



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MONONÜKLEER KAN HÜCRELERİNDE MİTOKONDRIYAL AKTİVİTE
ÖLÇÜM METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE RAMAZAN ORUCUNUN
BU AKTİVİTEYE ETKİSİ**

ŞEYMA KABLAN

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi RABİA İCLAL ÖZTÜRK

İSTANBUL-2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hiçbir aşamasında desteğini, gülyüzünü ve ilgisini esirgemeyen, deneylerin gerçekleşmesinde büyük emeği olan, her ihtiyaç duyduğumda benimle omuz omuza çalışan çok değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Rabia İclal Öztürk'e, Bana Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nin kapısını açarak hayatıma yeni bir yön veren, birlikte çalışmaktan her zaman gurur duyduğum ekibine dahil eden, bilimsel ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyerek bu çalışmanın gerçekleşmesini mümkün kılan hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Bugün geldiğim noktada olmamda büyük emeği olan, üniversiteye ilk adım attığım günden beri sevgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Muazzez Garipağaoğlu'na,

Kendisiyle tanıştığım ilk günden beri bana çok şey öğreten ve öğretmeye de devam eden, üzerimde büyük emeği olan hocam Dr. Yasemin Yozgat'a, eğitim hayatım boyunca bana emeği geçen bütün hocalarıma,

İçten sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan arkadaşlarım Esra Akyol Koca, Beyza Nur Aslan, Sümeyye Nur Aydoğan ve Mine Uçar'a,

İkinci ailem olarak gördüğüm Göztürk Lab'ın birbirinden değerli bütün üyelerine, Dr. Öğr. Üyesi Neşe Ayşit hocama, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Sadık Bay ve Arda Kebapçı abilerime, Uzm. Dyt. Cansu Yurdakul Eliaçık hocama,

Tüm REMER çalışanlarına, kıymetli hemşiremiz Gözde Gür'e, bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük yardımları olan arkadaşlarım Ayşe Server Sezer, Safiye Serdengeçti, Kevser Bayrak, Pelin Tuğlu, Büşranur Delice'ye ve diğer tüm katılımcılara,

En çok da her zaman yanımda olan ve beni koşulsuz destekleyen annem Fatma Kablan'a, babam Mustafa Kablan'a, kardeşlerim Samed ve Sıla Kablan'a, anneanne ve dedeme, en kıymetlime,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1 İnsan Kan Hücrelerinin Fizyolojisi	5
4.1.1 Mononükleer Kan Hücreleri	6
4.2. Hücrel Enerji Metabolizması	8
4.2.1 Glikoliz	9
4.2.2 Mitokondri	10
4.2.3 Mitokondriyal Solunum	11
4.3 Mitokondriyal Aktivite Ölçümü	13
4.4. Mononükleer Kan Hücrelerinde Mitokondriyal Aktivite Ölçümünün Literatürdeki Yeri	19
4.4.1. Biyoenerjetik Sağlık İndeksi.....	21
4.5. Açlık Fizyolojisi ve Aralıklı Oruç Uygulamaları	21
4.5.1 Ramazan Orucu ve Etkileri.....	23
5. MATERYAL VE METOT	25
5.1 Çalışmanın Tasarımı, Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi	25
5.2 Antropometrik Ölçümler	26
5.3 Besin Tüketim Kayıtları	26
5.4 Kan Alımları	27
5.5 Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu	27
5.5.1 Percoll Çözeltilisinin Hazırlanması ve Optimizasyonu.....	27

5.5.2	Mononükleer Hücre İzolasyon Protokolü	28
5.5.3	Tripan Mavisi ile Canlılık İncelenmesi ve Hücre Sayımı	30
5.6	Flow Sitometri Analizi	31
5.7	Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile Mito Stres Testi	31
5.8	Ölçüm Zamanının Optimizasyonu	35
5.9	İstatistiksel Analiz	35
5.10	Kullanılan Malzemeler	36
6.	BULGULAR	37
6.1	Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonunun Optimizasyonu	37
6.2	Mitokondriyal Aktivite Ölçümünün Optimizasyonu	39
6.2.1	Ekilecek Hücre Sayısının Belirlenmesi	39
6.2.2	FCCP Konsantrasyonunun Optimizasyonu	40
6.2.3	Ölçüm Zamanının Optimizasyonu	41
6.3	Bireylerin Demografik ve Antropometrik Özellikleri	42
6.4	Bireylerin Besin Tüketim Kayıtlarının Analizleri	45
6.5	Ramazan Sürecinde Mitokondriyal Aktivite Parametrelerindeki Değişimler ..	49
6.6	Vücut Ağırlığı, Enerji Alımı ve Mitokondriyal Aktivite Ölçümlerindeki Oransal Değişimler	53
7.	TARTIŞMA	54
7.1	Mononükleer Hücre İzolasyonunun ve Mitokondriyal Aktivite Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi	54
7.2	Bireylerin Genel Özellikleri ve Antropometrik Ölçümleri	56
7.3	Enerji ve Besin Ögesi Alımları	58
7.4	Mitokondriyal Aktivite Ölçüm Sonuçları	60
7.5	Çalışmanın Sınırlılıkları	62
8.	SONUÇ VE ÖNERİLER	64
9.	KAYNAKLAR	66
10.	ETİK KURUL ONAYI	74
11.	ÖZGEÇMİŞ	78

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

DNA : Deoksiribonükleik Asit

ATP : Adenozin Trifosfat

BKİ : Beden Kütle İndeksi

BEBİS: Beslenme Bilgi Sistemi

HDL :Yüksek yoğunluklu lipoprotein (high density lipoprotein)

LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein (low density lipoprotein)

FCCP : Karbonilsiyamid-p trifluorometoksifenilhidrazon

ETS: Elektron Taşıma Sistemi

IL: İnterlökin

CRP: C-reaktif protein

OCR: Oxygen Consumption Rate (Oksijen Tüketim Oranı)

ECAR: Extracellular Acidification Rate (Ekstraselüler Asidifikasyon Oranı)

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotit

FADH: Flavin Adenin Dinükleotit

FMN: Flavin mononükleotid

g: gram

kg: kilogram

m: metre

cm: santimetre

kcal: kilokalori

μ M: micromolar

M: molar

pmol: pikomol

mpH: mili pH

dk: dakika

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Şekil 4.1 Hematopoetik kök hücreden farklı kan hücrelerinin oluşumu	6
Şekil 4.2 Hücresel enerji metabolizması: Glikoliz, krebs döngüsü ve elektron taşıma sistemi.	9
Şekil 4.3 Mitokondrinin yapısı ve mitokondride gerçekleşen temel biyokimyasal olaylar.....	11
Resim 4.4 Seahorse XFe96 Metabolizma Ölçüm Cihazı	14
Şekil 4.5 Seahorse Mikroplakası, Enjeksiyon Portları ve Çalışma Mekanizması.....	15
Şekil 4.6 Mito Stres Testi için kullanılan ilaçların ETS üzerindeki etkileri.	16
Şekil 4.7 Mito Stres Testi Profili.	17
Şekil 5.1 Çalışmanın akış şeması.....	25
Şekil 5.2 Percoll ile Mononükleer Kan Hücresi İzolasyonu.....	29
Şekil 5.3 Hemositemetre ile hücre sayımı ve hesaplama formülü.....	30
Şekil 5.4 Mitokondriyal aktivite ölçümü için deney akış planı.	34
Resim 6.1 Percoll ile santrifüj sonrası oluşan tabakaların mikroskop görüntüleri. ...	37
Şekil 6.2 İki farklı mononükleer hücre örneğinin Flow Sitometri analizi.	38
Şekil 6.3 Farklı sayılarda ekilen mononükleer hücrelerin Mito Stres Test sonuç grafiği.	39
Resim 6.4 Metabolizma ölçümü için gereken optimal hücre yoğunluğunun mikroskop görüntüleri.....	40
Şekil 6.5 İki farklı kişinin kanından izole edilen mononükleer hücreler (3×10^5 hücre/kuyucuk) ile gerçekleştirilen FCCP titrasyonu.	40
Şekil 6.6 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin bekleme süresinin mitokondriyal aktivite parametreleri üzerindeki etkisi. Error! Bookmark not defined.	
Şekil 6.7 Bireylerin zamana göre değişen antropometrik ölçümleri.....	44
Şekil 6.8 Bireylerin zamana göre enerji alımları.	48
Şekil 6.9 Bireylerin zamana göre mitokondriyal aktivite ölçümleri.....	51
Şekil 6.10 Bireylerin Vücut Ağırlığı, Enerji Alımı ve Mitokondriyal Aktivite Ölçümlerindeki Değişimler (%).....	53

TABLO LİSTESİ

Tablo 6.1 Katılımcıların Genel ve Antropometrik Özellikleri	43
Tablo 6.2 Çalışmaya Katılan Kadınların Zamana Göre Enerji ve Besin Ögesi Alımları	45
Tablo 6.3 Çalışmaya Katılan Erkeklerin Zamana Göre Enerji ve Besin Ögesi Alımları	46
Tablo 6.4 Bireylerin Zamana Göre Enerji ve Besin Ögesi Alımları (n=9)	47
Tablo 6.5 Ramazan Dönemi ve Ramazan Dışındaki Enerji ve Besin Ögesi Alımlarının Genel Analizi.	49
Tablo 6.6 Bireylerin Zamana Göre Mitokondriyal Aktivite Ölçüm Sonuçları	50



1. ÖZET

MONONÜKLEER KAN HÜCRELERİNDE MİTOKONDRIYAL AKTİVİTE ÖLÇÜM METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE RAMAZAN ORUCUNUN BU AKTİVİTEYE ETKİSİ

Bu tez çalışmasında, genel sağlık durumunun veya vücuttaki metabolik değişikliklerin bir göstergesi olabilen mitokondriyal fonksiyonun ölçülebilmesi için uygun bir metodun geliştirilmesi ve Ramazan orucunun bireylerin beslenme durumu, antropometrik ölçümleri ve kanlarından izole edilen mononükleer hücrelerin mitokondriyal aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde yürütülen çalışmaya toplamda 20 gönüllü birey dahil edilmiştir. Deneysel koşulların optimizasyonunun ardından, yaş ortalaması $24,0 \pm 3,3$ yıl olan 10 katılımcıdan Ramazan ayının 1., 15., 27. günlerinde, 1 ve 3 ay sonrasında alınan kanlardan izole edilen mononükleer hücrelerin mitokondriyal aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler için Seahorse XFe96 Hücre Metabolizması Ölçüm Cihazı kullanılmış, ölçüm yapılan günlerde bireylerin 24 saatlik besin tüketim kayıtları ve antropometrik ölçümleri de alınmıştır. Ramazan sonunda vücut ağırlığı ve BKİ değerleri Ramazan'ın 1. gününe kıyasla azalırken ($p < 0,05$), kas ve yağ oranlarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p > 0,05$). Kadınlar ortalama 1720 ± 1370 g, erkekler ise 1350 ± 350 g zayıflamıştır. Ramazan sonundaki enerji alımları ($1852,8 \pm 605,6$ kkal), Ramazan'ın birinci ($2343,4 \pm 1262,0$) ve 15. ($2162,0 \pm 773,7$) gününe göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$). Bireylere ait olan mononükleer hücrelerin bazal solunum, ATP üretimi, maksimal solunum ve yedek solunum kapasitelerinin de oruç tutulan dönemde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). Ramazan sırasında görülen değişimlerin çoğunlukla kalıcı olmadığı, normal beslenme düzenine dönülmesi ile birlikte bu parametrelerin de tekrar yükselişe geçtiği saptanmıştır. Sonuç olarak Ramazan orucu, vücut ağırlığını, enerji alımını ve mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktivitesini geri dönüşümlü olarak değiştirmektedir ancak görülen değişimlerin nedeninin tam olarak aydınlatılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Beslenme, Mitokondriyal aktivite, Mononükleer kan hücresi, Ramazan, Oruç

2. ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MITOCHONDRIAL ACTIVITY MEASUREMENT METHOD IN MONONUCLEAR BLOOD CELLS AND THE EFFECT OF RAMADAN FASTING ON THIS ACTIVITY

In this thesis, it is aimed to develop an appropriate method to measure mitochondrial function which can be an indicator of general health status or metabolic changes in the body and to determine the effects of Ramadan fasting on the nutritional status, anthropometric measurements of individuals and the mitochondrial activity of mononuclear cells isolated from their blood. The study was conducted in Istanbul Medipol University Regenerative and Restorative Medicine Research Center with 20 volunteers. After the optimization of experimental conditions, mitochondrial activity measurements were performed with mononuclear cells isolated from 10 participants' - mean age 24.0 ± 3.3 years- blood samples on the 1st, 15th, 27th days of Ramadan, and 1 and 3 months after Ramadan. Seahorse XFe96 Analyzer was used for mitochondrial activity measurements, 24-hour dietary recalls and anthropometric measurements of the individuals were also collected. At the end of Ramadan, body weight and BMI values decreased significantly compared to the first day of Ramadan ($p < 0.05$), but there was no significant change in muscle and fat ratios ($p > 0.05$). The average weight loss was 1720 ± 1370 g for women and 1350 ± 350 g for men. Average energy intake at the end of Ramadan (1852.8 ± 605.6 kcal) decreased significantly compared to the first (2343.4 ± 1262.0 kcal) and 15th (2162.0 ± 773.7 kcal) days of Ramadan ($p < 0.05$). It was determined that the basal respiration, ATP production, maximal respiration and reserve respiration capacities of the mononuclear cells isolated from the participants' blood decreased significantly during the Ramadan fasting period ($p < 0.05$). It was found that the changes observed during Ramadan were not permanent and that these parameters also increased again with the return to normal diet. Consequently, Ramadan fasting reversibly changes body weight, energy intake and mitochondrial activity of mononuclear blood cells in healthy individuals, but more comprehensive studies are needed to fully elucidate the cause of these changes.

Keywords: Nutrition, Mitochondrial activity, Mononuclear blood cell, Ramadan, Fasting

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kronik hastalıkların pek çoğunun temel nedenleri, hücresel ve moleküler boyutta ele alınmaktadır. Birçok hastalığın oluşumunda ve sağlığın korunmasında büyük öneme sahip olan beslenmenin de hücresel boyutta ele alınmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

İnsanın alyuvarları dışındaki her hücresinde bulunan mitokondri, enerji metabolizmasının merkez noktalarındandır ve mitokondriyal solunum, mitokondriyal sağlığın bir göstergesi olarak kabul edilir (1). Mononükleer kan hücrelerinin insanlarda mitokondrinin nispeten kolay ulaşılabilir kaynakları olmalarının yanı sıra dolaşımdaki çevresel ve diyetel etkenlere bağlı değişimlere maruz kalmaları nedeniyle bu hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini değerlendirmek için uygun deney metodunun geliştirilmesinin beslenme ve metabolizma ilişkisi alanındaki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir (2-4).

Literatürde insan periferik kan mononükleer hücrelerinde hücre metabolizması ölçüm cihazı ile ölçülebilen metabolik parametrelerin çeşitli hastalıklarda patolojik ve prognostik değer taşıyabileceği belirtilmiş, Biyoenerjetik Sağlık İndeksi (BHI-Bioenergetic Health Index) gibi biyobelirteç olmaya aday formüller geliştirilmiştir (3, 5). Bu biyoenerjetik parametrelerin bireyin mitokondriyal fonksiyonunu zaman içinde izlemek ve potansiyel olarak bireyler arasında karşılaştırma yapmak için kullanılabilmesi ifade edilmektedir ancak farklı zamanlardaki ölçüm sonuçları karşılaştırılırken sisteme bağlı değişimlerin en aza indirilmesi için deneysel koşulların optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır (6, 7). Bu nedenle bu tez çalışmasında, hücresel düzeyde mitokondriyal fonksiyonun ölçümüne olanak sağlayan Seahorse XFe96 Hücre Metabolizması Ölçüm Cihazı kullanılarak ölçülen mitokondriyal parametrelerin sağlığın veya vücuttaki metabolik değişikliklerin bir göstergesi olarak kullanılabilmesi için güvenilir bir metodun geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilmesi hedeflenen metodun denenmesi için ise bireyler arasında zamana ve beslenme düzenine bağlı olan değişimler konusunda karşılaştırma yapmaya elverişli olduğu düşünüldüğünden Ramazan orucu modeli tercih edilmiştir. Oruç; yiyecek, su veya belirli seçilmiş besin gruplarından uzak durmayı gerektiren bir uygulamadır. Oruç

tutmanın çeşitli dinlerde bir ibadet olmasının yanı sıra, aralıklı oruç ve benzeri uygulamalar tedavi amaçlı olarak da uzun yıllardır kullanılmakta ve sağlık üzerinde iyileştirici etkilerinin bulunduğu öne sürülmektedir (8, 9). Uzun vadede beslenme düzeninin kronik hastalık riskini ve biyoenerjetik sağlığı etkileyeceği öne sürülse de bu düzendeki Ramazan orucu gibi dönemsel değişimlerin metabolik etkilerinin mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktivitelere yansıyor yansımayacağı bilinmemektedir.

Özetle, bu tez çalışmasında insan kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mitokondriyal aktivitelere ölçümünde kullanılabilir tutarlı bir metodun geliştirilmesi ve Ramazan döneminde tutulan orucun bireylerin beslenme durumu, antropometrik ölçümleri ve mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

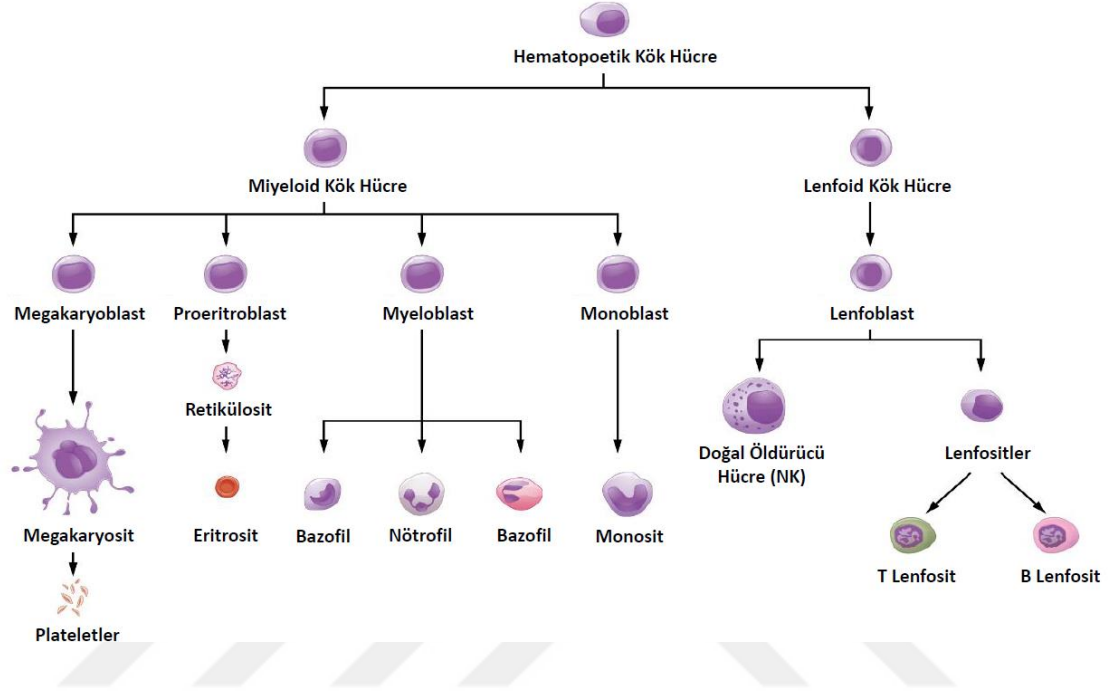
4.1 İnsan Kan Hücrelerinin Fizyolojisi

Kan, insan yaşamının temel bir bileşenidir. Yetişkin bir insan vücudunda, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte yaklaşık 4 ila 5 litre kan karmaşık bir damar ağı boyunca sürekli olarak dolaşır. Kanın bu dolaşım esnasındaki temel görevi oksijen ve diğer besin maddelerinin hücrelere kadar taşınması, karbondioksit gibi atık maddelerin ise hücrelerden uzaklaştırılmasıdır (10).

Kanın temel bileşenleri, özel hücreler ve sıvılardır bu nedenle kanın hem bir sıvı hem de bir doku olduğu söylenebilir. Berrak, hafif yapışkan ve sarımsı sıvı kısım olan plazma, kan içeriğinin yaklaşık %54'ünü oluşturur. Yüzde 90'ı su olmasına rağmen, plazma kritik proteinler de dahil olmak üzere sağlığı ve yaşamı sürdürmek için gerekli olan elementleri içerir. Eritrositler olarak da bilinen kırmızı kan hücreleri kanın yaklaşık %45'ini, beyaz kan hücreleri (lökositler) ve plateletler (trombositler) ise kalan %1'lik kısmını oluşturur (10, 11). Vücutta en bol bulunan kan hücreleri olan eritrositlerin en önemli görevi yapılarındaki hemoglobin sayesinde oksijen ve karbondioksit taşımaktır. Memelilerdeki diğer birçok hücrenin aksine çekirdekleri yoktur ve kan damarlarına sığmak için kolayca şekil değiştirebilirler (12). Beyaz kan hücreleri, hastalığa neden olan ajanları yok ederek vücudun enfeksiyon ve hastalıklardan korunmasına yardımcı olur. Bu hücreler ayrıca kendi aralarında vücudun bağışıklığına yardımcı olan lenfositler ve mikroorganizmalar ile yabancı maddeleri parçalayan fagositik hücreler (granülosit ve monositler) olarak sınıflandırılır (11, 13). Trombosit adı verilen küçük hücre parçaları ise kanın pıhtılaşmasının sağlanmasında önemlidir (14).

Kan hücrelerinin yaşam süreleri kısa olduğundan, sürekli olarak üretilmeleri gereklidir. Tüm kan hücreleri yetişkin memelilerin kemik iliğinde az sayıda bulunan kendi kendini yenileyebilen hematopoetik kök hücrelerden köken alır ve bu hücrelerden kan hücresi üretimi 'hematopoez' olarak adlandırılır (15). Kök hücreler, kök hücre olarak devam eden bazı yavru hücreler ve farklılaşma yoluna giden hücreler üretmek üzere bölünebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Kan hücreleri oluşturmak üzere

bölündüklerinde miyeloid ve lenfoid hücreleri oluştururlar (16, 17). Miyeloid hücreler kemik iliğinde gelişerek eritrosit, platelet, monosit, nötrofil, eozinofil, bazofillere dönüşürken; lenfoid hücreler dalak ve timusa göç ederek lenfositleri meydana getirir (Şekil 4.1) (17).



Şekil 4.1 Hematopoetik kök hücreden farklı kan hücrelerinin oluşumu (18).

Kan insan vücudunun en kolay erişilen ve kolayca incelenen dokularından biridir. Ayrıca, bileşenlerinin her biri fizyolojik olarak bir veya daha fazla işlevi yerine getirir ve bu bileşenlere uygulanan testler bireyin sağlığı hakkında hayati bilgiler sağlar (10).

4.1.1 Mononükleer Kan Hücreleri

Mononükleer kan hücreleri, periferik kandan izole edilen ve yuvarlak bir çekirdeğe sahip olan hücrelerdir. Lenfositler (T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücreler), monositler ve dendritik hücreler mononükleer kan hücre popülasyonunu oluşturmaktadır (19, 20). Bu hücrelerin kanda bulunma oranları bireyler arasında farklılık göstermesine rağmen genellikle lenfositler %70-90, monositler %10-20, dendritik hücreler ise % 1-2 oranında bulunurlar (19).

