no. 4, pp. 818–827.
- SCOTT EM, CARTER AM, GRANT PJ. "Association Between Polymorphisms In The Clock Gene, Obesity And The Metabolic Syndrome In Man." *Int J Obes*. 2008;**32**(4):658–62.
- SEKIYA I, COLTER DC, PROCKOP DJ. "BMP-6 Enhances Chondrogenesis in a Subpopulation of Human Marrow Stromal Cells" *Biochem Biophys Res Comm*. 2001;**284**:411–418.
- ŞENELF. (2008). Biyolojik saat. Bilim ve Teknik. (Aralık), 67.
- SENSEBÉ L , M. GADELORGE, AND S. FLEURY-CAPPELLESSO. "Production Of Mesenchymal Stromal/Stem Cells According To Good Manufacturing Practices: A Review," *Stem Cell Research & Therapy*, 2013,vol. **4**, no. 3, p. 66.
- SHEARMAN LP, JIN X, LEE C, REPERT SM, AND WEAVER DL. "Targeted Disruption Of The Mper3 Gene: Subtle Effects On Circadian Clock Function." *Mol Cell Biol*,2000; **20**: 6269–6275.
- SHERMAN H, YONİ GENZER, ROTEM COHEN, NAVA CHAPNIK, ZECHARIA MADAR, OREN FROY. "Timed High-Fat Diet Resets Circadian Metabolism And Prevents Obesity." *The FASEB Journal* , 2012;**26**(8): 3493-502.
- SHI S, A. HIDA, O.P. MCGUINNESS, D.H. WASSERMAN, S. YAMAZAKI, C.H. JOHNSON. "Circadian Clock Gene Bmal1 Is Not Essential; Functional Replacement With Its Paralog, Bmal2." *Curr. Biol.*, 2010; **20**:pp. 316-321,
- SHI S Q, ANSARI T S, MCGUINNESS O P, WASSERMAN D H, JOHNSON C H. "Circadian Disruption Leads to Insulin Resistance and Obesity." *Current Biology*, 2013; vol. **23**:pp. 372–381., doi:10.1016/j.cub.2013.01.048.
- SHIMBA S, T. OGAWA, S. HITOSUGI, Y. ICHIHASHI, Y. NAKADAIRA, M. KOBAYASHI, M. TEZUKA, Y. KOSUGE, K. ISHIGE, Y. ITO. "Deficient Of A Clock Gene, Brain And Muscle Arnt-Like Protein-1 (BMAL1), Induces Dyslipidemia And Ectopic Fat Formation." *PLoS ONE*, 2011;**6**: p. e25231

- SHIMBA S, ISHII N, OHTA Y, OHNO T, WATABE Y, HAYASHI M. “Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;**102(34)**:12071–6. pmid:16093318
- SHIMBA S, OGAWA T, HITOSUGI S, ICHIHASHI Y, NAKADAIRA Y, KOBAYASHI M, ET AL.” Deficient Of A Clock Gene, Brain And Muscle Arnt-Like Protein-1 (Bmal1), Induces Dyslipidemia And Ectopic Fat Formation.” *PLoS ONE*. 2011;**6(9)**:e25231 10.1371/journal.pone.0025231
- SHIRAI H . “PPAR α Is a Potential Therapeutic Target of Drugs to Treat Circadian Rhythm Sleep Disorders.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007;**vol. 357**:pp. 679–682., doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.002.
- SHOSTAK A, MEYER-KOVAC J, OSTER H. “Circadian Regulation of Lipid Mobilization in White Adipose Tissues.” *Diabetes*. 2013;**62(7)**:2195–203. 10.2337/db12-1449
- SMORLESI A, FRONTINI A, GIORDANO A, CINTI S. “The Adipose Organ: White-Brown Adipocyte Plasticity and Metabolic Inflammation.” *Obesity Reviews*, 2012, vol. **13**: pp. 83–96., doi:10.1111/j.1467-789x.2012.01039.x.
- SOOKOIAN S, GEMMA C, FERNANDEZ GT, BURGUENO A, ALVAREZ A, ALVAREZ A, ET AL. “Effects Of Rotating Shift Work On Biomarkers Of Metabolic Syndrome And Inflammation.” *J Intern Med*, 2007; **261**: 285–292.
- SUDO M, SASAHARA K, MORIYA T, AKIYAMA M, HAMADA T, SHIBATA S. “Constant Light Housing Attenuates Circadian Rhythms of mPer2 MRNA AND mPER2 Protein Expression in the Suprachiasmatic Nucleus of Mice.” *Neuroscience*, 2003, vol. **121**:pp. 493–499., doi:10.1016/s0306-4522(03)00457-3.
- SUN ZS, ALBRECHT U, ZHUCHENKO O, BAILEY J, EICHELE G, AND LEE CC. “Rigui: A Putative Mammalian Ortholog Of The Drosophila Period Gene.” *Cell* , 1997; **90**: 1003–1011.
- SUWAZONO Y, DOCHI M, SAKATA K, OKUBO Y, OISHI M, TANAKA K. “A Longitudinal Study On The Effect Of Shift Work On Weight Gain In Male Japanese Workers.” *Obesity (Silver Spring)*, 2008; **16**: 1887–1893
- THEORELL T, ÅKERSTEDT T. “Day And Night Work: Changes In Cholesterol, Uric Acid, Glucose And Potassium In Serum And In Circadian Patterns Of Urinary Catecholamine Excretion.” *Acta Med Scand* ,1976;**200**:47–53.
- TORSVIK A, G. V. RØSLAND, A. SVENDSEN. “Spontaneous Malignant Transformation Of Human Mesenchymal Stem Cells Reflects Cross-Contamination: Putting The Research Field On Track,” *Cancer Research*, 2010; vol. **70** :pp. 6393–6396.
- TRAYHURN, PAUL, AND JOHN H. BEATTIE. “Physiological Role of Adipose Tissue: White Adipose Tissue as an Endocrine and Secretory Organ.” *Proceedings of the Nutrition Society*, 2001;vol. **60**, no. 3, pp. 329–339., doi:10.1079/pns200194.