Mononükleer kan hücresi popülasyonunun en büyük kısmını oluşturan lenfositler, edinsel bağışıklığı düzenleyen kilit hücrelerdir. Yabancı ajanların spesifik olarak tanınması ve uzaklaştırılmasından sorumludurlar. Lenfoid öncül hücreleri genel olarak üç ana hücre topluluğuna farklılaşmaktadır. Bunlar küçük lenfositler olarak bilinen B ve T hücreleri ile büyük çekirdekli lenfositler olarak bilinen doğal öldürücü (NK) hücrelerdir (21).

B lenfositler sindirim sistemi ile ilişkili lenfoid dokuda (GALT = Gut-associated lymphoid tissue), T lenfositler ise timusta olgunlaşma sürecini tamamlamaktadır. Daha sonra kan dolaşımına geçen lenfositlerin bir kısmı lenf nodları ve dalak gibi sekonder lenfoid organlarda görev almaktadır (22). B hücreleri, vücut dokularındaki yabancı mikroorganizmalara bağlanan ve bunların yok edilmesine aracılık eden proteinler olan antikorları salgırlar. T hücreleri ise viral olarak enfekte olmuş veya kanserli hücreleri tanıyarak yok eder. Ayrıca B hücreleri tarafından antikor üretimine yardımcı olurlar (13, 21).

Doğal öldürücü hücreler (NK), doğal bağışıklığın parçasıdır ve konağın tümörlere ve virüslerle enfekte olmuş hücrelere karşı savunmasında en büyük rolü oynarlar. Sitokinlerin alt tiplerinden biri olan interferonlarla uyarılarak aktif hale gelirler ve sitotoksik granüller salgılayarak hedef hücreleri öldürürler (13). Ayrıca inflamasyon sırasında düzenleyici hücreler olarak da hareket ettikleri ve adaptif immün yanıtı düzenledikleri bilinmektedir (23).

Lenfositler işlevsel anlamda köken aldıkları dizi ve fenotip olarak birbirlerinden farklıdır ve bu nedenle karmaşık biyolojik yanıtlara ve aktivitelere neden olmaktadır. Lenfositlerin ömrü birkaç haftadan birkaç yıla kadar uzanabilmektedir (22).

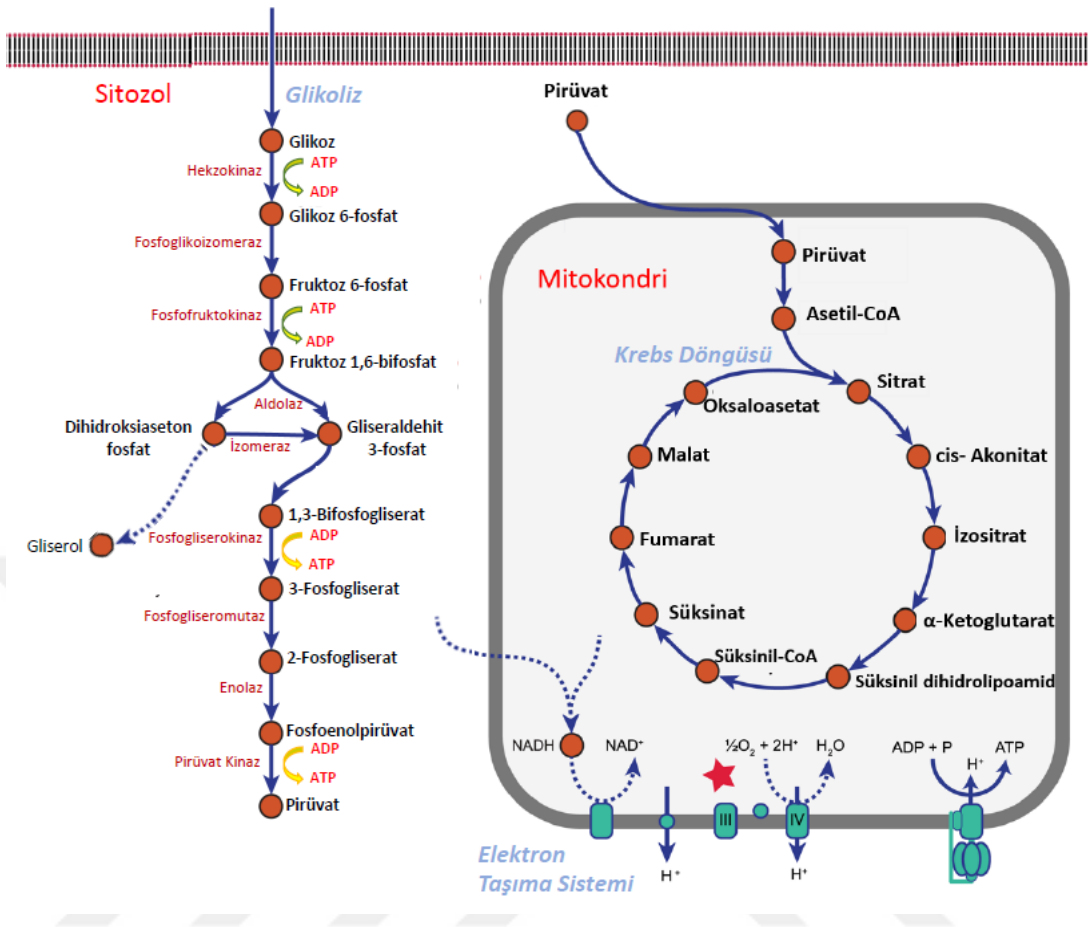
Monositler, doğal immün sistemin önemli ve en büyük (ortalama 15–18 mikrometre) hücreleridir (24). Aktif olarak hareketli olan bu hücreler eritrositleri ve diğer büyük parçacıkları olduğu gibi bulaşıcı ajanları da fagosite etme yeteneğine sahiptirler (25). Çoğu patojene karşı etkin bir bağışıklık yanıtının sağlanması için çok önemli olan monositler, kemokin reseptörleri ve kandan enfeksiyon bölgesine geçişi modüle eden adezyon reseptörleri ile donatılmıştır. Monositler genellikle granülositlerden daha sonra iltihaplı doku bölgelerine girerler. Çoğunlukla kronik

enfeksiyon bölgelerinde bulunurlar. Makrofajlara ve/veya dendritik hücrelere farklılaşarak doğal ve adaptif immüniteyi düzenlerler (24).

4.2. Hücresel Enerji Metabolizması

Hücresel enerji hemen hemen her aktivitesi için gerekli olan enerji, adenosin trifosfatın (ATP) adenosin difosfata (ADP) hidrolizi ile sağlanır. Enerji homeostazını ve dolayısıyla hücre bütünlüğünü ve fonksiyonunu korumak için ATP sürekli olarak yenilenmelidir (24). Bu işlem için gereken enerji, farklı karbon kaynaklarının -monosakkaritler (glukoz, fruktoz, galaktoz), yağ asitleri ve amino asitler- kademeli olarak oksidasyonundan sağlanır. Besin alımını takiben bağırsaktan vücuda emilen bu yakıt molekülleri dolaşım yoluyla vücuda yayılır ve hücreler; enerji üretimi, iskelet kası ve karaciğer hücrelerindeki glikojen depoları ile triaçilgliserollerin (TAG) biyosentezi ve takviyesi için gerekli besinleri alır (26). Glukoz, kırmızı kan hücreleri ve beyin hücreleri için birincil yakıttır ve tüketimini sınırlandırmak için, istirahat halindeki karaciğer hücreleri ve iskelet kası hücreleri, ATP üretimi için öncelikle yağ asitlerini kullanır (27).

Hücresel enerji gereksinimini karşılamak için gereken ATP, sitoplazmada gerçekleşen glikoliz ve mitokondride gerçekleşen sitrik asit (trikarboksilik asit ya da krebs) döngüsü ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) sistemi tarafından üretilir (28). Bu olayların şeması Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Hücresel enerji metabolizması: Glikoliz, krebs döngüsü ve elektron taşıma sistemi.

4.2.1 Glikoliz

Glikoliz, glikozun hücrede kullanılmasında ana yol olup tüm hücrelerde yer alır. Glikoz, C₆H₁₂O₆ kimyasal formülüne sahip 6-karbonlu bir moleküldür. Dolaşıma katılan glikoz doğrudan besinlerden ya da glikozun insanlardaki depo formu olan karaciğer ve kas glikojeninden elde edilir (29). Glikoz başta merkezi sinir sistemi hücreleri olmak üzere vücudun birçok hücresi için önemli bir enerji kaynağıdır (30). Plazma glikoz seviyesi temel biyokimyasal yollar tarafından düzenlenir. Kandaki glikoz, enerji sağlamak amacıyla hücre zarındaki belirli glikoz taşıyıcıları (GLUT1, GLUT4) ile hücre içine alınır (31). Bir dizi biyokimyasal reaksiyon sonucunda yüksek enerjili kimyasal molekül olan ATP'ye kadar parçalanır ve hücrelerin en hızlı kullanabildiği ATP kaynağıdır.

Glikozun katabolizması sonucunda enerji sağlanan glikoliz yolağının açıklanması 1940'lara kadar sürmüştür. Glikoliz ortamda oksijen varlığında (aerobik koşullar) da yokluğunda (anaerobik koşullar) da gerçekleşebilir (32). Hücresel aktivite için gereken ATP molekülü sağlanırken aynı zamanda glikoliz sonucu oluşan ara ürünler birçok maddenin yapıtaşını oluşturmaktadır. Glikozun izomerleri olan fruktoz ve galaktozun metabolize edilebilmesinde de temel yolak glikolizdir (33).

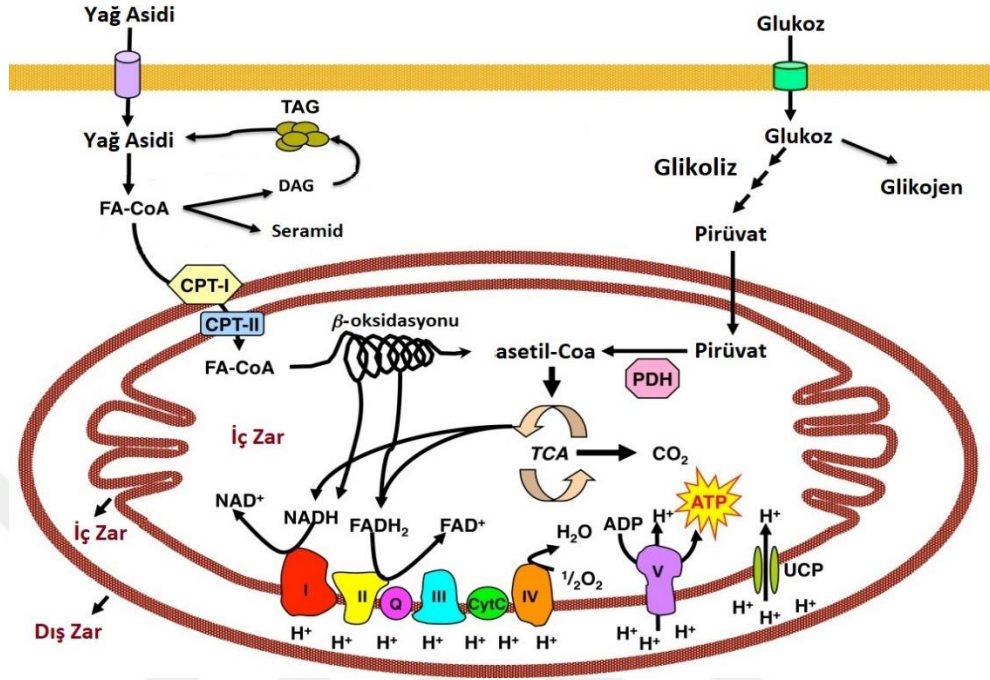
Hücre sitoplazmasında gerçekleşen glikoliz sonucunda glikoz pirüvata dönüşür. Aerobik koşullarda, oluşan pirüvat daha sonra tamamen okside olduğu mitokondriye girerek sitrik asit döngüsüne katılır. Bu döngüde oluşan elektron taşıyıcıları, elektron taşıma sistemine (ETS) aktarılır ve ATP üretiminin büyük kısmı gerçekleşir. Glikoz molekülü başına üretilen ATP miktarı konusunda farklı görüşler mevcut olup, net ATP sayısı 30 ila 38 arasında değişmektedir (34, 35). Anaerobik koşullarda ise oluşan pirüvat sitrik asit döngüsüne girmeyerek laktat son ürününe dönüşür ve net 2 ATP üretilir. Glikoliz sonucunda üretilen ATP, vücutta enerji gerektiren neredeyse her işlem için kullanılır (36, 37).

4.2.2 Mitokondri

İnsanın eritrositleri dışındaki her hücresinde bulunan mitokondri, hücresel metabolik faaliyetlerin temelini oluşturan oksidatif fosforilasyon ile ATP üretiminin yanı sıra hücre canlılığının sürdürülmesinde önemli birçok görev üstlenen bir organeldir (38, 39). Mitokondriyal hastalıkların çeşitliliği de, mitokondrinin hücre ve dokularda önemli roller üstlendiğini vurgulamaktadır (40).

Mitokondri, her biri spesifik fonksiyonlara sahip dört bölmeden oluşur, bunlar: dış mitokondriyal zar, iç mitokondriyal zar, zarlar arası boşluk ve matristir. Dış zar, iyonların ve küçük bir protein boyutundaki moleküllerin geçişine izin verecek kadar büyüklükteki birçok protein yapılı porine sahiptir ve iç zarı tamamen kaplar. İç zar ise çok daha sınırlı bir geçirgenliğe sahiptir ve çevrelediği mitokondriyal matrise doğru girintiler yaparak krista adı verilen yapıları oluşturur (41). Elektron taşınımı ve ATP sentezinde görev alan elektron taşıma sistemi (ETS) bileşenleri, ATP sentaz, ATP-ADP translokaz gibi enzimler iç zar üzerinde bulunurken, sitrik asit döngüsü, yağ

asitlerinin β oksidasyonu, amino asit oksidasyonu için gerekli olan enzimler mitokondri matriksinde yer alır (42).



Şekil 4.3 Mitokondrinin yapısı ve mitokondride gerçekleşen temel biyokimyasal olaylar (43)

Kendine ait deoksiribonükleik asite (mtDNA) sahip olması ve hücre bölünmesinden bağımsız olarak çoğalabilmesi, mitokondriyi farklı kılan özelliklerdendir (44). Enerji ihtiyacı, mitokondri çoğalmasını etkileyen temel faktörlerdendir. Dolayısıyla hücrelerdeki mitokondri sayıları eşit olmayıp, enerji ihtiyacına göre mitokondri sayısı artmaktadır (42).

Hastalıkların mitokondri ile ilişkili biyoenerjetik yönleri konusundaki bilgilerin artırılması, tanı, tedavi, önleme ve tıbbın çeşitli alanlarını birbirine bağlama konusunda yeni fırsatlar sağlamaktadır (38).

4.2.3 Mitokondriyal Solunum

Mitokondrinin en yaygın bilinen görevi oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimidir. Glukoz gibi substratlardan sağlanan elektronların yükseltgenme ve

indirgenme olayları ile oksijene taşındığı yola elektron taşıma sistemi adı verilir. Elektronların, elektron taşıma sisteminde taşınması sırasında oluşan enerjinin adenosin difosfat (ADP) ve inorganik fosfor (Pi) ile birleşip ATP oluşturması olayı ise oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılmaktadır (45).

ATP üretimi için aşamalı oksidasyon işlemi, glukoz için bir dizi enzimin piruvata kısmi oksidasyonu katalize ettiği sitozolde başlar. Mitokondri matriksinde gerçekleşen sitrik asit döngüsünde elektronlarla yüklenen NADH ve FADH₂ taşıdıkları elektronları iç zar üzerine yerleşmiş olan elektron taşıma sistemine aktarırlar (40). Elektron taşıma sistemi 5 alt üniteden oluşmaktadır, bunlar: Kompleks 1 (NADH: ubikinon oksidoredüktaz), Kompleks 2 (süksinat: ubikinon oksidoredüktaz), Kompleks 3 (ubikinon: sitokrom c redüktaz), Kompleks 4 (sitokrom-c oksidaz) ve Kompleks 5 (ATP Sentaz)'tir (46).

Kompleks 1 (CI: NADH:ubikinon oksidoredüktaz): CI, bilinen en büyük membran proteinlerinden biridir ve 45 alt üniteden oluşur. Flavin mononükleotid (FMN) molekülü ve demir-kükürt ana alt ünitelerini oluşturur. FMN, esas olarak matrikste meydana gelen sitrik asit döngüsü tarafından üretilen NADH'dan türetilmiş bir çift elektronu alarak FMNH₂'yi oluşturur ve demir-kükürt kümeleri aracılığıyla da elektronlar ubikinona iletilir. Kompleks 1'in temel görevi NADH'dan ubikinona elektron taşımaktır. Elektron transferi sırasında mitokondriyal matrinden zarlar arası boşluğa dört proton pompalanır. Böylelikle ATP sentezi için gereken proton kuvvetinin çoğu sağlanır (47, 48).

Kompleks 2 (CII: süksinat:ubikinon oksidoredüktaz): CII, üç farklı tipte FeS kümesi ve bir flavoprotein olmak üzere 4 alt birimden oluşmaktadır. Krebs döngüsünün bir parçası olarak, süksinatın fumarata oksidasyonunu katalize eder. CII, elektronlar için başka bir giriş noktasıdır ve elektronları CI' e benzer şekilde FeS kümeleri vasıtasıyla süksinattan ubikinona (Koenzim Q) taşır (49).

Kompleks 3 (CIII: ubikinon: sitokrom c redüktaz): CIII sitokrom B, sitokrom C₁ ve demir-kükürt proteini ile sarılmış yüksek potansiyelli bir komplekstir. CIII'nin elektron transfer işlemi Q döngüsü ile gerçekleştirilir. Ubikinona aktarılan elektronlar mitokondriyal intermembran boşluğuna (IMS) salınır ve buradan bir mobil elektron taşıyıcısı olan sitokrom C kompleksine aktarılır (47, 50).

Kompleks IV (CIV: sitokrom-c oksidaz): CIV, H₂O oluşturmak için CIII' den aldığı elektronları terminal elektron alıcısı olan oksijene aktarır. Sitokrom C'de bir seferde toplam dört elektron aynı anda dioksijene bağlamak üzere transfer edilir ve sekiz proton salınır, bunların yarısı iki su molekülünü oluşturmak için kullanılır ve diğer dördü zar boyunca membranlar arası boşluğa pompalanır (51).

Kompleks 5 (CV: ATP Sentaz): CV, F₀ ve F₁ alt birimlerinden oluşmaktadır. ETS yoluyla membranlar arası boşluğa pompalanan protonlar F₀'dan geçer, oluşan elektrokimyasal gradyan F₁'e aktarılarak ATP sentaz'da yapısal bir değişikliğe neden olarak ATP sentezinin gerçekleştirilmesini sağlar (52).

Özetle; elektronlar elektron taşıma zincirinden geçtikçe serbest enerjilerinin çoğunu kaybederler. Bu esnada protonlar, mitokondri iç zarından, zarlar arası boşluğa pompalanır. Oluşan proton gradienti, mitokondriyal membran potansiyeli yaratır ve bu işlem kompleks 5'te ADP ve inorganik fosfattan (Pi) ATP üretimi ile sonuçlanır (53). ATP'ye dönüşmeyen serbest enerjinin geri kalanı, kalsiyum (Ca²⁺) taşınması ve ısı üretimi gibi amaçlar için kullanılabilir.

4.3 Mitokondriyal Aktivite Ölçümü

Hücre sel solunum ölçümü, oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi ve oksijen tüketimi arasındaki bağlantı nedeniyle enerji metabolizmasını değerlendirmek için kullanılan güçlü bir deneysel araçtır. Mitokondriyal solunumun yüksek hassasiyetli ölçümünü sağlayan mikrokatod oksijen elektrotları içeren çeşitli cihazlar mevcuttur (53). Bu cihazların en gelişmişlerinden biri olan Seahorse XF Metabolizma Ölçüm Cihazı, canlı hücrelerdeki iki büyük enerji yolağının (mitokondriyal solunum ve glikoliz) eşzamanlı olarak ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Ölçümler, cihaz için özel olarak geliştirilmiş hücre kültürü mikropalakalarına tek bir tabaka halinde ekilen hücrelerin 200 mikron üzerine kadar inen proplar ile gerçekleştirilir. Ortamdaki çözülmüş oksijen ve serbest proton (H⁺) konsantrasyonlarındaki değişimlerin ölçülmesinin ardından Oksijen Tüketim Oranı (OCR, pmol/dk) ve Ekstraselüler Asidifikasyon Oranı (ECAR, mpH/dk) hesaplanır. Oksijen Tüketim Oranı

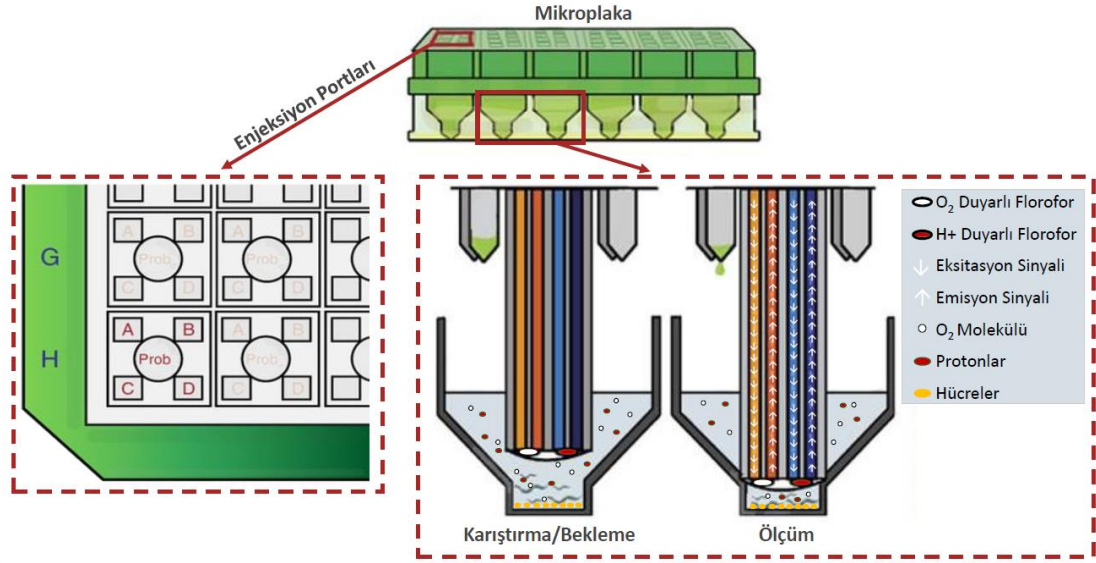
mitokondriyal solunumun göstergesi iken ECAR büyük ölçüde glikolizin göstergesidir.

Cihazın 3 modeli (XF, XFe ve XFp) mevcuttur. Her bir hücre kültürü mikropakası cihaz modeline göre 8, 24 veya 96 kuyucuktan oluşabilmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan XFe96 modeli Şekil 4.4'te görülmektedir.



Resim 4.4 Seahorse XFe96 Metabolizma Ölçüm Cihazı

Cihazın önemli özelliklerinden biri her kuyucuk için 4 enjeksiyon portunun bulunması ve bu portlara yüklenen substrat ya da ilaç gibi maddelerin ölçüm sırasında hücrelerin üzerine enjekte edilmesi ile hücre metabolizması üzerindeki etkilerinin test edilebilmesidir (Şekil 4.5) (54). Bu prensibe bağlı olarak, farklı ilaçlardan oluşan Mito Stres, Glikoliz Stres, Glikolitik Hız, Yakıt Esnekliği ve Enerji Fenotip Testi gibi testler geliştirilmiştir ve üretici tarafından kit halinde sağlanabilmektedir. Testler sonucunda tekrarlanabilir ve güvenilir verilerin elde edilebilmesi için 96 kuyucuklu mikropakaya ekilecek olan hücrelerin düzgün dağılmış ve yapışmış olması, hücre sayısının ve yapılacak teste bağlı olarak hücrelere enjekte edilecek ilaç dozlarının optimize edilmesi gerekmektedir (55).



Şekil 4.5 Seahorse Mikrolakası, Enjeksiyon Portları ve Çalışma Mekanizması

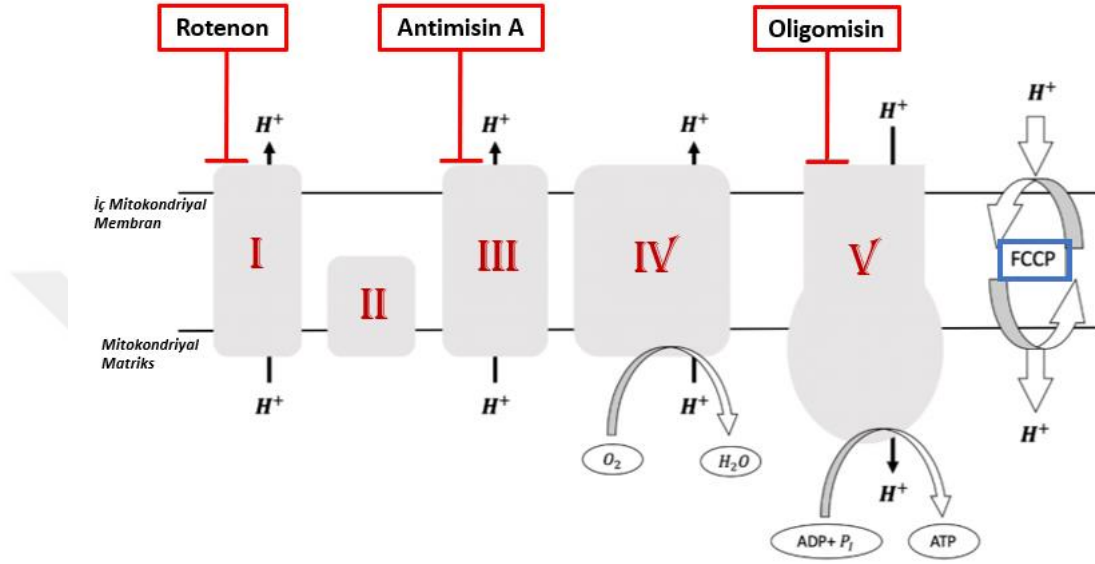
4.3.1 Mito Stres Testi

Seahorse XF Hücre Mito Stres Testi ile hücrelerin bazal solunum, ATP üretimi, proton kaçağı, maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesi gibi mitokondriyal fonksiyon parametreleri ölçülebilmektedir. Test sırasında, bazal durumdaki OCR ve ECAR değerlerinin ölçümünü takiben ortama sırasıyla oligomisin, karbonilsiyamid-p trifluorometoksifenilhidrazon (FCCP) ve Rotenon & Antimisin A karışımı enjekte edilmektedir.

Oligomisin ($C_{45}H_{74}O_{11}$), elektron transfer zincirindeki kompleks 5'in (ATP sentaz), proton kanalı olan F₀ alt ünitesini bloklamak için kullanılan, *Streptomyces* türündeki bakteriler tarafından üretilen bir çeşit antibiyotiktir (56, 57). ATP sentezinin oligomisin ile inhibe edilmesi, elektron taşıma zinciri boyunca elektron akışını ve dolayısıyla oksijen tüketimini önemli ölçüde azaltır. Ancak, proton kaçağı nedeniyle elektron akışı tamamen durmaz (4).

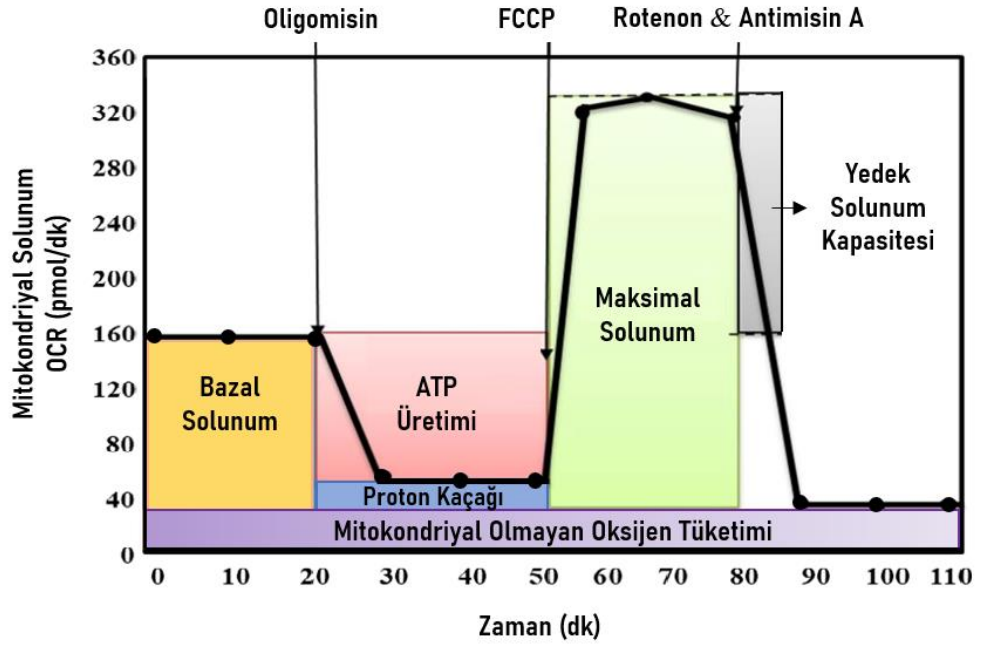
İkinci sırada enjekte edilen FCCP ($C_{10}H_5F_3N_4O$) ise mobil iyon taşıyıcısı olan bir iyonofordur. Hidrojen iyonlarını oksidatif fosforilasyon için enerji sağlanmaksızın mitokondriyal zar boyunca taşıyarak ATP sentezini bozar. Mitokondriyal aktiviteyi maksimuma çıkarmak için kullanılır, böylece tüketilen oksijen miktarı da maksimuma çıkmaktadır (58, 59). Fazlası toksik etki yaratırken yetersiz kullanımı hücrenin

maksimal solunum kapasitesinin olduğundan daha düşük olarak belirlenmesine neden olabilir. Bu nedenle kullanılan FCCP dozunun hücre tipi ve sayısına göre optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır (55).



Şekil 4.6 Mito Stres Testi için kullanılan ilaçların ETS üzerindeki etkileri.

Rotenon (C₂₃H₂₂O₆), ETS'deki kompleks I'in aktivitesini inhibe eden organik bir pestisit ve insektisittir (60). Elektronların kompleks I'deki Fe-S merkezlerinden ubikinona transferini engeller, böylece NADH'ın kullanılabilir hücresel enerjiye, yani ATP'ye dönüştürülmesini önler. Oksidatif strese ve nörodejenerasyona neden olabilir (61). Antimisin A ise, ETS'deki kompleks III'te elektronların sitokrom B'den sitokrom C'ye geçişini engelleyen bir antibiyotiktir (62). Bu inhibitörler, ölçüm sırasında mitokondriyal olmayan oksidazlardan kaynaklanan oksijen tüketimini belirlemek ve devre dışı bırakmak amacıyla deneyin sonunda hücrelere enjekte edilir, mitokondriyal elektron transferinin durmasına bağlı olarak oksijen tüketiminin düşmesi beklenir (63). Test sırasında tüm ilaçlar enjekte edildikten sonra ortaya çıkması beklenen örnek ölçüm grafiği şekil 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil 4.7 Mito Stres Testi Profili.

Bazal Solunum:

(İlk Enjeksiyondan Önceki Son Ölçüm - Mitokondriyal Olmayan Oksijen Tüketimi)

ATP üretimi ve proton kaçağı kombinasyonundan kaynaklanan oksijen tüketiminin bir ölçüsüdür. Normal koşullar altındaki enerji gereksinimini temsil eder. Kontrole kıyasla hastalığa sahip hastalarda rutin solunumdaki değişiklikler, değişen mitokondriyal fonksiyonu gösterebilir ve diğer mitokondriyal parametreler bağlamında yorumlanmalıdır(53).

ATP Üretimi:

(Oligomisin Enjeksiyonundan Önceki Son Ölçüm - Oligomisin Enjeksiyonundan Sonraki Minimum Ölçüm)

ATP sentaz inhibitörü Oligomisin'in enjeksiyonu ardından oksijen tüketim oranındaki azalma, tüketilen oksijenin ATP üretimi için kullanılan kısmını gösterir. Çoğunlukla hücrenin enerji gereksinimini yansıtırken substrat varlığına göre de değişebilir.

Proton Kaçağı:

(Oligomisin Enjeksiyonundan Sonraki Minimum Ölçüm - Mitokondriyal Olmayan Oksijen Tüketimi)

Oligomisin enjeksiyonundan sonra geriye kalan mitokondriyal solunum, proton sızıntısına bağlanabilir. Proton kaçağı, elektronların mitokondri iç zarından ATP sentazdan bağımsız olarak geçmesini ifade eder. Fizyolojik koşullar altında bir miktar proton kaçağı olması beklenirken, artan proton kaçağı mitokondriyal membran ve/veya ETS komplekslerindeki hasarın bir göstergesi olabilir(57, 64).

Maksimal Solunum:

(FCCP Enjeksiyonundan Sonraki Maksimum Ölçüm - Mitokondriyal Olmayan Oksijen Tüketimi)

Ortama FCCP eklenerek elde edilen maksimum oksijen tüketim oranıdır. FCCP, solunum zincirinin maksimum kapasitede çalışmasını teşvik ederek fizyolojik olarak artan enerji gereksinimini taklit eder. Böylece ortamdaki substratlar (şekerler, yağlar, amino asitler) yaşanan metabolik stresin üstesinden gelebilmek için hızlı bir şekilde okside olur ve hücrenin ihtiyaç durumunda ulaşabileceği maksimum solunum hızı belirlenir(57).

Yedek Solunum Kapasitesi:

(Maksimal Solunum – Bazal Solunum)

Maksimal solunum ile bazal solunum arasındaki fark, hücrenin enerjik strese yanıt verme yeteneğini ifade eden yedek solunum kapasitesini gösterir. Yedek solunum kapasitesindeki düşüş, hücrenin bir stres etkeni ile başa çıkma yeteneğini sınırlayarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanabilir. Ancak tüm biyoenerjetik ölçümlerde olduğu gibi, yedek solunum kapasitesini belirli bir model sistemi bağlamında yorumlamak önemlidir. Proton kaçağına bağlı solunumun artması, mitokondriyal hasarı (4) veya normal bir fizyolojik cevabı (64) yansıtabildiği gibi, yedek solunum kapasitesinin eksikliği de her zaman mitokondriyal işlev bozukluğunu göstermez (57).

Mitokondriyal Olmayan Solunum:

(Rotenon ve Antimisin A Enjeksiyonundan Sonraki Minimum Ölçüm)

Rotenon ve Antimisin A ilavesinden sonra oksijen tüketmeye devam eden hücresel enzimler nedeniyle devam eden oksijen tüketimidir. Mitokondriden kaynaklanmayan bu oksijen tüketiminin doğru bir şekilde ölçülerek diğer hesaplamalardan çıkarılması önemlidir (57).

4.4. Mononükleer Kan Hücrelerinde Mitokondriyal Aktivite Ölçümünün Literatürdeki Yeri

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu proinflamatuvar sinyal yollarını destekleyen veya hücre ölümüne neden olan bir dizi hücresel olayı başlatabildiğinden dolayı klinik olarak önemlidir (6). Yapılan son çalışmalar, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu kanser, diyabet, nörolojik veya kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patolojik durum ile ilişkilendirmiştir (6, 65). Ancak, ilgili hücresel modellerin eksikliği bu patolojilerin çalışmasını engellemekte, doku örnekleri ile çalışmak invaziv teknikler gerektirdiğinden zorlayıcı olmaktadır. Bu nedenle mononükleer kan hücreleri ve trombositler, erişilebilir mitokondri kaynakları olarak doku numunelerine önemli bir alternatif haline gelmiştir. Mononükleer hücre popülasyonunun vücuttaki sistemik değişiklikleri yansıttığı ve bu nedenle bir hassas biyobelirteç kaynağı olabileceği öne sürülmüştür (3, 66). Bu alanda gittikçe artan araştırmalar bu hücrelerin teşhis ve hastalık izleme endeksleri olarak kullanımı üzerine yoğunlaşmaktadır.

Örneğin Hartman ve arkadaşları (2014), Tip 2 diyabet hastalarının periferik kanlarından izole edilen mononükleer hücrelerde bazal ve maksimal solunum ölçümlerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (65).

Czajka ve arkadaşları, sağlıklı bireyleri, böbrek hastalığı olmayan diyabetli hastaları ve diyabetik nefropatili hastaları karşılaştıran bir kesitsel çalışmada mononükleer kan hücrelerini kullanmış ve normal şartlar altında, bazal mitokondriyal solunumun test edilen her üç grupta da benzer olduğunu ancak stres altında, diyabetik

nefropatili hastalardan elde edilen mononükleer hücrelerin azalmış aktivite sergilediğini bulmuştur (67).

Fazla kilolu veya şişman bireylerin mononükleer hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, daha yüksek yedek solunum kapasitesi daha yüksek performans, daha iyi kas ve kavrama gücü, daha fazla bacak kası ile ilişkili bulunmuş, IL-6 (İnterlökin-6) seviyesi ile yedek solunum kapasitesi arasında ters bir ilişki olduğu belirlenmiştir (2).

Farklı bir araştırmada, Kronik Yorgunluk Sendromu olan hastaların mononükleer kan hücrelerinde daha düşük bazal ve maksimal solunum saptanmış, bu hastalarda fizyolojik stres durumunda mitokondrinin hücrel enerji taleplerini yeterince yerine getiremediği belirlenmiştir (68).

Anoreksiya hastası olan 15 genç kadın ve 20 sağlıklı kontrol ile periferik kan mononükleer hücrelerinde aşırı kalori kısıtlamasının neden olduğu metabolik ve moleküler adaptasyonları belirlemek için yapılan bir çalışmada, Anoreksiya Nervoza (AN) hastası olan bireylere ait hücrelerin mitokondriyal solunum ve glikolizlerinin daha düşük olduğu, maksimal solunum anlamlı olarak değişmese de bazal solunum ve ATP üretiminin düştüğü belirlenmiştir. Hücrelerin metabolik olarak daha az aktif olmaları, kalori kısıtlamasının hücrel metabolik modülasyonda rol oynayabileceğini göstermiş ve bu düşüklüğün AN hastalarını karakterize eden antiinflamatuvar durum ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (69).

Farklı bir çalışmada, 25(OH)D seviyelerindeki mevsimsel artış sistemik inflamasyonda, mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktivitesinde ve vücudun genel enerji metabolizmasında azalma ile ilişkilendirilmiştir. Mononükleer hücrelerin mitokondriyal aktivitesindeki değişimlerin kış ayında 25(OH)D seviyeleri düşük olan bireylerde daha belirgin olduğu ifade edilmiştir(70).

Zeng ve arkadaşlarının yaptıkları hayvan çalışmasında, mononükleer kan hücrelerinin metabolik aktivitelerini dolaşımdaki besin ve hormonların etkisi ile çok kısa bir süre içinde değiştirebildikleri ve adipoz doku ile benzer yanıt verdikleri gösterilmiştir. Mononükleer kan hücrelerinin metabolizmasının, postprandiyal

değişimler sırasında, bir bireyin tüm vücut metabolik durumunu değerlendirmek için kullanılabilmesi ifade edilmiştir (71).

Bu örnek çalışmalarda olduğu gibi literatürde mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktivitesini bireylerin beslenme ve sağlık durumları ile ilişkilendiren birçok çalışma bulunmakta, bu alandaki çalışmalar hızla artmaya devam etmektedir.

4.4.1. Biyoenerjetik Sağlık İndeksi

Mitokondriyal fonksiyondaki bozukluklar birçok hastalık ile ilişkilendirildikten sonra, biyoenerjetik sağlığı değerlendirmede kullanılacak belirteçlere olan ihtiyaç artmıştır. Biyoenerjetik Sağlık İndeksi, 2014 yılında bireylerin mitokondriyal fonksiyonunu zaman içinde izlemek ve karşılaştırma yapabilmek amacıyla geliştirilmiştir (3). Bu indeks hesaplanırken Mito Stres Testi ile ölçülebilen önemli parametreler kullanılmaktadır ve formülü aşağıdaki gibidir:

$$\text{Biyoenerjetik Sağlık İndeksi} = \log \frac{(\text{Yedek Solunum Kapasitesi})^a \times (\text{ATP Üretimi})^b}{(\text{Mitokondriyal Olmayan Solunum})^c \times (\text{Proton Kaçağı})^d}$$

Yapılan deneylerde mononükleer kan hücrelerinin test sonuçları kullanılarak hesaplanan bu indeksin oksidatif strese bağlı mitokondriyal hasarı yansıtmakta oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir (72, 73). Bu indeksin, bireyselleştirilmiş tıp alanında tanı amaçlı kullanılmak için önemli bir potansiyele sahip olduğu ancak çeşitli patolojik durumlardaki değişiminin daha fazla çalışma ile doğrulanmasına ihtiyaç olduğu ifade edilmektedir (3).

4.5. Açlık Fizyolojisi ve Aralıklı Oruç Uygulamaları

İnsan yaşamının sağlıklı bir şekilde devam ettirilebilmesi için vücudun ihtiyaç duyduğu enerji ve besin öğelerinin yeterli ve dengeli bir şekilde sağlanması gereklidir. Aksi takdirde açlık (besin yetersizliği) tabloları ortaya çıkar (74).

Normal bir insanda günlük enerji harcamasının %60-70'ini bazal metabolizma oluşturur(75). Vücuda besin alınmamasıyla oluşan metabolizmanın açlık durumunda kan şekeri düzeyini 70-100 mg/dL arasında tutmak için gereken enerji vücuttaki enerji depolarından sağlanır. Enerji; glikojen, mobilize edilebilen protein ve yağ olarak depolanabilir. Açlık durumunda ilk kullanılan kaynak glikojen depolarıdır ve sağlıklı bireylerde glikojen depoları bir günlük enerji ihtiyacını karşılayabilir(76).

Yemekten 2-3 saat sonra başlayan erken açlık fazında kan glukoz seviyesinin düşmesi ile serum insülin düzeyi azalırken glukagon salgısı artar. Glukagon, ana hedef organı olan karaciğerde glikojen sentaz inhibisyonuna yol açan siklik AMP (cAMP) üretimini tetikleyerek glikojen sentezini inhibe eder ve glikojenolizi uyarır. Piruvat üretimini ve asetil CoA karboksilaz aktivitesini azaltarak yağ asidi sentezini engeller (76, 77).

Glikojen depoları tükendiğinde, lipolitik etki gösteren glukagon trigliseritlerin yağ asitleri ve gliserole dönüşümünü hızlandırır. β oksidasyonu ile asetil-CoA'ya dönüşen yağ asitleri Krebs döngüsüne girerek vücuda enerji sağlar. Gliserol ise karaciğerde glikoneojenez yolu ile glikoza dönüşür. Uzun süreli açlıkta artan β oksidasyonuna bağlı olarak meydana gelen asetil-Coa, karaciğerde keton cisimlerine çevrilerek, başta beyin olmak üzere diğer dokular tarafından kullanılmak üzere kana verilir (78).

Açlığın devam etmesi durumunda kaslar yıkılarak glikoneojenez ile aminoasitlerden enerji sağlanır. Vücut bu şekilde depolarını kullanarak, besin alımı olmadan 3 aya kadar hayatta kalabilir (77).

Uzun süreli açlıklar ciddi sağlık sorunlarına yol açarak yaşamı tehlikeye sokabilirken açlığın, özellikle aralıklı açlığın (Intermittent Fasting) etkileri, son yıllarda ümit verici sonuçlar ortaya koymuştur.

Oruç, tüm yiyeceklerden kısmi veya tamamen uzak durma ya da yasak yiyeceklerden seçilen bir süre uzak durma olarak tanımlanmaktadır(79). Sağlığın iyileştirilmesi ve uzun ömürlülüğün artırılması için olası bir farmakolojik olmayan müdahale olarak, çok sayıda bilimsel araştırmaya konu olmuştur. Birçok aralıklı oruç modeli olmasına rağmen en çok incelenen üçü; dönüşümlü açlık, zaman kısıtlı beslenme ve dini oruçlardır. Dönüşümlü açlık; besinlerin süre kısıtlaması olmaksızın

istenildiği kadar olarak tüketildiği beslenme günleri ile bireylerin enerji ihtiyaçlarının %25'ini tükettiği açlık günlerinden oluşan diyet modelidir. En fazla bilinen dönüşümlü açlık uygulamalarından biri 5:2 modelidir. Zaman kısıtlı beslenme ise, besin alımının her gün 8 saat veya daha az bir zaman dilimi ile kısıtlandığı beslenme düzenini ifade etmekte, 16:8 Modeli olarak da adlandırılmaktadır (80, 81). Dini oruçlar ise; başta Ramazan orucu olmak üzere hem manevi hem de fiziksel faydalar için pek çok dinde bulunan uygulamalardır (80).

Yapılan çalışmalarda aralıklı açlık, obezite, kardiyovasküler sağlık (kan basıncı), diyabet (insülin ve glukoz seviyeleri), oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkili biyobelirteçlerin seviyelerinde iyileşme ve uzayan yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir (82-84). Ancak sağlık çıktıları uygulanan aralıklı açlık modeline ve deney grubuna göre farklılık göstermektedir.

4.5.1 Ramazan Orucu ve Etkileri

Günümüzde yetişkin bireyler dini veya tıbbi nedenlerle dönemsel olarak oruç tutmaktadır (85). Dini nedenlerle tutulan oruçlar arasında en yaygın olarak bilineni her yıl birçok Müslüman tarafından hicri takvime göre Ramazan ayında tutulan ve gün doğumundan gün batımına kadar besin ve sıvı alımından kaçınılan Ramazan orucudur (86).

Ramazan orucu insan organizması üzerinde açlık ve susuzluğun, beslenme, egzersiz ve uyku düzenindeki değişimlerin etkilerini araştırmak için iyi bir modeldir. Oruç tutan bireyler mevcut alışkanlıklarından uzaklaşmakta, tükettikleri besin miktarları, öğün sıklıkları, besin tercihleri, uyku ve fiziksel aktivite durumları değişmektedir. Türkiye'de oruç süresi mevsimine göre 17-18 saate kadar uzayabilmekte, oruç tutulan günlerde genellikle iftar ve sahur olmak üzere 2 ana öğün tüketilmektedir (87). Yaygın uygulama iftarda büyük bir öğün, sahurda daha hafif bir öğün yemek şeklindedir. İki ana öğün arasında ara öğün yapan bireyler de mevcuttur (88).

Ramazan orucunda enerji kısıtlaması gibi bir şart olmamasına rağmen beslenme düzeni ve yaşam biçimindeki değişiklikler sonucu bireylerin antropometrik

ölçümlerinde ve kan şekeri, lipit profili gibi bazı biyokimyasal parametrelerinde değişiklikler gözlenebilmektedir (80, 87-90).