TUREK FV, C. JOSHU, A. KOHSAKA, E. LİN, G. IVANOVA,

E. MCDEARMON, A. LAPOSKY, S. LOSEE-

OLSON, A. EASTON, D.R. JENSEN. "Obesity And Metabolic Syndrome In Circadian Clock Mutant Mice" *Science*, 2005;**308**: pp. 1043-1045

VAN AMELSVOORT LG, SCHOUTEN EG, KOK FJ. "Duration Of Shiftwork Related To Body Mass Index And Waist To Hip Ratio." *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23**: 973–978.

VAN CAUTER E, K.S. POLONSKY, A.J. "Scheen Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation." *Endocr. Rev.*, 1997;**18**: pp. 716-738.

VANDERSCHUREN L. J. M. J, SPRUIJT B M, REE V J M, NIESINK R J M. "Effects of Morphine on Different Aspects of Social Play in Juvenile Rats." *Psychopharmacology*, 1995, vol. **117**: pp. 225–231., doi:10.1007/bf02245191

VİTATERNA MH, KİNG DP, CHANG A-M, KORNHAUSER JM, LOWERY PL, MCDONALD JD, DOVE WF, PİNTO LH, TUREK FW, AND TAKAHASHİ JS. "Mutagenesis And Mapping Of A Mouse Gene, Clock, E Are Essential For Maintenance Of Circadian Rhythms." *Nature*, 1999; **398**: 627–630.

VİTATERNA MH, SELBY CP, TODO T, NİWA H, THOMPSON C, FRUECHTE EM, HİTOMİ K, THRESHER RJ, İSHİKAWA T, MİYAZAKİ J, TAKAHASHİ JS, AND SANCAR A. "Differential Regulation Of Mammalian Period Genes And Circadian Rhythmicity By Cryptochromes 1 And 2." *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999;**96**: 12114–12119.

VİTATERNA MH, TAKAHASHİ JS, TUREK FW. "Overview of circadian rhythms". *Alcohol Research & Health*. 2001;**25** (2): 85–93.

WABİTSCH M, FUNCKE JB, LENNERZ B, KUHNLE-KRAHL U, LAHR G, DEBATİN KM, VATTER P, GİERSCHİK P, MOEPPS B, FİSCHER-POSOVSZKY P. "Biologically Inactive Leptin And Early-Onset Extreme Obesity." *N Engl J Med*. 2015;**372**:48-54; PMID:25551525. doi:10.1056/NEJMoa1406653.

WAGNER W, FREDERİK WEİNA, ANJA SECKİNGERA, MARİA FRANKHAUSERB, UTE WİRKNERC, ULF KRAUSEA, JONATHON BLAKEC, CHRISTİAN SCHWAGERC, VOLKER ECKSTEİNA, WİLHELM ANSORGEC, AND ANTHONY D. HOA. "Comparative Characteristics Of Mesenchymal Stem Cells From Human Bone Marrow, Adipose Tissue, And Umbilical Cord Blood." *Experimental Hematology*, 2005; **33** :1402–1416

WEI G, SCHUBIGER G, HARDER F, MULLER AM. Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in Drosophila: common themes? *Stem Cells* .Stem Cells. 2000; 18:409–414.