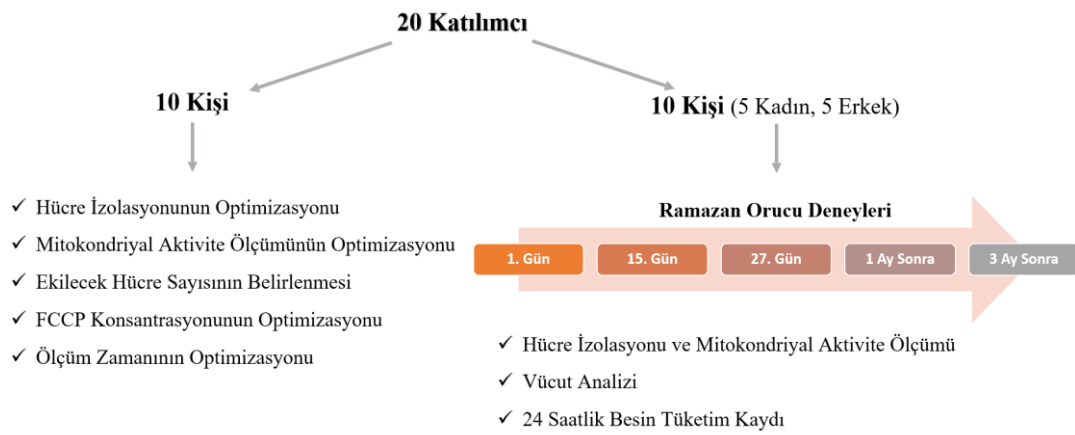
Birçok çalışmada Ramazan sürecinde vücut ağırlığının anlamlı olarak azaldığı belirlenmiş ancak bu dönemde kaybedilen vücut ağırlığının, beslenme düzeninin eski haline dönmesinden kısa bir süre sonra tekrar kazanılma eğiliminde olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalardaki oruç sürelerinin dünya üzerinde yaşanan coğrafi konuma ve mevsime göre değişiklik göstermesi, örneklemeler arasında genetik ve kültürel farklılıklar olması kontrolün yeterince sağlanamamasına neden olmaktadır (81).



5. MATERYAL VE METOT

5.1 Çalışmanın Tasarımı, Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi

Bu tez çalışması, gönüllü olarak deneylerde yer almayı kabul eden 18-30 yaş aralığındaki 20 sağlıklı birey ile İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde (REMER) gerçekleştirilmiştir. Bireyler sözlü ve yazılı olarak çalışma hakkında bilgilendirilerek onam formu imzalatılmıştır. Ramazan orucunun metabolik etkilerini değerlendirmek için bu katılımcılardan 10'u (5 kadın 5 erkek) Ramazan ayı boyunca düzenli olarak oruç tutan, alkol ve sigara kullanmayan, herhangi bir hastalığı bulunmayan bireyler arasından seçilmiştir. Bu çalışmanın yapılabilmesi için; İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 10840098-604.01.01-E.15416 Sayı, 366 Karar No ile izin alınmıştır. Çalışmanın akışı Şekil 5.1'de özetlenmiştir.



Şekil 5.1 Çalışmanın akış şeması.

Ramazan ayının öncesinde, tez çalışmasının ilk aşamasında mononükleer kan hücrelerinin izolasyonunun ve metabolik aktivite ölçümlerinin doğru bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için optimizasyon deneyleri yapılmış, uygun protokoller geliştirilmiştir.

Araştırmanın ikinci kısmında ise, oruç tutan bireylerde açlığın antropometrik ölçümler, beslenme durumu ve mitokondriyal aktivite parametreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle çalışmada 2019 yılı Ramazan ayı

sırasında ve sonrasında veri toplanmıştır. Ramazan ayı miladi takvime göre 6 Mayıs 2019 tarihinde başlamış, 3 Haziran 2019 tarihinde sona ermiştir. 29 gün süren bu dönemde en uzun oruç süresi 17 saat 7 dakika, en kısa oruç süresi ise 16 saat 3 dakika olmuştur. Ramazan ayının 1. (R1), 15. (R15), 27. (RSon) günlerinde ve Ramazan sonrası 1. (RS-1) ve 3. ayda (RS-3) bireylerin vücut ağırlığı ve kompozisyonu gibi antropometrik ölçümleri, 24 saatlik geriye dönük besin tüketim kayıtları ve mitokondriyal aktivite ölçümlerini gerçekleştirmek amacıyla 12 saatlik açlık kanları (8'er ml) alınmıştır. Erkek katılımcılardan biri Ramazan sonrasında kendi isteğiyle çalışmadan ayrılmış, bu nedenle bulgular bölümünde 5 kadın, 4 erkek toplam 9 katılımcının verileri sunulmuştur.

5.2 Antropometrik Ölçümler

Çalışmanın Ramazan orucu kısmına dahil edilen bireylerin boy uzunluğu, vücut ağırlığı, Beden Kütle İndeksi (BKİ), vücut kas oranı (kg) ve vücut yağ oranı (kg ve %) gibi antropometrik ölçümlerinin zamana göre değişimleri incelenmiştir. Bu ölçümler, yağsız doku kütlesi ile yağın elektriksel geçirgenlik farkına dayalı bir yöntem olan Biyoelektrik İmpedans Analizi cihazı InBody J10 ile gerçekleştirilmiştir. Katılımcılardan ölçümlerin 24-48 saat öncesinde ağır fiziksel aktivite yapılmaması, ölçüm sırasında vücuda temas eden metal eşyaların (yüzük, saat, gözlük, bileklik, vb.) çıkarılması istenmiş ve çıplak ayakla ölçüm yapılmıştır. Beden Kütle İndeksi değerleri bireylerin vücut ağırlığının (kg), boy uzunluklarının karesine (m²) bölünmesi ile hesaplanmıştır (91). Antropometrik ölçümler, kan alınan her deney gününde veya deney gününü takip eden gün içinde tekrarlanmıştır.

5.3 Besin Tüketim Kayıtları

Bireylerin Ramazan dönemine göre değişen besin tüketim durumlarının saptanması, enerji ve besin ögesi alımlarının değerlendirilmesi için deneylerin yapıldığı günlerde (R1, R15, RSon, RS-1 ve RS-3) 24 saatlik geriye dönük besin tüketim kayıtları alınmıştır. Bireylerin son 24 saatlik süre içerisinde (sahur, iftar, iftar ile sahur arası veya Ramazan dışındaki ana ve ara öğünler) tükettikleri tüm besin ve içecekleri kendilerine verilen formlara tür ve miktar belirterek ayrıntılı bir şekilde

kaydetmeleri sağlanmıştır. Alınan besin tüketim kayıtları Beslenme Bilgi Sistemi (BEBİS) programı kullanılarak analiz edilmiş, günlük alınan enerji ve besin öğeleri alım miktarları hesaplanmıştır (92). Kayıtlar kendi arasında ve Ramazan dönemi (3 kayıt) ile Ramazan dışı (2 kayıt) şeklinde ayrılarak karşılaştırılmıştır.

5.4 Kan Alımları

Optimizasyon deneyleri için çalışmaya katılan bireylerin ilk 10 kişilik kısmından çeşitli zamanlarda ve Ramazan orucunun etkilerini belirlemek için seçilen 10 kişilik gruptan Ramazan ayı sırasında 3, dışında 2 toplamda 5 kez 8 mililitre (ml) kadar periferik kan alınmıştır. Hemşire tarafından alınan kanların 5 ml'si mononükleer hücre izolasyonunda kullanılmak üzere antikoagülanlı (EDTA) vakumlu kan tüplerine, 3 ml'si ise vakumlu serum tüplerine konulmuştur.

5.5 Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

5.5.1 Percoll Çözeltilisinin Hazırlanması ve Optimizasyonu

Yapılan çalışmalarda mononükleer hücre izolasyonu için birçok farklı dansite gradient yöntemi ve çözeltisi (Ficoll, Histopaque, Lymphoprep gibi.) kullanılmaktadır (93, 94). Mononükleer hücre izolasyonu için kullanılan bu ticari gradient çözeltilerinin ortak noktası, yoğunluklarının 1,077 g/ml olmasıdır. Bu tez çalışmasında mitokondriyal aktivite ölçümleri yapılacağından dolayı mononükleer hücre izolasyonu için literatürde kan hücre metabolizmasını daha az etkilediği belirtilen Percoll çözeltisinin kullanılması hedeflenmiştir (6).

Percoll, ilk olarak Pertoft ve arkadaşları tarafından daha verimli yoğunluk ayırımı için kullanılmak üzere formüle edilen bir üründür (95). Polivinilpirrolidon (PVP) ile kaplanmış, 15-30 nm çapındaki koloidal silika parçacıklarından oluşur. Hücre, organel veya virüslerin izolasyonu için kullanılabilen Percoll, yoğunluk gradient deneyleri için çok uygundur çünkü alternatiflere kıyasla düşük ozmolarite (<25 mOsm/kg H₂O) ve viskoziteye sahiptir. Hücre ve hücresel bileşenler üzerinde toksik etkisi bulunmamaktadır (96, 97).

Ticari olarak satılan Percoll çözeltilerinin yoğunluğu 1,130-1,135 g/ml arasında değişmektedir (96). Çalışmada yoğunluğu $1,130 \pm 0,005$ g/ml olan bir Percoll (Sigma) kullanılmıştır. Kandan mononükleer hücre izolasyonu yapabilmek için yoğunluğu 1,077 g/ml olacak şekilde izotonik Percoll çözeltisi hazırlanmalıdır. Deneylerde kullanılacak olan çözeltiyi hazırlamak için, Percoll öncelikle 9'a 1 oranında 1,5 M NaCl çözeltisi ile seyreltilir. Hazırlanan bu Stok İzotonik Percoll (SİP) daha sonra istenen yoğunluğa göre fizyolojik tampon çözeltilerle (0,15 M NaCl) seyreltilerek izolasyona hazır hale getirilir.

Hedeflenen 1,077 g/ml yoğunluğuna ulaşmak için kullanılacak 0,15 M NaCl miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

$$\text{Kullanılacak } 0,15 \text{ M NaCl Miktarı (ml)} = \text{SİP Miktarı (ml)} \times \frac{\text{SİP'in Yoğunluğu} - \text{İstenen Yoğunluk}}{\text{İstenen Yoğunluk} - 0,15 \text{ M NaCl'nin Yoğunluğu}}$$

$$= \text{SİP Miktarı (ml)} \times \frac{(1,123 \text{ g/ml}) - (1,077 \text{ g/ml})}{(1,077 \text{ g/ml}) - (1,0046 \text{ g/ml})}$$

Yapılan denemeler sonucunda her 5 ml'lik kan örneği için 1,5 ml SİP (1350 µl Percoll+150 µl 1,5 M NaCl çözeltisi) kullanılarak hazırlanan Percoll çözeltisinin (1,077 g/ml) yeterli olduğu belirlenmiş, daha fazla Percoll kullanıldığında ayrılmanın düzgün olarak gerçekleşmediği gözlenmiştir. 1,5 ml SİP'i 1,077 g/ml yoğunluğuna getirmek için:

$$\text{Gereken } 0,15 \text{ M NaCl miktarı} = 1,5 \times \frac{1,123 - 1,077}{1,077 - 1,0046} = 0,953 \text{ ml} = 953 \text{ µl'dir.}$$

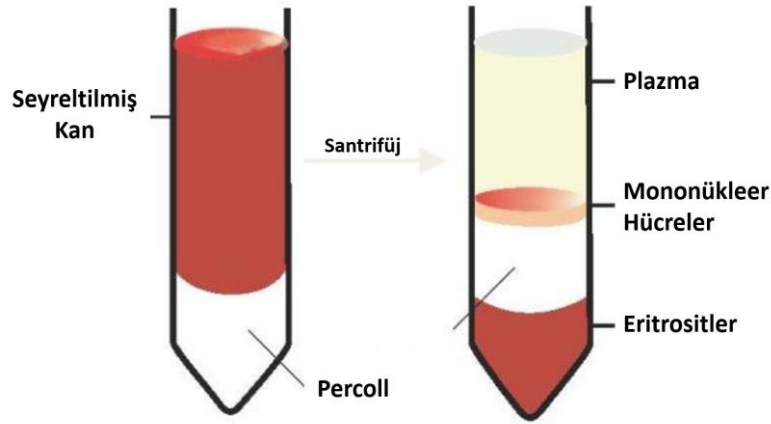
Her bir kan örneği için 1,5 ml SİP üzerine 953 µl 0,15 M NaCl çözeltisi eklendiğinde Percoll çözeltisi mononükleer hücre izolasyonu için kullanıma hazır hale gelmektedir.

5.5.2 Mononükleer Hücre İzolasyon Protokolü

Kullanılacak Percoll formülü belirlendikten sonra, santrifüj hızı ve sıcaklığı için de optimizasyon deneyleri yapılmış ve mononükleer kan hücrelerinin izolasyonu için

aşağıdaki protokol geliştirilmiştir. Tez çalışmasının tüm deneylerinde hücreler bu protokole göre izole edilmiştir.

- İzolasyon yapılacak her bir kan örneği için (4-5 ml) 15 mililitrelik steril santrifüj tüpünde 2,453 ml Percoll çözeltisi (1350 µl Percoll + 150 µl 1,5 M NaCl + 953 µl 0,15 M NaCl) hazırlanır.
- EDTA'lı tüplere alınan kanlar (4-5 ml) farklı 15 mililitrelik santrifüj tüplerine alınarak üzerlerine 4 ml 1X Hank'ın Dengeli Tuz Solüsyonu (Hank's Balanced Salt Solution-HBSS) eklenir.
- Seyreltilmiş 4-5 ml kan (toplam 8-9 ml) serolojik pipetle çekilerek 2,453 ml Percoll çözeltisi bulunan tüpün kenarından yavaşça sızdırılır ve iki sıvının (Percoll çözeltisi-seyreltilmiş kan) birbirine karışmadan tabakalandırılması sağlanır.
- Tüpler dikkatlice ve dengeli bir şekilde 18°C'deki santrifüje yerleştirilerek 400xg'de 30 dakika boyunca santrifüj edilir.



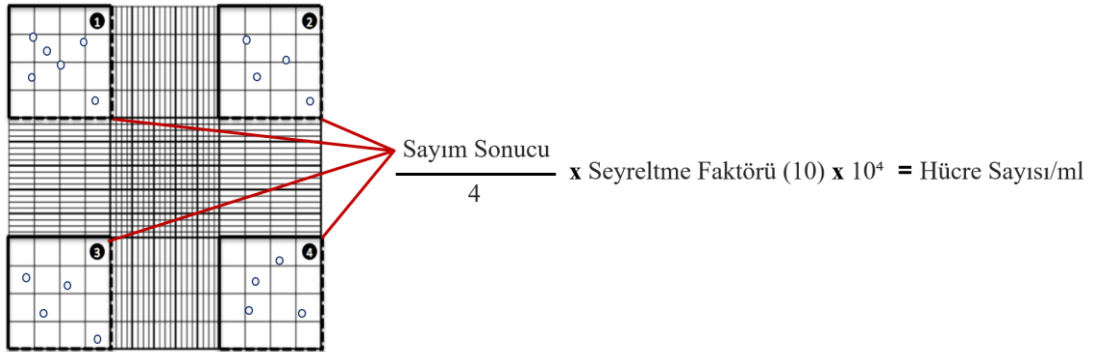
Şekil 5.2 Percoll ile Mononükleer Kan Hücresi İzolasyonu

- Santrifüj sonunda mononükleer hücrelerin Percoll ile yoğunluk gradientine göre ayrıldığı; en altta eritrosit çökteltisi, çöktelinin üzerinde percoll tabakası, en üstte plazma tabakası ve percoll ile en üst tabaka arasında ise bulut şeklindeki mononükleer hücre tabakasının olduğu görülür (Şekil 5.2).

- Plazmanın mononükleer hücre bulutuna kadar olan kısmı tabakaların birbirine karışmamasına dikkat edilerek serolojik pipet ile çekilip atılır.
- Halka şeklinde görünen tabakadaki mononükleer hücreler 1 ml'lik pipet ile toplanarak yeni bir santrifüj tüpüne alınır.
- Yeni tüpe alınan hücrelerin üzerine 8 ml 5 mM glikoz içeren 1X HBSS eklenir ve 200xg'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama yapılır. Santrifüj sonrasında tüpün dip kısmında hücrelerin toplandığı görülür. Hücre kaybetmemeye dikkat edilerek tüpteki HBSS çekilip atılır ve hücrelerin üzerine bir kez daha 8 ml HBSS eklenerek yıkama işlemi tekrarlanır.
- Son yıkamanın ardından HBSS tüpten uzaklaştırıldıktan sonra hücreler %1 Penisilin Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren RPMI 1640 besiyerinin içine alınarak deneye göre hücre sayımı ve ekimi yapılır.

5.5.3 Tripan Mavisi ile Canlılık İncelenmesi ve Hücre Sayımı

Tez çalışması sürecindeki tüm hücre sayımları için tripan mavisi ile boyama tekniği kullanılmıştır (98). Süspansiyon haldeki hücrelerden 5 µl alınarak küçük santrifüj tüpüne koyulan 45 µl tripan mavisi solüsyonuna eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan 1:10 oranında seyreltilmiş hücre+boya karışımının 10 µl'si Neubauer Hemositometresi'ne yüklenmiş ve ışık mikroskobu altında 10X büyütmede canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde ölü hücreler mavi, canlı hücreler parlak beyaz görünmektedir. Şekil 5.3'te gösterildiği gibi mikroskop altında görülen büyük karelerden oluşan 4 alandaki parlak hücreler sayılmış ve formüle göre 1 mililitre süspansiyondaki hücre sayısı hesaplanmıştır (99).



Şekil 5.3 Hemositometre ile hücre sayımı ve hesaplama formülü.

5.6 Flow Sitometri Analizi

Flow Sitometri, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilen akışkanın içindeki hücre veya partiküllerin karakteristiklerinin ölçülmesidir. Hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri analiz edilebilir (100). Percoll ile gerçekleştirilen mononükleer hücre izolasyonunun niteliğini ve elde edilen hücre oranlarını belirlemek için 2 farklı kişiden 5 ml kan alınarak mononükleer hücre izolasyonu gerçekleştirilmiş, son aşamada hücreler besiyeri yerine Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) ile süspanse edilerek Flow Sitometri cihazına özel tüplere alınmıştır. Cihaz sorumlusu hücrelerin granülarite ve büyüklüklerine göre analizlerini yaparak örneklerdeki lenfosit, monosit oranlarını belirlemiştir.

5.7 Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile Mito Stres Testi

Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı ile yapılan optimizasyonlar, Ramazan sırası ve sonrasındaki deneyler için aşağıda açıklanan Mito Stres testi protokolü uygulanmıştır.

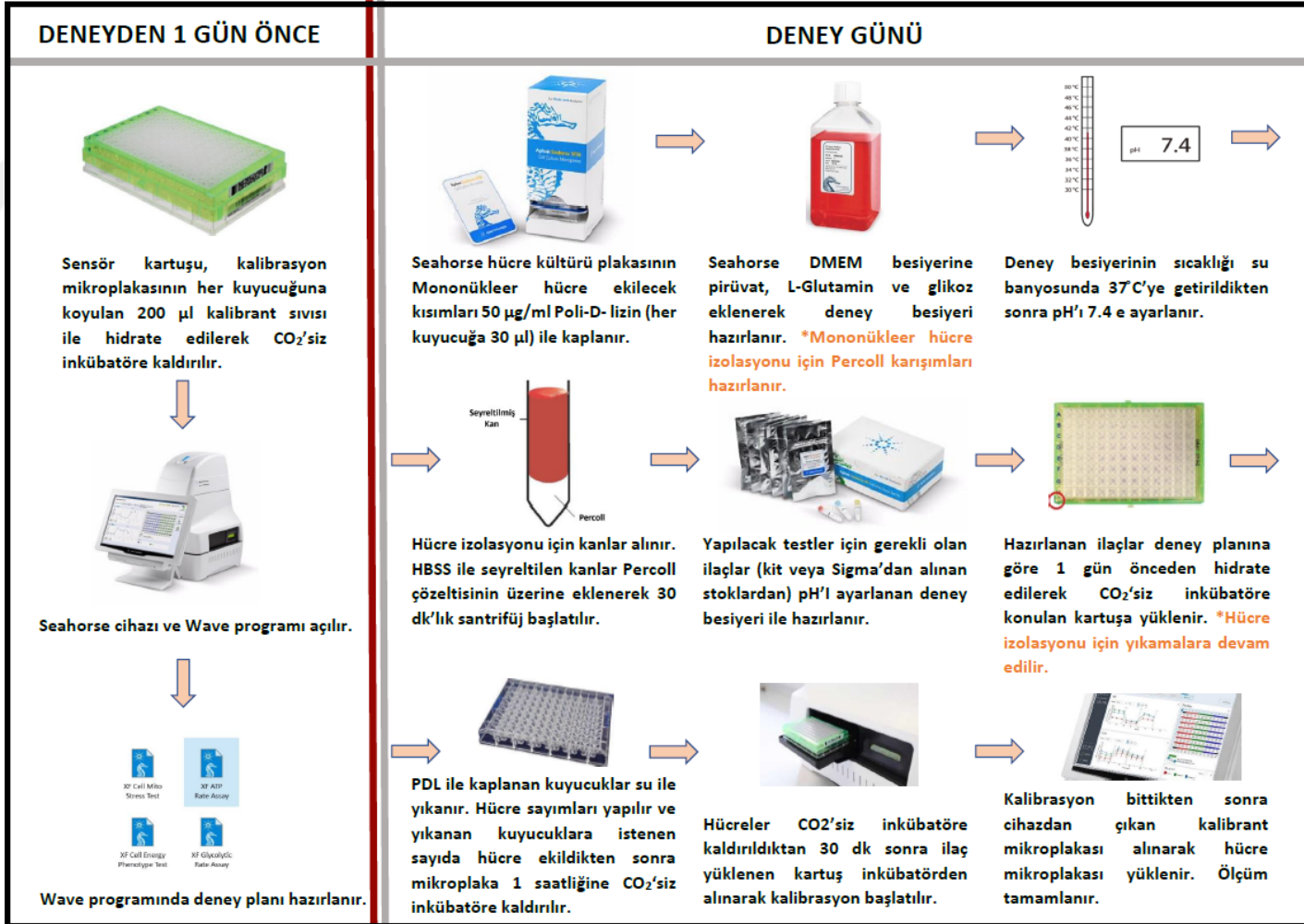
- **Deneyden 1 gün önce**, yeşil sensör kartuşu ve kalibrasyon mikropakası paketinden çıkarılarak 96 kuyucuklu mikropakanın her bir kuyucuğuna 200 µl kalibrant adı verilen, üretici tarafından sağlanan sıvı çözelti koyulmuştur. Sensör kartuşu uçları tamamen sıvının içinde kalacak şekilde kalibrasyon mikropakasının içine yerleştirilmiştir. Hazırlanan kartuş ve mikropaka ikilisi 1 gece beklemek üzere 37°C'deki CO₂'siz inkübatöre kaldırılmıştır.
- Metabolizma Ölçüm Cihazı açılmış, cihaz ile yapılan deneyler için özel olarak geliştirilmiş olan Wave programı ile deney planı oluşturulmuştur. Sıcaklığının 37°C'de sabitlenmesi için cihaz 1 gece çalışır halde bırakılmıştır.
- **Deney günü**, ilk olarak steril hücre kültürü mikropakasının her kuyucuğuna 30 µl Poli-D-Lizin (PDL) çözeltisi (50 µg/ml) eklenerek kaplama yapılmıştır.
- Mito Stres Testi için kullanılacak deney besiyeri 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınan Seahorse XF DMEM bazlı besiyerine istenen yoğunlukları sağlayacak şekilde Pirüvat (1 mM), L-Glutamin (2 mM) ve glikoz (10 mM) eklenerek

hazırlanmıştır. Deney besiyerinin 37 C'ye gelmesi için tüp su banyosuna yerleştirilmiştir.

- Mononükleer hücre izolasyonu yapılacak her bir kan örneği için ayrı 15 ml'lik santrifüj tüplerinde Percoll çözeltilisi hazırlanmış ve hücre izolasyonlarına başlanmıştır.
- İzolasyonun 30 dakikalık santrifüj aşamasında su banyosunda 37 C'ye ısıtılan besiyerinin pH'ı pHmetre (HannaLab) ile ölçülmüş ve ölçüm sonucuna göre NaOH veya HCl kullanılarak 7.4'e ayarlanmıştır.
- Hücre izolasyonlarına devam edilirken yapılacak testler için gerekli olan ilaçlar (Oligomisin, FCCP, Rotenon&Antimisin A) pH'ı ayarlanan deney besiyeri ile istenen dozlarda (hücrelere verilmesi hedeflenen dozun 10 katı daha yoğun olacak şekilde) hazırlanmıştır. Ramazan orucunun etkilerinin değerlendirildiği deneylerde Oligomisin 5 µM, FCCP 1 µM, Rotenon&Antimisin A ise 5 µM (Hazırlanan dozlar sırasıyla: 50 µM, 10 µM ve 50 µM) olacak şekilde kullanılmıştır.
- Hazırlanan ilaçlar deney planına göre 1 gün önceden hidrate edilerek CO₂'siz inkübatöre koyulan kartuşun portlarına sırasıyla ve uygun miktarlarda (**A:** Oligomycin→20 µl, **B:** FCCP→ 22 µl, **C:** Rotenon&Antimisin A → 25 µl) yüklenmiştir. Kapağı kapatılan kartuş ilaçların ışıktan etkilenmemesi için karanlık bir çekmeceye kaldırılmıştır.
- PDL ile kaplanan hücre kültürü mikropalakasının kuyucukları steril su ile yıkanmış, kuruması için kapağı yarı açık bir şekilde hücre kültürü kabininin içine bırakılmıştır.
- Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra tüplerin içine eklenen RPMI 1640 besiyerinin içinde inkübatörde bekletilen hücreler (ilaçların yüklenmesi sırasında hücreler 1 saat inkübatörde beklemiştir) çıkartılarak 400xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş, besiyerleri pH'ı 7.4'e ayarlanmış olan deney besiyeri (her tüp için 1 ml) ile değiştirilmiştir.
- Sayımlar için her tüpten 5 µl hücre süspansiyonu alınarak tripan mavisi çözeltileri hazırlanmış ve her bir kişiden alınan kanlardan izole edilen hücre sayıları hesaplanmıştır.

- Hesaplamalar yapıldıktan sonra her bir örnekten izole edilen hücreler kaplaması yıkanıp kurutulmuş olan hücre kültürü mikropkalarına deney planına göre 180 µl deney besiyeri içinde istenen sayıda hücre olacak şekilde (optimizasyon deneylerinde 100,000-150,000-200,000-300,000-400,000, sonraki deneylerde 300,000 hücre/kuyucuk) ekilmiştir. A1, A12, H1, H12 kuyucuklarına hücre ekilmeyip, arkaplan sinyalinin hesaplanabilmesi için yalnızca 180 µl deney besiyeri koyulmuştur. Hücre ekimleri tamamlanan mikropkaya 1 saat beklemek üzere CO₂'siz inkübatöre kaldırılmıştır.
- Hücrelerin ekildiği mikropkaya ile birlikte çekmeceye bekleyen ilaçların yüklenmiş olduğu kartuş da tekrar CO₂'siz inkübatöre konulmuş, 30 dakika sonra Metabolizma Ölçüm Cihazı'nın kalibrasyonu başlatıldığında inkübatörden alınarak cihaza yüklenmiştir.
- Cihazın kalibrasyonu tamamlandığında sensör kartuşu cihazın içinde kalırken kalibrant sıvısı bulunan mikropkaya dışarıya çıkmaktadır. Bu aşamada kalibrasyon mikropkaya 1 saat CO₂'siz inkübatörde bekleyen hücre kültürü plakası ile değiştirilmiş, ölçüm başlatılmıştır.
- 3'er dakikalık karıştırma, 3'er dakikalık ölçüm şeklinde tasarlanan test, 2 saat sonra sona ermiş, kartuş ve hücre kültürü mikropkaya cihazdan çıkartılarak ölçüm sonlandırılmıştır.
- Sonuçların görüntülenmesi ve analizi için Wave 2.6 programı kullanılmış, bulgular bölümünde 300.000 hücreye ait OCR değerleri sunulmuştur.

Deney planının özet akış şeması Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4 Mitokondriyal aktivite ölçümü için deney akış planı.

5.8 Ölçüm Zamanının Optimizasyonu

Yapılan deney planı kapsamında Ramazan sırası ve sonrasındaki deneylerde Metabolizma Cihazı ile ölçüm yapılacak günlerde 10-12 kişiden mononükleer hücre izolasyonu yapılırken eş zamanlı olarak test besiyeri ve ilaçlarının da hazırlanmasının zorlayıcı olacağı, hücre sayımları yapılırken kartuşa yüklenen ilaçların bekleme sürelerinin artmasının testin doğru çalışması açısından risk oluşturacağı öngörülmüştür. Bu nedenle literatürde de cevabı belirsiz olduğundan hücrelerin testin yapılacağı günden bir gün önce izole edilerek inkübatörde bekletilmesinin test sonuçlarını nasıl etkileyeceği belirlenmek istenmiştir. Bu amaçla 2 farklı bireyden ölçümden 24, 18, 12 saat önce 5'er ml kan alınmış, mononükleer hücreler izole edilerek ekim yapılana kadar RPMI besiyerinin içinde inkübatörde bekletilmiştir. Ölçüm gününün sabahında da son kez 5'er ml kan alınarak hücre izolasyonu yapılmış, 6 saatin sonunda yeni izole edilen ve bir gün önceden tüplerin içine alınarak inkübatörde bekletilen hücreler sayılarak hücre kültürü mikropalakasına ekilmiştir. Mito Stres Testi uygulanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

5.9 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Windows ortamında SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 18.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı değerler ortalama ve standart sapma, kategorik değişkenler ise olgu sayıları ve yüzde değer olarak ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılımının incelenmesi için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılmıştır. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda normal dağılıma uygun veriler için Student t testi, normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Farklı zamanlardaki ölçümlerin karşılaştırmalarında verilerin dağılımına göre Tekrarlı Ölçümler İçin Tek Faktörlü Varyans Analizi (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA) veya Friedman testleri kullanılmıştır. Anlamli farklılık bulunursa post hoc Least Significant Difference (LSD) veya Wilcoxon testleri uygulanmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

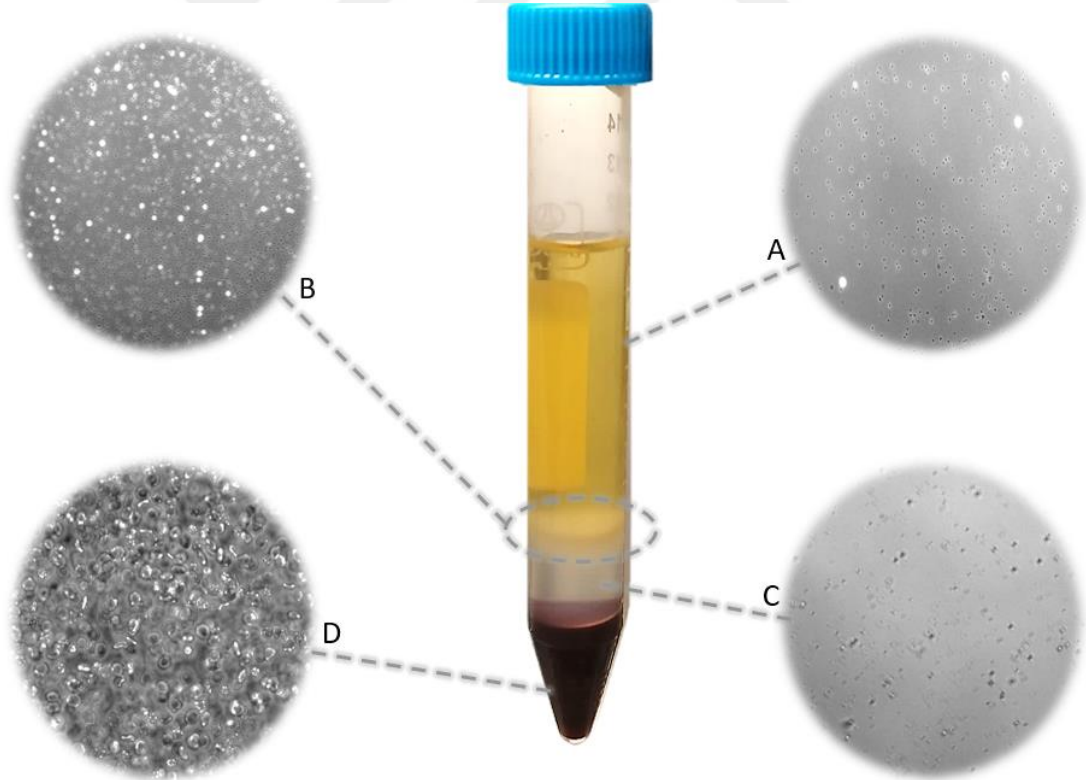
5.10 Kullanılan Malzemeler

Sarf Malzeme	Firma	Katalog Numarası
BD Vacutainer™ K2-Edta Tubes	BD	367525
Percoll	Sigma	P4937
HBSS 10X	Multicell	311-506-CL
RPMI 1640 1X (wHith Phenol Red)	Gibco	52400025
FBS (Fetal Bovin Serum)	Gibco	F4135
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco	15140122
Poly-D- Lysine	Sigma	P7280
Seahorse XFe96 FluxPak	Agilent	102416-100
Seahorse XF Calibrant Solution	Agilent	103059-000
XF DMEM Medium	Agilent	103335-100
L-Glutamine (200 mM)	Sigma	A2916801
Sodium pyruvate solution	Sigma	S8636
Glucose Solution	Agilent	103577-100
Oligomycin	Sigma	O4876
FCCP	Sigma	C2920
Rotenone	Sigma	R8875
Antimycin A	Sigma	A8674
DMSO	Thermo Scientific	TS-20688
Trypan Blue Solution, 0.4%	Gibco	15250061
pHmetre	HannaLab	HI11102
Counting Chamber (Neubauer Imp.)	Isolab	075.03.001

6. BULGULAR

6.1 Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonunun Optimizasyonu

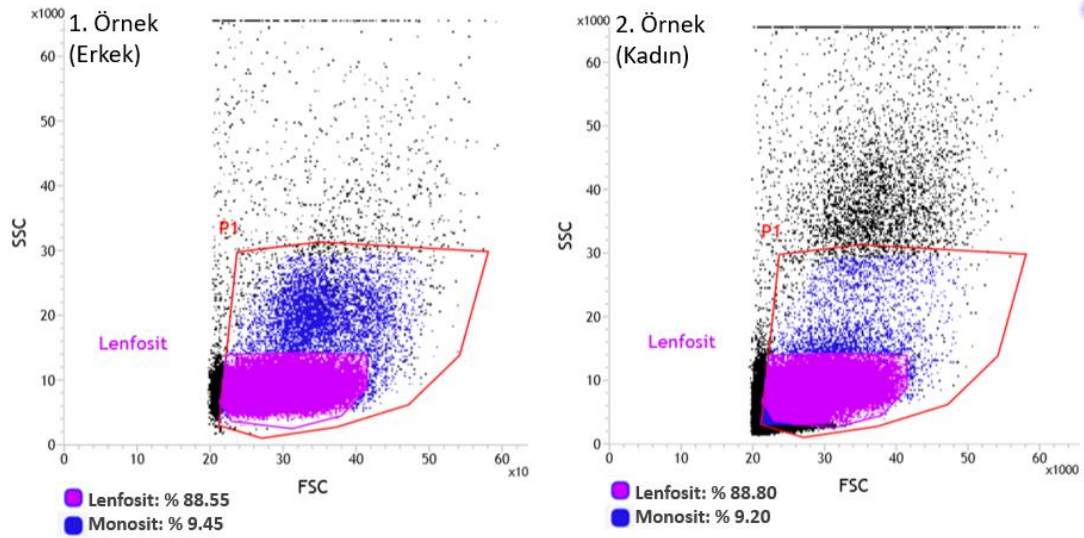
Deneilerin gerçekleştirilmesi için gereken mononükleer kan hücrelerinin izolasyonu farklı formüller denenerek optimize edilmiş ve protokolün son hali başlık 5.4.2’de açıklandığı gibi uygulanarak hücre izolasyonları gerçekleştirilmeye devam edilmiştir. Belirlenen protokole uygun olarak gerçekleştirilen Percoll gradienti sonrasında her tabakadan alınan örneklerin mikroskop altındaki görüntüleri şekil 6.1’deki gibidir. Santrifüj sonrasında mononükleer kan hücrelerinin Percoll tabakasının üzerinde oluşan bulutta yoğunlaşması, diğer tabakalardaki mononükleer hücre yoğunluğunun oldukça düşük olması ve mononükleer hücre bulutunda kırmızı renk verecek ölçüde eritrosit kalmaması izolasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Resim 6.1 Percoll ile santrifüj sonrası oluşan tabakaların mikroskop görüntüleri.

A) Plateletten zengin plazma kısmı. B) Mononükleer kan hücrelerinin bulunduğu bulut tabakası. C) Percoll tabakası. D) Eritrosit ve hücre parçalarının bulunduğu en alt tabaka.

Yapılan çalışmalarda farklı kan hücrelerinin metabolik profillerinin birbirinden farklı olduğu bildirildiğinden dolayı Seahorse Metabolizma Ölçüm Cihazı'nda mononükleer kan hücreleri gibi karışık bir popülasyonla çalışırken ortamdaki hücre tiplerinin oranlarının mümkün olduğu kadar sabit kalması önem taşımaktadır (5). Bu nedenle izolasyonların elde edilen hücre oranları açısından tutarlı olması gereklidir. Percoll gradienti ile yapılan izolasyonun kalitesini, elde edilen hücre oranlarını ve bireyler arasında büyük oranda değişim olup olmadığını test etmek amacıyla iki farklı katılımcıdan alınan kanlardan eşit koşullarda mononükleer hücre izolasyonu yapılmış ve Flow Sitometri analiziyle örneklerdeki hücre oranları belirlenmiştir. Şekil 6.2'de görüldüğü gibi farklı iki bireyin kanından yapılan izolasyon sonucunda elde edilen mononükleer hücrelerin çoğunluğunun (1. örnek: %88,55, 2. örnek: %88,80) lenfositlerden, kalan kısmının ise çoğunlukla (1. örnek: %9,45, 2. örnek: %9,20) monositlerden oluştuğu belirlenmiş, ikinci bireyin mononükleer hücre örneğinde daha fazla eritrosit kalsa da lenfosit/monosit oranının bireyler arasında anlamlı fark göstermediği belirlenmiştir.



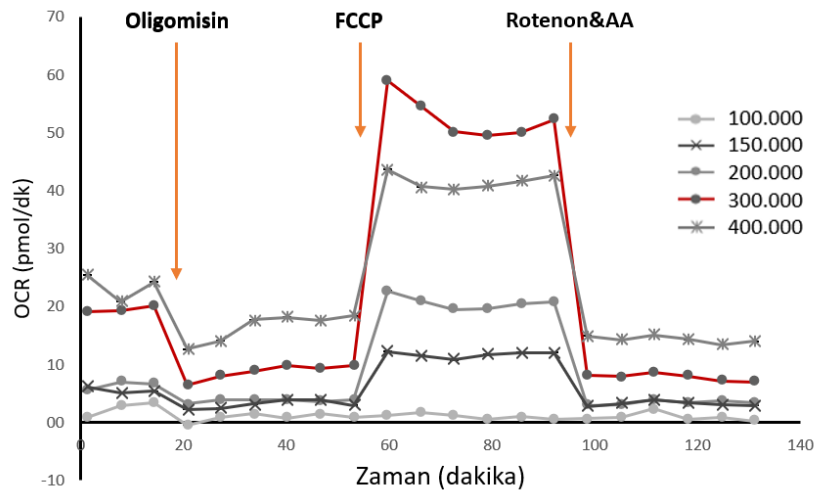
Şekil 6.2 İki farklı mononükleer hücre örneğinin Flow Sitometri analizi.

6.2 Mitokondriyal Aktivite Ölçümünün Optimizasyonu

Hücre izolasyon metodunun optimizasyonunun ardından mitokondriyal aktivite ölçüm deneylerinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan her bir kuyucuğa ekilmesi gereken hücre sayısı, FCCP dozu ve izolasyon zamanları için optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

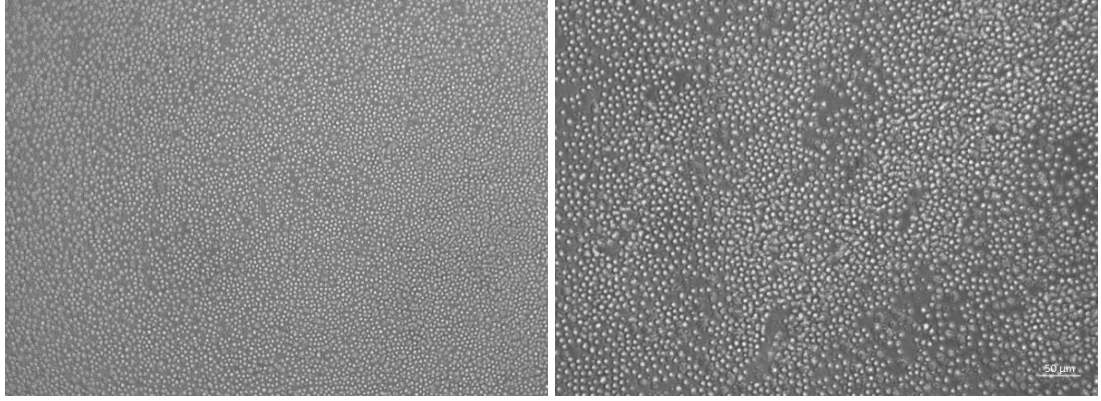
6.2.1 Ekilecek Hücre Sayısının Belirlenmesi

Optimal OCR ve ECAR ölçüm değerlerini veren en düşük hücre sayısını belirlemek için gerçekleştirilen deney sonucunda her kuyucuğa ekilmesi gereken ideal hücre sayısının 300.000 olduğu belirlenmiştir. Aynı bireyin kanından izole edilen 100.000, 150.000 ve 200.000 hücreden yeterli sinyal alınmazken, 400.000 hücre ekildiğinde bazal solunum ölçümlerinde sapmalar görülmüş ve maksimal solunum oranı da 300.000 hücreye göre daha düşük kalmıştır. 400.000 hücreye çıkıldığında, lineer artışta kırılma görüldüğünden dolayı, test profiline en uygun grafiği veren 300.000 hücrenin en uygun hücre yoğunluğu olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 6.3 Farklı sayılarda ekilen mononükleer hücrelerin Mito Stres Test sonuç grafiği.

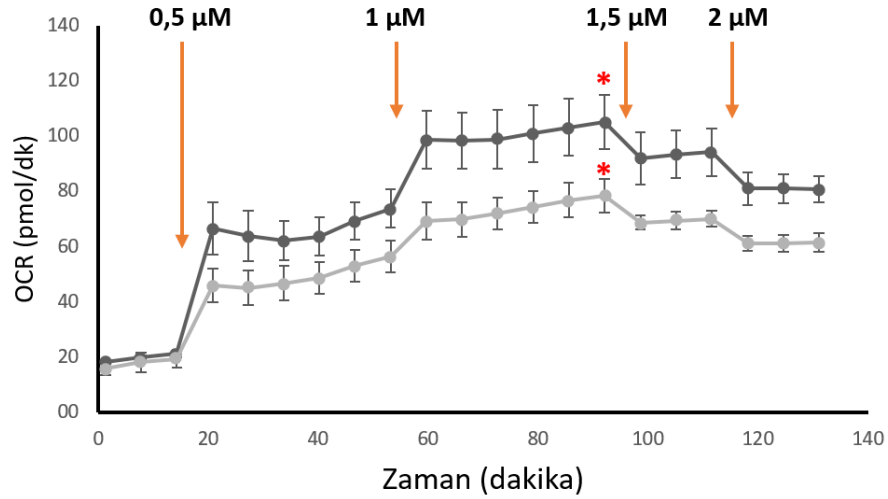
Mikroskop görüntülerinde de her kuyucuğa 300.000 hücre ekildiğinde istenen boşluksuz tek tabaka halindeki hücre popülasyonuna ulaşıldığı doğrulanmıştır (Şekil 6.3).



Resim 6.1 Metabolizma ölçümü için gereken optimal hücre yoğunluğunun mikroskop görüntüleri (300.000 hücre/kuyucuk, sırasıyla 10X ve 20X büyütme).

6.2.2 FCCP Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Metabolizma Ölçüm Cihazı ile Mito Stres Testi gerçekleştirilirken dikkat edilmesi gereken en önemli kriterlerden biri ekilen hücre sayısına uygun, maksimum oksijen tüketim hızına ulaştıran minimum FCCP dozunu bulmaktır. FCCP'nin olması gerekenden daha az veya fazla kullanımı maksimal solunumun ve yedek solunum kapasitesinin yanlış ölçülmesine neden olmaktadır.



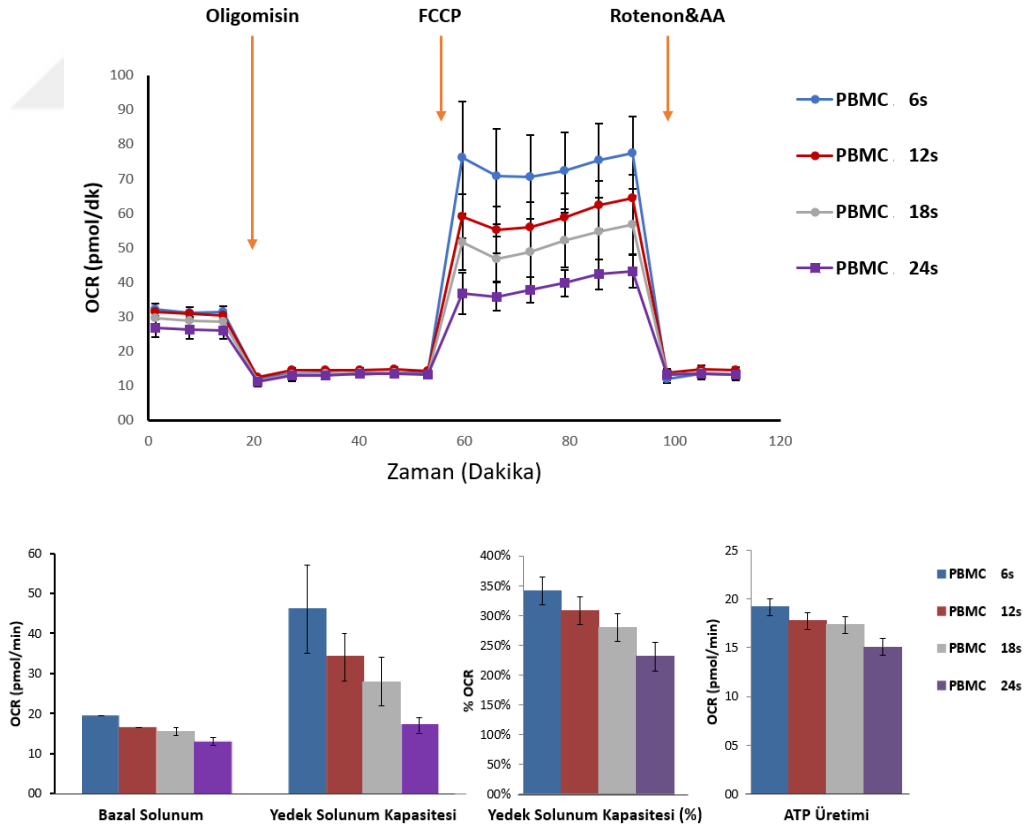
Şekil 6.5 İki farklı kişinin kanından izole edilen mononükleer hücreler (3×10^5 hücre/kuyucuk) ile gerçekleştirilen FCCP titrasyonu.