- WHO 1. Waist circumference and waist-hip ratio. Report of a WHO Expert Consultation. 2008; 1–39
- WU J, BOSTRÖM P, SPARKS L M, ENERBACK S, SCHRAUWEN P, SPIEGELMAN B M. “Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human.” *Cell*, , 2012; vol. **150** :pp. 366–376., doi:10.1016/j.cell.2012.05.016.
- YAN X, S. EHNERT, M. CULMES . “5-Azacytidine Improves The Osteogenic Differentiation Potential Of Aged Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells By DNA Demethylation,” *PLoS One*, 2014;vol. **9**, no. 6, article e90846,.
- YOSHIMURA K, SHIGEURA T, MATSUMOTO D, SATO T, TAKAKI Y, AIBA-KOJIMA E, SATO K, INOUE K, NAGASE T, KOSHIMA I, GONDA K.” Characterization of Freshly Isolated and Cultured Cells Derived From the Fatty and Fluid Portions of Liposuction Aspirates” *J Cell Physiol*. 2006; **208**:64–76. doi: [10.1002/jcp.20636](https://doi.org/10.1002/jcp.20636)
- YOUNG, M.V. “The Tick-Tock of the Biological Clock.” *Scientific American*, March 2000: 64-71.
- ZHENG B, ALBRECHT U, KAASIK K, SAGE M, LU W, VAISHNAV S, LI Q, SUN ZS, EICHELE G, BRADLEY A, AND LEE CC. “Nonredundant Roles Of The Mper1 And Mper2 Genes In The Mammalian Circadian Clock.” *Cell* 2001;**105**: 683–694.
- ZHENG B, LARKIN DW, ALBRECHT U, SUN ZS, SAGE M, EICHELE G, LEE CC, AND BRADLEY A. “The Mper2 Gene Encodes A Functional Component Of The Mammalian Circadian Clock. “*Nature*, 1999;**400**: 169–173.
- ZHENG B, ALBRECHT U, KAASIK K, SAGE M, LU W, VAISHNAV S, LI Q, SUN ZS, EICHELE G, BRADLEY A, AND LEE CC. “Nonredundant Roles Of The Mper1 And Mper2 Genes In The Mammalian Circadian Clock.” *Cell*, 2001;**105**: 683–694.
- ZIMMET P. “The Circadian Syndrome: Is the Metabolic Syndrome and Much More!” *Journal of Internal Medicine*, Oct. 2019, doi:10.1111/joim.12924.
- ZVONIC S, PTITSYN AA, CONRAD SA, SCOTT LK, FLOYD ZE, KILROY G. “Characterization of Peripheral Circadian Clocks in Adipose Tissues.” *Diabetes*. 2006;**55**(4):962–70.
- ZUK PA, MIN ZHU, PETER ASHJIAN, DANIEL A. DE UGARTE, JERRY I. HUANG, HIROSHI MIZUNO, ZENI C. ALFONSO, JOHN K. FRASER, PROSPER BENHAÏM, MARC H. HEDRICK. “Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells.” *Mol Biol Cell*. 2002; **13**(12): 4279–4295.
- ZUK P A, M. ZHU, H. MIZUNO . “Multilineage Cells From Human Adipose Tissue: Implications For Cell-Based Therapies,” *Tissue Engineering*, 2001;vol. **7**, no. 2, pp. 211–228.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Fatma Elçin

Soyadı: KINIKLI AFŞAR

Doğum yeri ve tarihi: Ankara/1993

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Bağlıca Mahallesi Ufuk Caddesi 1148.

Sokak ArcadiaLife Sitesi Blok 17

Numara Etimesgut/ Ankara 0530 584

5393

II. Eğitimi

İ.D. Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2011-2016)

Hacı Ömer Tarman Anadolu

Lisesi(2007-2011)

Yabancı Dili:

- İngilizce
- Almanca

II- Ünvanları: Moleküler Biyolog

III. Mesleki Deneyimi

- Roche Türkiye İnfogenetik, İstanbul, Bilim Lideri (2016)
- Genoks Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara, İş Geliştirme Müdürü (2016-2017)

IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Bilimsel İlgi Alanları

Kanser
İmmünoloji
NGS Çalışmaları
Viroloji
Mikrobiyoloji
Sentetik Biyoloji

Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı ödüller: İ.D. Bilkent Üniversite Yüksek Onur Öğrencisi (2015)
İ.D. Bilkent Üniversitesi Türkiye Tarihi Özel Ödülü (2016)
COPE (proficiency exam for English, BUSEL,(İ.D. Bilkent Üniversitesi) (2012)
C1 SPRACH DIPLOM (GOETHE INSTITUTE) (2011)

III. Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri:

- TÜBA- Kök Hücre Tedavilerine Genel Yaklaşımlar Sempozyumu (2015)
- Deney hayvanları kullanım sertifikası –İ.D. Bilkent Üniversitesi (2014)
- Turkish Culinary Academy Pasta Şefliği Eğitimi (2016)
- Turkish Culinary Academy Profesyonel Aşçılık Eğitimi(2020)