İki farklı kişinin kanından izole edilen mononükleer hücrelerle gerçekleştirilen FCCP titrasyonu sonucunda ilerleyen deneylerde kullanılacak optimum FCCP

konsantrasyonunun 1 μM olduğu tespit edilmiştir. Şekil 6.4'te görüldüğü gibi FCCP konsantrasyonu kademeli olarak artırıldığında en yüksek Oksijen Tüketim Hızı'na (OCR) 1 μM FCCP ile ulaşılmış, doz daha fazla arttığında ise oksijen tüketim hızının düştüğü belirlenmiştir.

6.2.3 Ölçüm Zamanının Optimizasyonu

Hücrelerin testin yapılacağı günden bir gün önce izole edilerek inkübatörde bekletilmesinin test sonuçlarını nasıl etkileyeceğini belirlemek amacıyla aynı bireyin kanından farklı zamanlarda (ölçümden 24-18-12 ve 6 saat önce) izole edilen hücrelerin Mito Stres test sonucu şekil 6.5'te verilmiştir. Hücrelerin bekleme süresinin uzamasının bazal solunum, yedek solunum kapasitesi ve ATP üretiminde düşüşe neden olduğu belirlenmiş, bu nedenle Ramazan dönemindeki deneylerde hücre izolasyonlarının ölçüm gününde yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 6.6 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin bekleme süresinin mitokondriyal aktivite parametreleri üzerindeki etkisi.

6.3 Bireylerin Demografik ve Antropometrik Özellikleri

Çalışmanın Ramazan orucunun etkilerinin değerlendirildiği kısımına katılan bireylerin demografik bilgileri ve zamanla elde edilen antropometrik ölçüm sonuçları Tablo 6.1'deki gibidir. Çalışmaya dahil edilen 5 kadın ve 4 erkeğin yaş ortalaması sırasıyla $24,2 \pm 1,9$ ve $23,7 \pm 4,9$ yıldır.

Deneyleerin yapıldığı süreçte bireylerin vücut ağırlığı ve vücut ağırlığına bağlı olarak BKİ'lerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Kadınlar Ramazan ayında ortalama 1720 ± 1370 g ağırlık kaybederken, erkekler ortalama 1350 ± 350 g zayıflamıştır. Ramazan ayındaki vücut ağırlığı değişimi açısından cinsiyetler arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Mann Whitney U testi, $p > 0,05$). Toplamda bireyler Ramazan öncesine göre ortalama 1550 ± 1010 g kadar ağırlık kaybetmiştir ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Beden Kütle İndeksi değerleri de vücut ağırlığına bağlı olarak Ramazan sürecinde anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p < 0,05$).

Ramazan ayının bitiminden 1 ay geçtikten sonra ise Ramazan sırasında anlamlı şekilde düşen vücut ağırlığı ve BKİ değerlerinin eski haline döndüğü, Ramazan başı (R1) ile Ramazan sonrası 1. (RS-1) ve 3. aydaki (RS-3) ölçümlerin arasında anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

Özetle, Şekil 6.6'da verilen grafiklerde de görüleceği üzere, Ramazan orucu tutulan süreçte bireylerin vücut ağırlığı ve BKİ değerlerinde geri dönüşümlü bir düşüş olurken, vücut bileşimleri (kas ve yağ oranları) istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmemiştir ($p > 0,05$).

Tablo 6.1 Katılımcıların Genel ve Antropometrik Özellikleri

	Kadın (n=5)	Erkek (n=4)	Toplam (n=9)
	Ort (±SS)	Ort (±SS)	Ort (±SS)
Yaş (Yıl)	24,20 (±1,92)	23,75 (±4,92)	24,00 (±3,32)
Boy (cm)	164,98 (±5,24)	170,17 (±7,31)	167,29 (±6,42)

Antropometrik Ölçümler (Kadın)	Zaman					
	R1	R15	RSon	RS-1	RS-3	p^a
Vücut Ağırlığı(kg)	58,04 (±3,53)	56,48 (±3,13)	56,32 (±3,12)	56,98 (±2,85)	57,74 (±2,70)	0,009*
BKİ (kg/m²)	21,32 (±0,81)	20,75 (±0,47)	20,69 (±0,38)	20,94 (±0,56)	21,22 (±0,40)	0,012*
Kas (kg)	22,62 (±2,48)	22,36 (±2,05)	22,38 (±2,11)	22,78 (±2,17)	23,30 (±2,37)	0,334
Yağ (kg)	17,20 (±3,93)	15,36 (±2,12)	15,08 (±1,59)	15,12 (±2,46)	15,16 (±2,26)	0,193
Yağ Oranı (%)	29,45 (±5,79)	27,22 (±3,75)	26,82 (±3,35)	26,62 (±4,64)	26,36 (±4,49)	0,299

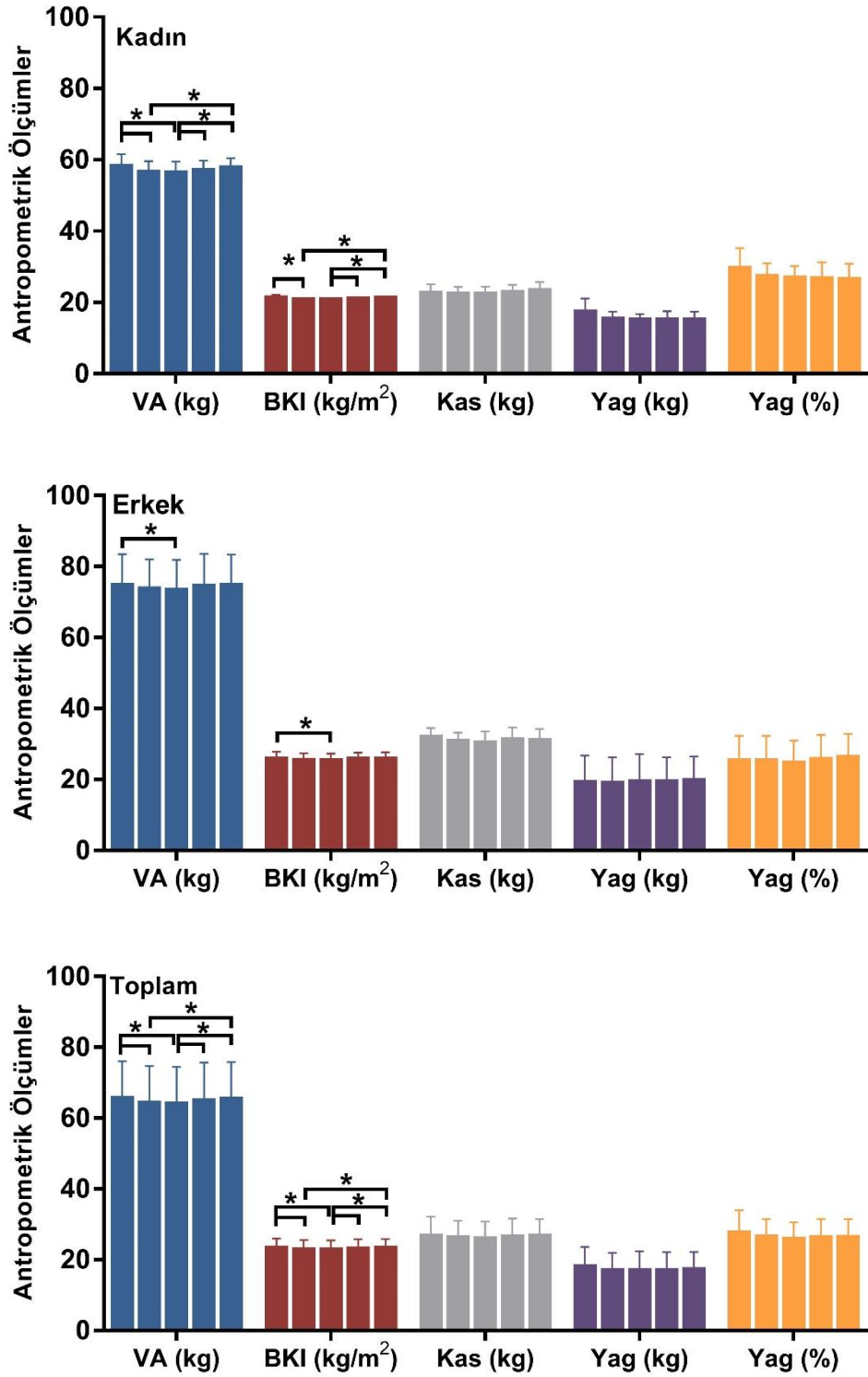
Antropometrik Ölçümler (Erkek)	Zaman					
	R1	R15	RSon	RS-1	RS-3	p^a
Vücut Ağırlığı(kg)	74,65 (±8,80)	73,65 (±8,36)	73,3 (±8,56)	74,48 (±9,03)	74,68 (±8,67)	0,034*
BKİ (kg/m²)	25,74 (±2,01)	25,41 (±1,98)	25,28 (±1,99)	25,67 (±1,89)	25,75 (±1,94)	0,036*
Kas (kg)	31,88 (±2,70)	30,83 (±2,38)	30,33 (±3,22)	31,10 (±3,51)	30,95 (±3,34)	0,332
Yağ (kg)	19,15 (±7,61)	18,90 (±7,29)	19,25 (±7,91)	19,33 (±6,98)	19,73 (±6,71)	0,957
Yağ Oranı (%)	25,18 (±7,14)	25,23 (±7,05)	24,55 (±6,39)	25,63 (±6,94)	26,18 (±6,66)	0,892

Antropometrik Ölçümler (Toplam)	Zaman					
	R1	R15	RSon	RS-1	RS-3	p^a
Vücut Ağırlığı(kg)	65,42 (±10,58)	64,11 (±10,63)	63,87 (±10,60)	64,76 (±10,94)	65,27 (±10,56)	0,000*
BKİ (kg/m²)	23,29 (±2,70)	22,82 (±2,76)	22,73 (±2,72)	23,04 (±2,78)	23,23 (±2,68)	0,000*
Kas (kg)	26,73 (±5,44)	26,12 (±4,91)	25,91 (±4,86)	26,48 (±5,12)	26,70 (±4,82)	0,247
Yağ (kg)	18,07 (±5,52)	16,93 (±5,07)	16,93 (±5,44)	16,99 (±5,12)	17,19 (±5,02)	0,397
Yağ Oranı (%)	27,55 (±6,40)	26,33 (±5,18)	25,81 (±4,73)	26,18 (±5,39)	26,28 (±5,17)	0,469

a: Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA Analizi *p<0,05

R1: Ramazan'ın 1. günü **R15:** Ramazan'ın 15. Günü **RSon:** Ramazan'ın 27. günü **RS-1:** Ramazan ayının bitiminden 1 ay sonra

RS-3: Ramazan ayının bitiminden 3 ay sonra



Şekil 6.7 Bireylerin zamana göre değişen antropometrik ölçümleri.

Sütunlar sırasıyla Ramazan ayının 1. (R1) , 15. (R15), 27. (R27) günlerinde ve ramazan ayından 1 ay (RS-1) ve 3 ay (RS-3) sonrasında yapılan ölçümleri göstermektedir. İkili karşılaştırmalar için LSD testi kullanılmıştır. *: $p < 0,05$

6.4 Bireylerin Besin Tüketim Kayıtlarının Analizleri

Ramazan ayının başında, ortasında, sonunda, 1 ve 3 ay sonrasında alınan 24 saatlik geriye dönük besin tüketim kayıtlarına göre hesaplanan enerji ve besin ögesi alımlarının ortalama ve standart sapma değerleri kadınlar için tablo 6.2.'de, erkekler için tablo 6.3'te ve toplam olarak tablo 6.4'te verilmiştir.

Tablo 6.2 Çalışmaya Katılan Kadınların Zamana Göre Enerji ve Besin Ögesi Alımları

Enerji ve Besin Ögeleri (Kadın)	Zaman					p ^a
	R1	R15	R _{Son}	RS-1	RS-3	
Enerji (kkal)	1790,2 (±571,8)	1771,5 (+604,4)	1484,7 (+350,5)	1595,6 (+386,8)	2024,7 (+387,7)	0,017*^b
Karbonhidrat (g)	198,4 (±82,4)	200,4 (±76,5)	175,6 (±81,2)	178,8 (±33,8)	197,6 (±43,6)	0,725
Karbonhidrat (%)	44,2 (±5,1)	46,2 (±8,0)	46,8 (±13,8)	46,2 (±4,5)	40,4 (±8,6)	0,804
Protein (g)	67,5 (±31,4)	59,0 (±16,9)	56,0 (±20,3)	62,8 (±22,2)	80,3 (±12,2)	0,447
Protein (%)	15,2 (±2,8)	14,2 (±3,5)	16,2 (±6,1)	15,6 (±2,3)	16,8 (±4,2)	0,847
Yağ (g)	79,3 (±20,0)	80,0 (±31,3)	60,3 (±21,0)	68,6 (±21,1)	100,7 (±39,2)	0,160
Yağ (%)	40,4 (±7,1)	39,8 (±5,1)	37,0 (±10,6)	38,0 (±4,3)	42,8 (±9,8)	0,595
Lif (g)	19,5 (±7,5)	20,1 (±8,7)	14,6 (±6,7)	16,2 (±7,7)	26,4 (±7,9)	0,077
Kolesterol (mg)	295,7 (±215,8)	204,2 (±132,8)	200,8 (±217,5)	211,9 (±108,2)	199,9 (±76,8)	0,823
A Vitamini (mcg)	900,3 (±416,8)	990,0 (±888,3)	722,0 (±478,5)	820,1 (±685,8)	761,4 (±469,5)	0,963
Tiamin (mg)	0,7 (±0,21)	0,7 (±0,28)	0,7 (±0,17)	0,6 (±0,18)	0,9 (±0,27)	0,363
B12 Vitamini (mg)	3,7 (±1,2)	2,6 (±1,6)	4,0 (±2,8)	2,2 (±1,1)	3,3 (±1,5)	0,419
C Vitamini (mg)	78,9 (±18,7)	93,1 (±46,7)	60,8 (±24,5)	75,1 (±19,8)	93,7 (±95,0)	0,806
Sodyum (mg)	3441,0 (±1070,7)	3166,8 (±1136,4)	2408,1 (±1065,2)	3391,7 (±866,0)	3672,0 (±1170,7)	0,461
Kalsiyum (mg)	611,6 (±215,9)	680,8 (±509,9)	577,6 (±335,5)	332,5 (±125,2)	725,5 (±290,9)	0,352
Demir (mg)	10,0 (±2,3)	11,6 (±5,2)	9,1 (±1,5)	9,6 (±2,8)	11,8 (±2,9)	0,614

a: Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA Testi **b:** Friedman Testi *: p<0,05

Tablo 6.3 Çalışmaya Katılan Erkeklerin Zamana Göre Enerji ve Besin Ögesi Alımları

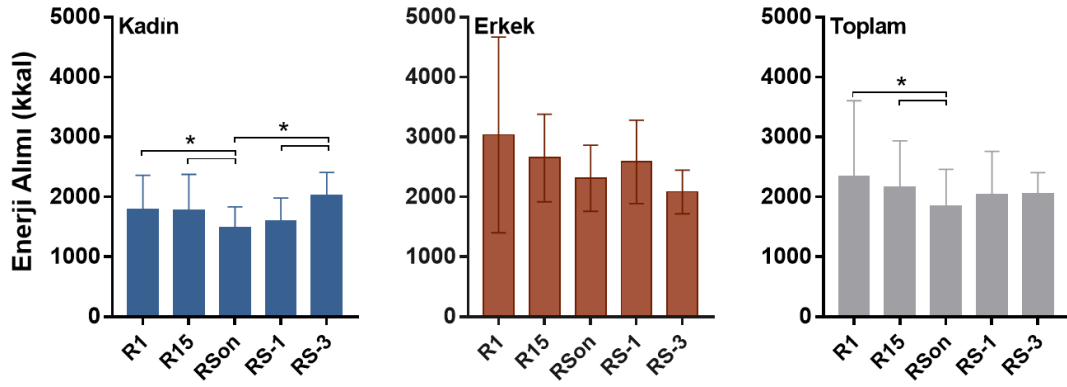
Enerji ve Besin Ögeleri (Erkek)	Zaman					p ^a
	R1	R15	R5on	RS-1	RS-3	
Enerji (kkal)	3034,9 (±1632,1)	2650,3 (±733,0)	2313,0 (±553,2)	2584,5 (±695,4)	2083,7 (±364,2)	0,307 ^b
Karbonhidrat (g)	325,8 (±172,9)	330,1 (±150,0)	277,2 (±100,5)	320,2 (±73,8)	227,9 (±19,5)	0,303
Karbonhidrat (%)	44,0 (±10,4)	48,8 (±11,5)	47,8 (±9,6)	50,5 (±2,9)	45,3 (±5,8)	0,683
Protein (g)	121,6 (±64,3)	83,4 (±18,1)	67,7 (±11,5)	79,8 (±13,9)	83,3 (±28,0)	0,125
Protein (%)	16,8 (±3,6)	13,3 (±3,3)	12,3 (±1,9)	12,8 (±1,5)	16,3 (±6,1)	0,284
Yağ (g)	133,6 (±79,3)	107,9 (±15,1)	102,6 (±28,1)	109,1 (±41,1)	91,8 (±32,6)	0,417
Yağ (%)	39,0 (±7,5)	38,0 (±8,3)	40,0 (±8,9)	36,5 (±4,0)	38,3 (±6,9)	0,855
Lif (g)	23,7 (±16,3)	22,5 (±11,0)	13,8 (±1,5)	22,2 (±9,1)	18,6 (±8,7)	0,533
Kolesterol (mg)	618,9 (±205,6)	463,1 (±332,8)	358,5 (±173,2)	210,5 (±97,1)	200,7 (±89,0)	0,020*
A Vitamini (mcg)	1382,0 (±761,5)	1381,8 (±734,7)	1177,6 (±844,0)	314,2 (±155,2)	606,9 (±403,6)	0,075
Tiamin (mg)	1,4 (±1,33)	1,0 (±0,51)	0,6 (±0,13)	1,2 (±0,40)	0,8 (±0,21)	0,229
B12 Vitamini (mg)	4,1 (±2,1)	5,3 (±3,8)	2,2 (±0,7)	4,3 (±0,8)	3,7 (±3,1)	0,519
C Vitamini (mg)	108,0 (±97,1)	132,9 (±60,7)	73,4 (±15,7)	47,2 (±27,0)	80,2 (±37,3)	0,124
Sodyum (mg)	5185,9 (±2994,0)	4781,3 (±744,5)	4332,8 (±794,1)	4201,0 (±690,3)	4232,7 (±971,4)	0,834
Kalsiyum (mg)	795,6 (±495,7)	786,5 (±139,0)	651,7 (±559,9)	475,4 (±84,4)	619,0 (±281,6)	0,567
Demir (mg)	16,7 (±9,3)	14,3 (±3,4)	9,0 (±1,6)	14,7 (±3,1)	11,8 (±1,5)	0,516

a: Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA Testi b: Friedman Testi *: p<0,05

Tablo 6.4 Bireylerin Zamana Göre Enerji ve Besin Ögesi Alımları (n=9)

Enerji ve Besin Ögeleri (Toplam)	Zaman					p ^a
	R1	R15	R5on	RS-1	RS-3	
Enerji (kkal)	2343,4 (±1262,0)	2162,0 (±773,7)	1852,8 (±605,6)	2035,1 (±726,5)	2050,9 (±354,7)	0,044* ^b
Karbonhidrat (g)	255,1 (±138,2)	258,0 (±126,7)	220,7 (±99,8)	241,6 (±90,4)	211,1 (±36,7)	0,448
Karbonhidrat (%)	44,1 (±7,3)	47,3 (±9,1)	47,2 (±11,4)	48,1 (±4,3)	42,6 (±7,5)	0,512
Protein (g)	91,6 (±53,4)	69,8 (±20,7)	61,2 (±17,1)	70,4 (±20,0)	81,6 (±19,3)	0,178
Protein (%)	15,9 (±3,1)	13,8 (±3,2)	14,4 (±4,9)	14,3 (±2,4)	16,6 (±4,8)	0,335
Yağ (g)	103,4 (±58,1)	92,4 (±28,1)	79,1 (±31,9)	86,6 (±36,2)	96,8 (±34,5)	0,404
Yağ (%)	39,8 (±6,9)	39,0 (±6,3)	38,3 (±9,4)	37,3 (±4,0)	40,8 (±8,5)	0,707
Lif (g)	21,4 (±11,5)	21,2 (±9,2)	14,3 (±4,8)	18,9 (±8,4)	22,9 (±8,8)	0,157
Kolesterol (mg)	439,3 (±261,1)	319,2 (±262,6)	270,9 (±204,5)	211,3 (±96,9)	200,2 (±76,9)	0,031*
A Vitamini (mcg)	1114,4 (±607,2)	1164,1 (±799,8)	924,5 (±662,8)	595,2 (±561,5)	692,7 (±421,8)	0,231
Tiamin (mg)	1,0 (±0,9)	0,8 (±0,4)	0,6 (±0,2)	0,8 (±0,4)	0,8 (±0,2)	0,346
B12 Vitamini (mg)	3,9 (±1,5)	3,8 (±2,9)	3,2 (±2,2)	3,2 (±1,4)	3,5 (±2,2)	0,921
C Vitamini (mg)	91,8 (±62,8)	110,8 (±54,0)	66,4 (±20,9)	62,7 (±26,2)	87,7 (±71,3)	0,213
Sodyum (mg)	4216,5 (±2186,4)	3884,3 (±1256,0)	3263,5 (±1353,9)	3751,3 (±857,7)	3921,2 (±1061,3)	0,575
Kalsiyum (mg)	693,3 (±353,3)	727,8 (±374,6)	610,5 (±418,8)	396,0 (±127,2)	678,2 (±274,2)	0,147
Demir (mg)	13,0 (±6,9)	12,8 (±4,5)	9,1 (±1,4)	11,9 (±3,9)	11,8 (±2,2)	0,174

a: Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA Testi b: Friedman Testi *: p<0,05



Şekil 6.8 Bireylerin zamana göre enerji alımları.

(Wilcoxon Testi, *: $p < 0,05$).

Ramazan sonunda kadınların enerji alımları ($1484,7 \pm 350,5$ kkal), Ramazan başı ($1790,2 \pm 571,8$ kkal) ve ortasına ($1771,5 \pm 604,4$) göre anlamlı düşüş göstermiştir ($p < 0,05$). Oruç tutulan süreçte karbonhidrat, protein, yağ, lif, kolesterol, A, C vitaminleri, sodyum, kalsiyum ve demir alımında da düşüş olduğu gözlenmiştir ancak aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Ramazan sırasında düşüş gösteren besin ögesi ve toplam enerji alımlarının Ramazan'dan sonra tekrar artış gösterdiği (kolesterol dışında) belirlenmiştir.

Çalışmaya katılan erkeklerde de kadınlara benzer şekilde enerji ve birçok besin ögesinin alımı Ramazan sonuna doğru düşüş göstermiş ancak değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Kolesterol alımı ise Ramazan'ın 15. gününde ve sonunda başlangıca kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$).

Tüm katılımcıların enerji ve besin ögesi alımları genel olarak değerlendirildiğinde, birçok besin ögesinin ortalama alımında çoğunlukla Ramazan ayının sonuna doğru bir düşüş, Ramazan sonrasında ise yükselme eğilimi olduğu görülmektedir. En fazla enerji ($2343,4 \pm 1262,0$ kkal) ve kolesterolün ($439,3 \pm 261,1$ mg) Ramazan ayının birinci gününde alındığı belirlenmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Tablo 6.5 Ramazan Dönemi ve Ramazan Dışındaki Enerji ve Besin Ögesi Alımlarının Genel Analizi.

Enerji ve Besin Ögeleri	Ramazan Dönemi		p ^a
	Ortalama (±SS)	Ramazan Dışı Ortalama (±SS)	
Enerji (kkal)	2119,4 (±841,1)	2043,0 (±463,3)	0,650
Karbonhidrat (g)	244,6 (±117,7)	226,4 (±59,1)	0,570
Karbonhidrat (%)	46,2 (±7,2)	45,4 (±4,8)	0,788
Protein (g)	74,2 (±23,3)	76,0 (±11,5)	0,804
Protein (%)	14,7 (±2,4)	15,5 (±2,8)	0,111
Yağ (g)	91,6 (±33,8)	91,7 (±28,4)	0,992
Yağ (%)	39,0 (±6,2)	39,1 (±5,7)	0,996
Lif (g)	19,0 (±7,3)	20,9 (±6,9)	0,533
Kolesterol (mg)	343,1 (±206,8)	205,8 (±56,0)	0,028^{*b}
A Vitamini (mcg)	1067,7 (±448,4)	644,0 (±391,0)	0,085
Tiamin (mg)	0,8 (±0,4)	0,8 (±0,2)	0,678 ^b
B12 Vitamini (mg)	3,6 (±1,5)	3,4 (±1,2)	0,631
C Vitamini (mg)	89,7 (±38,8)	75,2 (±40,7)	0,429
Sodyum (mg)	4158,5 (±1155,5)	3836,3 (±825,8)	0,891
Kalsiyum (mg)	677,2 (±269,2)	537,1 (±151,1)	0,139
Demir (mg)	11,6 (±3,6)	11,9 (±2,4)	0,678 ^b

a: Eşleştirilmiş örneklerde t testi b: Wilcoxon Testi *: p<0,05

Besin tüketim kayıtlarının sonuçları Ramazan ayının hangi kısmında olduğuna bakılmaksızın Ramazan dönemi ve dışı olarak ikili karşılaştırıldığında, Ramazan döneminde kolesterol dışındaki enerji ve besin ögelerinin hiçbirinin alımında Ramazan dışına göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Kolesterol alımının Ramazan döneminde ortalama 137,3 mg kadar artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 6.5).

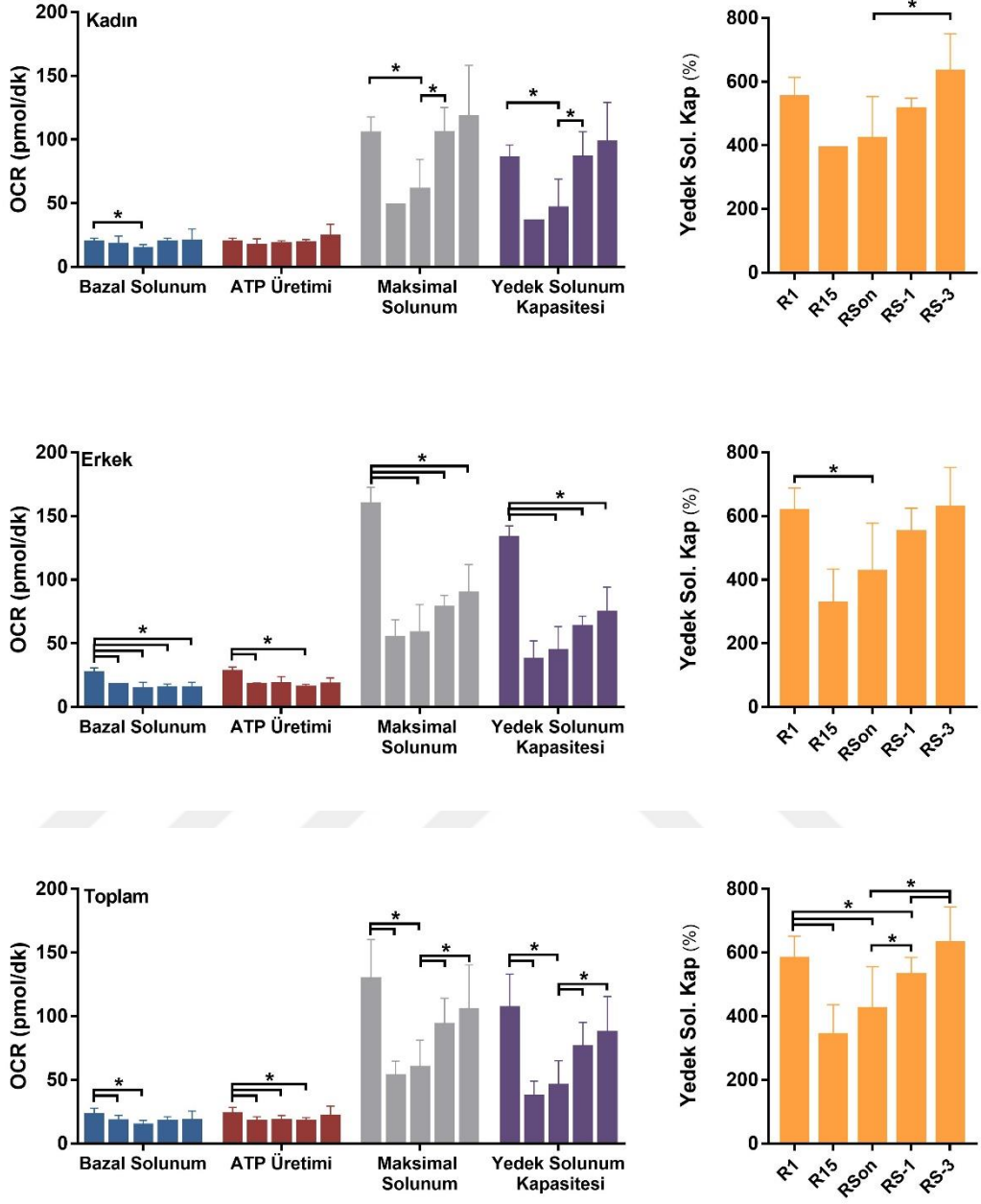
6.5 Ramazan Sürecinde Mitokondriyal Aktivite Parametrelerindeki Değişimler

Katılımcılardan 5 farklı zamanda alınan kanlardan izole edilen mononükleer hücrelerle gerçekleştirilen mitokondriyal aktivite ölçümlerinin ayrıntılı sonuçları tablo 6.6'da verilmiştir.

Tablo 6.6 Bireylerin Zamana Göre Mitokondriyal Aktivite Ölçüm Sonuçları

Kadın (n=5)	Zaman					p ^a
	R1	R15	R _{Son}	RS-1	RS-3	
Bazal Solunum	19,25 (±3,38)	17,64 (±6,64)	14,44 (±3,09)	19,37 (±3,14)	19,93 (±9,76)	0,408
ATP Üretimi	19,54 (±2,97)	16,62 (±5,50)	17,84 (±2,76)	18,77 (±2,80)	23,91 (±9,67)	0,264
Maksimal Solunum	104,72 (±13,01)	16,96 (±18,05)	60,58 (±23,78)	105,24 (±19,94)	117,69 (±40,62)	0,021 ^{*x}
Yedek Solunum Kapasitesi	85,46 (±10,24)	7,14 (±15,97)	46,14 (±22,73)	85,87 (±20,42)	97,75 (± 31,46)	0,015 ^{*x}
Yedek Solunum Kapasitesi (%)	551,58 (±61,96)	78,16 (±174,77)	421,28 (±132,33)	513,76 (±34,72)	631,86 (±119,13)	0,023 ^{*x}
Erkek (n=4)	Zaman					p ^a
	R1	R15	R _{Son}	RS-1	RS-3	
Bazal Solunum	26,55 (±4,13)	17,45 (±0,97)	14,00 (±5,49)	15,08 (±3,05)	14,92 (±4,53)	0,004 [*]
ATP Üretimi	27,73 (±3,71)	17,60 (±1,36)	18,15 (±5,80)	15,28 (±2,71)	17,83 (±5,01)	0,045 [*]
Maksimal Solunum	159,38 (±13,18)	54,63 (±13,90)	58,15 (±22,37)	78,25 (±9,53)	89,18 (±22,77)	0,000 ^{*x}
Yedek Solunum Kapasitesi	132,83 (±9,36)	37,27 (±14,86)	44,15 (±19,11)	63,18 (±8,20)	74,24 (±20,04)	0,000 ^{*x}
Yedek Solunum Kapasitesi (%)	617,20 (±71,33)	325,47 (±108,49)	424,80 (±153,22)	550,43 (±74,43)	626,70 (±126,09)	0,025 ^{*x}
Toplam (n=9)	Zaman					p ^a
	R1	R15	R _{Son}	RS-1	RS-3	
Bazal Solunum	22,49 (±5,19)	17,55 (±4,73)	14,24 (±4,02)	17,46 (±3,68)	17,70 (±7,89)	0,024 [*]
ATP Üretimi	23,18 (±5,31)	17,06 (±4,01)	17,98 (±4,05)	17,22 (±3,18)	21,21 (± 8,15)	0,057
Maksimal Solunum	129,01 (±31,30)	53,00 (±11,81)	59,50 (±21,73)	93,25 (±20,86)	105,02 (± 35,29)	0,001 ^{*x}
Yedek Solunum Kapasitesi	106,51 (±26,62)	36,87 (±12,45)	45,26 (±19,91)	75,79 (±19,41)	87,30 (±28,27)	0,000 ^{*x}
Yedek Solunum Kapasitesi (%)	580,74 (±70,88)	341,80 (±94,41)	422,84 (±132,53)	530,06 (±55,26)	629,57 (±114,30)	0,000 ^{*x}

a: Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA Testi *p<0,05 x: R15 ölçümlerinde testin çalışmasında problem olduğu için analize dahil edilmemiştir.



Şekil 6.9 Bireylerin zamana göre mitokondriyal aktivite ölçümleri.

(Sütunlar sırasıyla R1, R15, R5on, RS-1 ve RS-3 ölçümlerini göstermektedir. İkili karşılaştırmalar için LSD testi kullanılmıştır, *: $p < 0,05$.)

Ramazan sonunda elde edilen mononükleer kan hücrelerinin bazal solunumu Ramazan'ın 1. gününe göre her iki cinsiyette de azalma göstermiş, erkeklerde daha

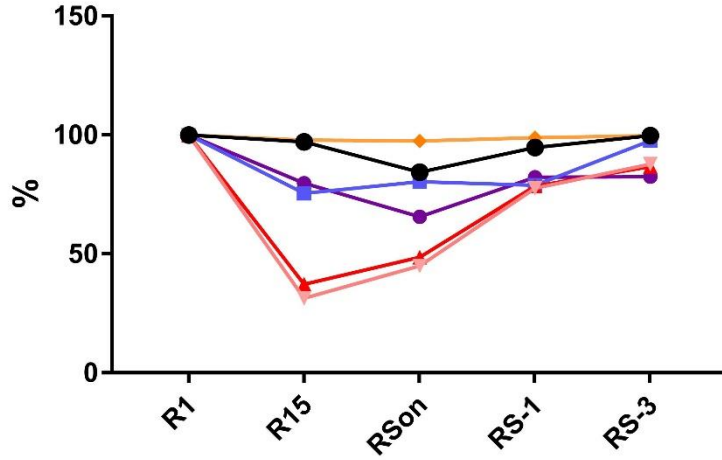
erken başlayan düşüş Ramazan ortasında da anlamlı farklılık oluşturmuştur ($p<0,05$). Toplu analize bakıldığında, tüm deney grubunda bazal solunum Ramazan ortası ($17,55 \pm 4,73$ pmol/dk) ve sonunda ($14,24 \pm 4,02$ pmol/dk) Ramazan'ın ilk gününe ($22,49 \pm 5,19$ pmol/dk) kıyasla daha düşük bulunmuş, Ramazan ayının bitiminden 1 ay sonra tekrar yükselen bazal solunum oruç tutulmayan dönemde anlamlı olarak değişmemiştir ($p>0,05$).

Bireylerin mononükleer hücrelerindeki ATP üretimi Ramazan ortası, sonu ve 1 ay sonrasında ilk ölçüme kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuş ($p<0,05$), Ramazan'ın bitiminden 3 ay sonra ise tekrar yükselmiştir.

Ramazan sürecindeki en büyük değişimler ise maksimal solunum ve ona bağlı olarak hesaplanan yedek solunum kapasitesi ile yedek solunum kapasitesinin bazal solunuma oranında (%) meydana gelmiştir. Ramazan ortasında yapılan deneylerde bu parametrelerin hesaplanmasını sağlayan FCCP ilacına verilen yanıt konusunda problem yaşanması nedeniyle katılımcılardan 5'inin (4 kadın, 1 erkek) yedek solunum kapasitesi 0 olarak hesaplanmış, ortalamaya ve istatistiksel karşılaştırmaya dahil edilmemiştir. Bu şekilde analiz edilen sonuçlara göre genel örnekleme bakıldığında, bireylerin kanlarından izole edilen mononükleer hücrelerin maksimal solunumları ve yedek solunum kapasiteleri, oruç tutulan dönemde anlamlı bir düşüş gösterirken, Ramazan sonrasında oruç tutulmayan dönemde anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Cinsiyete göre değerlendirme yapıldığında, bu parametrelerin kadınlarda Ramazan ayının bitiminden 3 ay sonra eski haline döndüğü, erkeklerde ise Ramazan sonuna göre artış olmasına rağmen Ramazan başına göre anlamlı olarak düşük kaldığı belirlenmiştir. Mito Stres testi sonucunda ölçümü yapılan parametrelerden biri olan proton kaçağı bireylerin yüksek çoğunluğunda (%90) sıfır olarak ölçülmüş, bu nedenle grafik ve tablolarda yer verilmemiştir.

Tüm bireylere ait hücrelerin mitokondriyal aktivitelerindeki değişimler genel olarak değerlendirildiğinde; bazal solunum, ATP üretimi, maksimal solunum ve yedek solunum kapasitelerinin Ramazan orucu tutulan dönemde anlamlı olarak düştüğü, bu değişimlerin kalıcı olmadığı, normal beslenme düzenine dönülmesi ile birlikte tekrar yükselişe geçtiği saptanmıştır.

6.6 Vücut Ağırlığı, Enerji Alımı ve Mitokondriyal Aktivite Ölçümlerindeki Oransal Değişimler



Zaman	Vücut Ağırlığı	Enerji Alımı	Bazal Solunum	ATP Üretimi	Maksimal Solunum	Yedek Solunum K.
R1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
R15	98,0	97,2	79,8	75,5	37,3	31,5
RSon	97,6	84,4	65,6	80,4	48,7	45,0
RS-1	98,9	94,8	82,4	79,0	78,6	77,7
RS-3	99,8	99,8	82,6	97,7	86,8	87,9

Şekil 6.10 Bireylerin Vücut Ağırlığı, Enerji Alımı ve Mitokondriyal Aktivite Ölçümlerindeki Değişimler (%)

* Ramazan ayının 1. Günündeki ölçümler %100 kabul edilmiştir (n=9).

Ramazan sırası ve sonrasındaki 5 farklı gündeki ölçüm sonuçları, Ramazan ayının 1. gününe göre normalize edildiğinde, Ramazan sonunda ortalama vücut ağırlığının %2,4, enerji alımının ise %15,6 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ramazan sonrası 3. ayda ise bireylerin vücut ağırlıkları ve enerji alımları neredeyse tamamen başlangıçtaki haline dönmüştür (Şekil 6.9).

Ramazan sonundaki mitokondriyal aktivite parametreleri değerlendirildiğinde, Ramazan'ın 1. gününe göre bazal solunumun %34,4, ATP üretiminin ise %19,6 oranında düşüş gösterdiği saptanmıştır. Ramazan sonundaki en fazla düşüş ise %55 oranında azalan yedek solunum kapasitesinde görülmüştür. Oruç tutulmayan dönemde, mitokondriyal aktivite parametrelerinin de tekrar yükseldiği belirlenmiştir.

7. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında insan kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin ölçümünde kullanılabilecek tutarlı bir metodun geliştirilmesi ve sağlıklı bireylerde Ramazan orucunun antropometrik ölçümler, beslenme alışkanlıkları ve mitokondriyal aktivite parametreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hücre Metabolizması Ölçüm Cihazı ile yapılan ölçümlerin optimizasyonu ve Ramazan orucunun etkilerinin değerlendirildiği deneylerin gerçekleştirilmesi için 10'ar kişi olmak üzere toplamda 20 gönüllü bireyin dahil edildiği çalışma, İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde yürütülmüştür.

7.1 Mononükleer Hücre İzolasyonunun ve Mitokondriyal Aktivite Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi

Literatürde, bağışıklık hücrelerinin (monosit, lenfosit, nötrofil ve trombositler) biyoenerjetik sağlığının izlenmesinin, bir bireyin genel biyoenerjetik sağlığını ve metabolik durumunu değerlendirmek için potansiyel olarak yararlı bir tanı aracı olabileceği ifade edilmektedir (3, 54). Bu yaklaşımın prognostik veya tanısal değere sahip olup olmadığını belirlemek için yüksek verimli bir analiz yöntemi ve tutarlı bir hücre hazırlık yönteminin gerekliliğinin altı çizilmiştir (6). Bu nedenle bu tez çalışmasında öncelikle kullanılacak mononükleer kan hücrelerinin izolasyonu için tutarlı bir yöntem geliştirilmiş ve daha sonra enerji metabolizması ölçüm cihazıyla yapılacak Mito Stres Test koşullarını optimize hale getirmek için çalışılmıştır.

Mitokondriyal aktivite ölçümünde optimize edilmesi gereken koşullardan ilki özel mikropalakaya ekilecek hücre sayısıdır. Ölçümlerdeki sapmaları minimuma indirmek ve tutarlı sonuçlar almak için mikropalakaya ekilen hücrelerin eşit ve tek bir tabaka şeklinde yayılmaları, yapışmış olmaları önem taşımaktadır (59). Üretici firma, hücrelerin yapışması için mikropalakanın CellTak adlı immünojenik olmayan bir hücre dışı matris protein preparatı ile kaplanmasını önermektedir (101). Ancak bu maddenin maliyetinin yüksek olması nedeniyle literatürde alternatif olarak poli-D-lizin'in de

tercih edildiği görülmüştür (102, 103). Yapılan ön denemelerde başarılı olduğundan mitokondriyal aktivite ölçümlerinde kullanılacak hücre kültürü mikroplokasının kaplanması için poli-D-lizin tercih edilmiş ve yeterli olmuştur. Birçok çalışmada metabolizma ölçüm cihazının 96 kuyucuklu modeli için ekilmesi gereken mononükleer hücre sayısının 200.000 ila 400.000 arasında olması gerektiği ifade edilmektedir (6, 104). Bu tez çalışmasında ideal olduğu belirlenen 300.000 hücre sayısının literatürle tutarlı olması sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

Mito Stres Test sonuçlarının doğruluğu açısından optimize edilmesi gereken en önemli faktörlerden bir diğeri de FCCP dozudur. Daha önce de belirtildiği gibi FCCP'nin olması gerekenden daha az veya fazla kullanılması maksimal solunumun ve yedek solunum kapasitesinin olduğundan daha düşük ölçülmesine neden olmaktadır (57). Oligomisin, Rotenon ve Antimisin A ise nispeten daha esnek dozlarda kullanılabilir. Mito Stres Testi'nin gerçekleştirilmesi için her deneye özel ilaçlar üreticiden kit halinde sağlanabilmektedir. Ancak bir ölçüm metodunun rutinde bireylerin sağlık ve metabolik durumunu değerlendirmek için kullanılabilmesi için maliyetinin düşük olması da önem taşımaktadır (105). Bu nedenle kit kullanmak yerine, ilaçlar ayrı stoklar halinde temin edilerek kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda test için kullanılan dozlar kit veya stok ilaçların kullanımına, hücre sayısına göre farklılık göstermektedir. Bu tez çalışmasında olduğu gibi çeşitli çalışmalarda da (103, 106) Mononükleer hücreler için optimal FCCP dozu 1 μ M olarak belirlemiştir. Her ne kadar optimizasyonlar yapılsa da ilaçların deney esnasında bekleme süresinde uzamalar olduğunda, özellikle FCCP'nin stabilitesinde sorunlar yaşandığı görülmüş, bu nedenle Ramazan ortasındaki deneyde 5 bireyin maksimal solunum kapasiteleri hesaplanamamıştır. Veri kayıplarının ilaç yüklemesine daha erken başlanan kısımda daha fazla görülmesi, hava ve ışık maruziyetinin minimum seviyede tutulması gerekliliğini akla getirmiştir. Kit yerine stok ilaçlar kullanılan bazı çalışmalarda kullanılan dozların daha yüksek olmasının da ilaç stabilitesindeki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmektedir (68). Ölçüm esnasında ilaçların etkinliğindeki azalmaya bağlı olarak meydana gelebilecek veri kayıplarının en aza indirilmesi için optimizasyonlar yapılırken deney tasarımına göre değişen bekleme sürelerinin de dikkate alınmasının önemli olduğu görülmüştür.

Mononükleer hücrelerin izolasyon zamanı ve alınan kanların bekleme süresinin mitokondriyal aktiviteyi nasıl etkilediği bazı makalelerde öne sürülen ancak bu tez çalışmasından önce deneysel olarak test edilmeyen bir konudur. Kramer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, tam kan numunelerinin hücre ölümünü ve aktivasyonunu önlemek için 8 saat içerisinde işlendiğini, 8 saatten daha uzun süren depolama sürelerinin henüz test edilmediğini ancak değişmiş biyoenerjetik ölçümler ile sonuçlanabileceğini ve fizyolojik koşulları daha az temsil edebileceğini ifade etmiştir (6). Hücrelerin bekleme süresi arttıkça yedek solunum kapasitelerinin ve ATP üretimlerinin düştüğünü gösteren bulgularımız, bu düşüncüyü doğrulamış ve örneklerin mümkün olan en kısa sürede işlenerek ölçüme alınmasının önemini ortaya koymuştur.

7.2 Bireylerin Genel Özellikleri ve Antropometrik Ölçümleri

Bu tez çalışmasının Ramazan orucunun etkilerinin belirlenmesinin hedeflendiği ikinci kısmına, dahil edilme kriterlerini sağlayan 5 kadın ve 5 erkek toplam 10 gönüllü katılmış, 1 erkek katılımcının ilerleyen süreçte çalışmadan ayrılması nedeniyle 9 kişinin verileri analiz edilmiştir. Yaş ortalaması $24,0 \pm 3,3$ yıl olan bireylerin tamamı Ramazan ayında düzenli olarak oruç tuttuğunu ifade etmiştir. Menstrüasyon döngüsü nedeni ile daha az süre oruç tuttıkları için kadınların dahil edilmediği Ramazan çalışmaları bulunsa da (107-109), oruç tutmanın çeşitli parametreler üzerine etkilerinin incelendiği ve kadınların da dahil edildiği birçok çalışmanın (110-114) mevcut olmasına dayanılarak örneklem seçiminde cinsiyet ayırımına gidilmemiş, olası farklılıkların saptanabilmesi için veriler sunulurken kadın-erkek olarak da ayırım yapılmıştır.

Bireylerin antropometrik ölçümlerine bakıldığında; başlangıçta $65,42 \pm 10,58$ kg olan ortalama vücut ağırlığının Ramazan sonunda 1550 g azalarak $63,87 \pm 10,60$ kg'a düştüğü ($p < 0,05$), Ramazan'dan 1 ay sonra $64,76 \pm 10,94$ kg'a, 3 ay sonra ise $65,27 \pm 10,56$ kg'a yükselerek neredeyse tamamen eski haline döndüğü belirlenmiştir. Ramazan döneminde kadınlar erkeklerden 370 g daha fazla ağırlık kaybetse de aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bireylerin vücut bileşimlerinde ise anlamlı bir değişim saptanmamıştır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, Ramazan ayında oruç tutmanın vücut bileşimi ve antropometrik ölçümler üzerine farklı etkilerinin olabileceği görülmüştür (107, 115). Birçok çalışma, bu tez çalışmasının sonuçlarına benzer şekilde, Ramazan ayı sırasında kilo kaybedildiğini bildirmiştir (89, 113). Ramazan orucunu konu alan 35 farklı yayından elde edilen verileri kullanan bir meta-analizde, oruç tutmanın kadınlarda 920 g, erkeklerde 1520 g, toplamda 1240 g kilo kaybına neden olduğu gösterilmiş, bu tez çalışmasında da görüldüğü gibi Ramazan sürecinde kaybedilen vücut ağırlığının Ramazan bittikten sonra kısa bir süre içinde geri alındığı belirtilmiştir (89). Bizim çalışmamızda kadınlar daha fazla kilo kaybetse de tüm örnekleme vücut ağırlığı değişimi (-1550±1010 g) bu meta-analizin sonuçlarına oldukça yakındır. 2019 yılında 70 çalışmanın dahil edildiği daha kapsamlı bir meta-analizde de benzer şekilde Ramazan döneminde ortalama 1360 gram ağırlık kaybedildiği ancak bu değişimin kalıcı olmadığı ifade edilmiştir (116). Vücut ağırlığında görülen bu geçici azalmaların oruç sırasında sıvı alımının da kısıtlanmasına bağlı olarak gelişebilen dehidratasyona bağlı olabileceği düşünülmektedir (9).

Ürdün’de sadece kadınlarla yapılan bir çalışmada, vücut ağırlığı ve BKİ değerleri Ramazan sonunda anlamlı şekilde azalırken, vücut kas ve yağ oranları bizim çalışmamızda da olduğu gibi değişmemiştir (113). Bangladeş’te yalnızca erkekler üzerinde yapılan bir çalışmada bireylerin Ramazan ayındaki vücut ağırlıklarının ve BKİ’lerinin Ramazan ayı öncesi ve sonrasıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (108). İran’da yapılan bir çalışmada, erkekler 1200 g ağırlık kaybederken ($p<0,05$) kadınlar yalnızca 400 g ($p>0,05$) ağırlık kaybetmiştir (115). Kul ve arkadaşlarının 30 farklı çalışmayı dahil ederek gerçekleştirdiği bir meta-analizde ise Ramazan orucunun kadınların vücut ağırlığında değişime yol açmadığı, erkeklerde ise anlamlı bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. (87).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, obez bireylerin vücut ağırlıkları Ramazan sürecinde anlamlı olarak azalırken (-2900 g), sağlıklı kontrollerin vücut ağırlığındaki azalma (-800g) anlamlı bulunmamıştır (107). Fernando ve arkadaşlarının yaptığı meta-analizde de Ramazan sürecinde vücut ağırlığındaki azalmanın başlangıçtaki BKİ ile doğru orantılı olduğunun, hafif kilolu veya şişman olan bireylerin normal ağırlıktaki bireylere göre daha fazla ağırlık kaybettiğinin altı çizilmiştir (116). Ramazan sürecinde vücut ağırlığında anlamlı düşüş olduğunu gösteren başka bir çalışma, bu tez

çalışmasında da olduğu gibi Ramazan bittikten sonra tekrar artış olduğunu da göstermiştir (117) .

Ramazan sürecinde Tayland'da (114) ve Türkiye'de (118) sağlıklı bireylerle yapılan farklı çalışmalarda antropometrik ölçümler ve vücut bileşimleri anlamlı olarak değişmezken, Barkia ve arkadaşları Tunus'ta yaptıkları çalışmada bireylerin BKİ değerlerinde artış olduğunu belirlemiştir (119). Oruç tutmanın vücut ağırlığını artırabileceğini gösteren farklı çalışmalar da mevcuttur (120-122).

Ramazan orucunun neden olduğu fizyolojik değişikliklerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamadığından, sonuçlardaki farklılıklar birçok karıştırıcı faktöre bağlanabilir. Bunlar yaş, cinsiyet, etnik köken, oruç saatleri, oruç günü sayısı, iklim koşulları, kültürel etkiler, örneklem büyüklüğü, çalışma konuları, egzersiz, beslenme düzenleri ve genetik yatkınlığı içerir (87, 116, 123). Tüm bu değişkenler Ramazan ayında vücut ağırlığı ve bileşimindeki değişiklikler hakkında sonuçlar çıkarmayı zorlaştırmaktadır. Ancak bir genelleme yapmak gerekirse, literatürde Ramazan orucunun vücut ağırlığı ve BKİ değerlerinde geçici bir azalma sağladığı fikrinin daha yaygın olarak desteklendiği söylenebilir.

7.3 Enerji ve Besin Ögesi Alımları

Ramazan ayı, beslenme alışkanlıklarında ve yaşam biçiminde önemli değişiklikler meydana gelen bir dönemdir. Beslenme alışkanlıklarında görülen en büyük değişim öğün sayısındaki azalma ve 2 ana öğün arasında yaklaşık 12-19 saat süren, besin ve sıvı alımının gerçekleşmediği bir sürenin bulunmasıdır. Öğün sayısında ve yemek yemenin serbest olduğu sürede azalma olmasına karşın bazı araştırmalar bireylerin oruç tutma süresi boyunca günlük enerji alımlarını azaltma eğiliminde olmadığını göstermektedir (88, 113, 124, 125). Ancak bu süreçte günlük enerji alımının arttığını gösteren çalışmalar olduğu gibi, azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (113, 126). Ramazan ayının etkilerinin gözlendiği gruplar arasında geniş kültürel ve coğrafi çeşitlilik olması, oruç tutma süresinde ve beslenme alışkanlıklarındaki farklar vücut bileşiminde olduğu gibi diyet kompozisyonundaki değişiklikler hakkında geniş sonuçlar çıkarmayı da zorlaştırmaktadır (79, 122).

Bu tez çalışmasına katılan bireylerin diyetle aldıkları enerji ve birçok besin ögesi miktarı Ramazan ayı sırasında azalmıştır. 2019 yılında yayınlanan bir çalışmada da Ramazan ayında karbonhidratlar dışındaki tüm besin gruplarının alımında azalma olduğu gösterilmiştir (122). Oruç tutulan saatlerin uzun olması nedeniyle ana ve ara öğün sayısının azalmasının bireylerin aldığı enerji ve besin ögelerinin azalmasına neden olan faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. Ramazan sonunda en düşük seviyeye gelen enerji alımları Ramazan sonrasında tekrar artmıştır. Besin tüketim kaydı alınan 5 farklı dönem arasında, ortalama en fazla enerji Ramazan ayının ilk gününde alınmıştır. Bu durum Ramazan başında düşük olan açlığa direncin Ramazan ilerledikçe arttığını ve bireylerin bu beslenme düzenine daha fazla uyum sağlayarak besin alımlarını daha iyi kontrol edebildiklerini düşündürmektedir. Yine bu dönemdeki enerji ve besin ögesi alımındaki düşüşün nedenlerinden bir diğerinin de bireylerin Ramazan ayını kilo kaybetmek için bir fırsat olarak görerek diyet yapmalarının olabileceği düşünülmektedir.

Dönemsel ortalama enerji alımlarına bakıldığında ise Ramazan'ın başı ve sonu arasında değişimler olsa da Ramazan geneli ve dışı arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Bu sonuç, bireylerin oruç tutma süresi boyunca günlük enerji alımlarını azaltma eğiliminde olmadığını gösteren çalışmaların sonuçları ile tutarlıdır.

Ramazan sürecinde birçok besin ve besin ögesinin alımında enerji alımının düşmesiyle de bağlantılı olarak bir azalma gözlenmiş, alımı anlamlı olarak artan tek besin ögesinin ise kolesterol olduğu saptanmıştır. Ramazan sırasındaki kolesterol alımının Türkiye Beslenme Rehberi'nde (TÜBER) üst sınır olarak belirlenen 300 miligramı aştığı belirlenmiştir (127). Tunus'ta yapılan bir çalışmada da oruç tutulan dönemde bireylerin kolesterol alımının arttığı gösterilmiştir (119). Bu duruma Ramazan ayında kültürel olarak etli, yağlı yemeklerin, tereyağlı ve sütlü tatlıların daha sık tüketilmesinin neden olabileceği düşünülmektedir.

Türkiye'de yetişkin bireyler için günlük alınan enerjinin %45-60'ının karbonhidratlardan, %12-20'sinin proteinlerden, %20-35'inin yağlardan sağlanması önerilmektedir (127). Ramazan sırasında alınan enerjinin makro besin ögelerinden gelen oranları Ramazan sonrası ile karşılaştırıldığında arada fark olmadığı, tüm dönemlerde yağdan gelen enerji oranının önerilerin üzerinde olduğu görülmüştür.

7.4 Mitokondriyal Aktivite Ölçüm Sonuçları

Mononükleer kan hücreleri son yıllarda sağlık durumu ve hastalıkların biyobelirteçleri olarak yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, bu hücrelerin fonksiyonel metabolizması, özellikle de beslenme düzenindeki değişimleri takiben metabolizmalarının nasıl etkilendiği konusunda çok az şey bilinmektedir (71). Literatürde beslenme düzeninin uzun vadede vücut bileşimini, kronik hastalık riskini ve biyoenerjetik sağlığı etkileyeceği öne sürülse de bu düzendeki Ramazan orucu gibi dönemsel değişimlerin mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktivitesi üzerindeki etkileri ilk kez bu tez çalışmasında incelenmiştir.

Bu çalışma için mononükleer kan hücrelerinin seçilmesinin nedenleri; sürekli dolaşımda olmaları, vücutta geniş bir alana ulaşabilmeleri, dolaşımdaki besinler, substratlar ve hormonlardaki dalgalanmalar dahil olmak üzere birçok değişime doğrudan maruz kalmalarıdır (128). Mitokondri strese karşı oldukça hassastır ve hücresel mikroçevredeki değişikliklere dinamik olarak yanıt verir. Dolayısıyla bütün bu değişimler potansiyel olarak kan hücre metabolizmasını etkileyebilir ve gen ekspresyon profillerini değiştirebilir (54, 129). Diğer tüm organlarda olduğu gibi mononükleer kan hücrelerinin de bu değişikliklere adapte olması gereklidir (130). Daha da önemlisi, organların çoğunun dolaşımdaki besin maddeleri ve hormonlarla teması vaskülarizasyona ve kan dolaşımındaki değişikliklere bağlı olsa da kan hücreleri sıvılar tarafından kuşatıldığı için kandan doğrudan etkilenir. Modifiye edilmiş bir beslenme ortamına kronik maruz kalma durumundaki mononükleer kan hücresi transkriptomikleri, diyabet (131), obezite (132) veya insülin direnci (133) gibi metabolizma ile ilişkili birçok hastalığın biyobelirteçlerini keşfetmek için kullanılmıştır.

Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada, mononükleer kan hücrelerinin bir kontrol test yemeğine metabolik tepkileri değerlendirilmiş ve bu hücrelerin biyokimyasal seviyede dolaşımdaki besin ve hormonların etkisi ile çok kısa bir süre içinde metabolik aktivitelerini değiştirebildikleri ve adipoz doku ile benzer yanıt verdikleri gösterilmiştir. Mononükleer hücre metabolizmasının, özellikle kısa süreli (postprandiyal) değişimler sırasında, bir bireyin tüm vücut metabolik durumunu değerlendirmek için kullanılabileceği ifade edilmiştir (71).

Bu tez çalışmasında Metabolizma Ölçüm Cihazı kullanılarak yapılan ölçümler sonucunda bazal solunum, ATP üretimi, maksimal solunum ve yedek solunum kapasitelerinin Ramazan orucu tutulan dönemde anlamlı olarak düştüğü, bu değişimlerin kalıcı olmadığı, normal beslenme düzenine dönülmesi ile birlikte bu değerlerin tekrar yükselişe geçtiği saptanmıştır. Cinsiyete göre değerlendirilme yapıldığında kadın ve erkekler arasında da bu değişimler konusunda farklılıklar olduğu, Ramazan sürecinde ATP üretimi erkeklerde anlamlı olarak düşerken kadınlarda değişmediği, her iki cinsiyette de Ramazan sonunda azalan maksimal solunumun kadınlarda Ramazan ayının bitiminden bir ay geçtikten sonra eski haline döndüğü ancak erkeklerde 3 ay sonra dahi Ramazan ayının başına göre düşük kaldığı belirlenmiştir. Bu farklılık kadınların 29 günlük süreçte oruç tutmaya ara verdikleri dönemler olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Literatürde henüz Ramazan orucu gibi aralıklı açlık uygulamalarının mitokondriyal aktivite üzerindeki etkileri bu yöntem ile ölçülmemiştir, bu nedenle ilk kez bu tez çalışmasında elde edilen sonuçları karşılaştırmak ve yorumlamak zorlaşmaktadır. Hücrelerin normal şartlar altındaki oksijen tüketim durumunu gösteren bazal solunum temelde ATP üretimi veya proton kaçağı ile sonuçlanmaktadır. Katılımcıların hücrelerinde proton kaçağı hemen hemen hiç olmadığı için, bazal solunumun hepsi ATP üretimi ile sonuçlanmaktadır bu nedenle iki parametre aynı olarak kabul edilebilir. ATP üretiminin ve bazal solunumun düşmesi kalori kısıtlaması, substrat yetersizliği veya düşük enerji gereksinimine bağlanabilmektedir (3). Hücrelerin Ramazan sürecinde azalan vücut ağırlığı ve enerji alımına bir yanıt olarak ATP üretimlerini düşürmüş olmaları muhtemeldir.

Maksimal solunum, hücrenin stres veya artan ihtiyaç durumunda ATP üretimini en fazla hangi seviyeye kadar artırabileceğini gösteren bir parametredir. Maksimal solunum ile bazal solunum arasındaki fark ise hücrenin yedek solunum kapasitesini göstermektedir (54, 134). Literatürde bu parametrelerdeki düşüşler yaşlanma, artan oksidatif stres ve birçok patoloji ile ilişkilendirilse de (4, 135, 136), mitokondriyal aktivitedeki değişimlerin birden fazla nedene bağlı olabileceği, hücre ve deney kapsamında yorum yapmanın önemli olduğu ifade edilmektedir (57). Substrat yetersizliği ve kalori kısıtlaması maksimal solunum kapasitesi ve yedek solunum kapasitesinde de düşüşe neden olabilecek etmenler arasında yer almaktadır

(3, 134). Bu tez çalışmasında değerlendirilmese de gerçekleştirilen bazı Ramazan çalışmalarında kan glikozu ve lipitlerinin düştüğü gösterilmiştir (107, 112, 137). Bu değişimlerin de metabolik aktivitede farklılık yaratmış olması muhtemeldir.

Monosit ve lenfositlerdeki biyoenerjetik değişiklikler, inflamatuvar süreç sırasında değişen biyolojileri ile de bağlantılı olabilmektedir (138). Solunum zinciri kompleksleri de dahil olmak üzere mitokondrinin makromolekülleri, enflamasyona eşlik eden oksidatif hasara karşı hassastır (3). Artan inflamasyon (IL-6 seviyeleri) durumunda maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesinin arttığını gösteren çalışmalar olduğu gibi (70), azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (2). Aralıklı oruç uygulamaları oksidatif stres ve inflamasyon (IL-6, CRP) ile ilişkili biyobelirteçlerin seviyelerinde iyileşme ile ilişkilendirildiğinden, bu biyobelirteçlerin seviyelerindeki muhtemel değişimler de mitokondriyal aktiviteyi etkileyebilecek faktörler arasına dahil edilebilir (2).

Yapılan çalışmalarda mononükleer kan hücrelerinde enerji metabolizmasının merkezinde bulunan genlerin ifadesinin de beslenme koşulları tarafından değiştirilebileceği gösterilmiş, bu hücrelerin deney hayvanlarında gıda alımına ve vücut ağırlığının korunmasına metabolik adaptasyonları karakterize etmek için uygun bir potansiyel model olarak görüldüğü ifade edilmiştir (128).

Özetle bireysel farklılıklar söz konusu olsa da genel olarak Ramazan orucu, mononükleer kan hücre metabolizmasını geri dönüşümlü olarak değiştirmektedir. Ramazan sürecinde düşüş görülen bazal solunum, ATP üretimi, maksimal solunum ve yedek solunum kapasitesindeki değişimlerin kalıcı olmayıp Ramazan sonrasında eski haline dönmesi mitokondriyal aktivitedeki değişimlerin bir patoloji veya kalıcı mitokondriyal hasardan ziyade dolaşımdaki besin, substrat, hormon, inflamatuvar sitokinler veya oksidatif stres belirteçleri gibi faktörlerdeki değişimlere gösterilen bir adaptasyon olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir.

7.5 Çalışmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızın birkaç sınırlaması bulunmaktadır. Bunlardan ilki, hücrelerin aynı gün ve kısıtlı sürede izole edilerek teste alınması gerektiğinden dolayı örneklem

sayısının küçük olmasıdır. Bireysel farklılıklar söz konusu olduğundan, çıkan sonuçların tüm popülasyona genellenebilmesi için deneylerin daha büyük bir örnekleme tekrarlanması gereklidir. Diğer bir sınırlılık ise Ramazan ortasında yapılan mitokondriyal aktivite ölçümünde FCCP'nin etkinliğinde problem yaşanması nedeniyle birçok kişiden ölçüm alınamaması, bu gündeki ölçümlerin istatistiklere dahil edilememesidir. Vücut bileşimi, enerji alımı ve mitokondriyal aktiviteyi etkileyebilecek olan faktörlerin daha net olarak ortaya çıkarılabilmesi için biyokimyasal ölçümlerin ve fiziksel aktivite durumunun takip edilmemiş olması da çalışmayı sınırlı kılmaktadır.



8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında insan kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin ölçümünde kullanılabilecek tutarlı bir metodun geliştirilmesi ve sağlıklı bireylerde Ramazan orucunun bu aktivite üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmış olup aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Öncelikle mononükleer kan hücrelerinin izolasyonu için Percoll kullanılarak gerçekleştirilen bir protokol geliştirilmiş, bu protokol ile %88-89 oranında lenfosit, %9-10 oranında monosit içeren bir mononükleer hücre popülasyonu elde edildiği belirlenmiştir.
- Hücresel düzeyde mitokondriyal fonksiyonun ölçümüne olanak sağlayan Seahorse XFe96 Hücre Metabolizması Ölçüm Cihazı kullanılarak yapılacak Mito Stres Testi için gereken optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Her kuyucuğa ekilecek optimal hücre sayısının 300.000 olduğu saptanmıştır.
- Ekilen 300.000 mononükleer hücrenin maksimal solunumunun doğru bir şekilde ölçülebilmesi için kullanılması gereken FCCP dozunun 1 μ M olduğuna karar verilmiştir.
- Kandan izole edilen mononükleer hücrelerin bekleme süresi arttıkça bazal solunum, yedek solunum kapasitesi ve ATP üretimlerinin azaldığı belirlenmiştir. Hücre izolasyonlarının testle aynı günde ve mümkün olan en kısa sürede gerçekleştirilmesinin oldukça önemli olduğu gösterilmiştir.
- Çalışmanın Ramazan orucu kısmında, herhangi bir hastalığı bulunmayan, sigara içmeyen 5 kadın, 4 erkek toplam 9 kişinin verileri analiz edilmiştir. Bireylerin yaş ortalaması $24,0 \pm 3,3$ yıldır.
- Ramazan sonunda vücut ağırlığı ve BKİ değerleri Ramazan ayının 1. Gününe kıyasla anlamlı olarak azalırken ($p < 0,05$), bireylerin kas ve yağ oranlarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p > 0,05$).
- Kadınlar Ramazan ayında ortalama 1720 ± 1370 g ağırlık kaybederken, erkekler ortalama 1350 ± 350 g zayıflamıştır.
- Ramazan sırasında görülen kilo kayıpları kalıcı olmamış, Ramazan ayının bitiminden sonra tekrar artarak eski haline dönmüştür.

- Bireylerin Ramazan sonundaki enerji alımları ($1852,8 \pm 605,6$ kkal), Ramazan'ın birinci ($2343,4 \pm 1262,0$) ve 15. ($2162,0 \pm 773,7$) gününe göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$).
- Karbonhidrat, protein, yağ, lif, kolesterol, A, C vitaminleri, sodyum, kalsiyum ve demir alımları Ramazan ayının sonuna doğru bir düşüş, Ramazan sonrasında ise yükselme eğilimi göstermiştir ancak ölçümler arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
- En fazla enerji ($2343,4 \pm 1262,0$ kkal) ve kolesterol ($439,3 \pm 261,1$ mg) Ramazan'ın 1. gününde alınmıştır.
- Ramazan dönemi ($2119,4 \pm 841,1$) ve dışı ($2043,0 \pm 463,3$) olarak genel ikili karşılaştırma yapıldığında enerji alımının farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p > 0,05$).
- Bireylerin kanlarından izole edilen mononükleer hücrelerin bazal solunumu Ramazan ortası ($17,55 \pm 4,73$ pmol/dk) ve sonunda ($14,24 \pm 4,02$ pmol/dk) Ramazan'ın ilk gününe ($22,49 \pm 5,19$ pmol/dk) kıyasla daha düşük bulunmuş ($p > 0,05$), Ramazan ayının bitiminden 1 ay sonra tekrar yükselmiştir.
- Ramazan sonunda bireylere ait mononükleer hücrelerin bazal solunum, ATP üretimi ve yedek solunum kapasiteleri Ramazan'ın 1. gününe göre sırasıyla %34,4, %19,6 ve %55 oranında azalmıştır.
- Ramazan sırasında antropometrik ölçümler, enerji ve besin ögesi alımlarındaki değişimlerin olduğu gibi mitokondriyal aktivite parametrelerinde görülen değişimlerin de kalıcı olmadığı, Ramazan orucu tutulan dönem bittikten sonra ölçüm sonuçlarının tekrar yükseldiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak Ramazan orucu, sağlıklı bireylerde vücut ağırlığını, enerji alımını ve mononükleer kan hücrelerinin mitokondriyal aktivitesini geri dönüşümlü olarak değiştirmektedir. Görülen değişimleri açıklayabilmek için, daha büyük örneklem ile, gerekli biyokimyasal testler yapıp, gen ekspresyonları ve oksidatif stres seviyeleri incelenerek gerçekleştirilecek daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Mononükleer kan hücreleri beslenme ile ilişkili değişiklikleri yansıtmada konusunda potansiyele sahiptir ve bu tez çalışmasında geliştirilen protokollerin farklı koşullarda test edilmesi beslenme ve metabolizma ilişkisinin hücresel düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *J Current biology*. 16(14);R551-R60,2006.
2. Tyrrell DJ, Bharadwaj MS, Van Horn CG, Marsh AP, Nicklas BJ, Molina AJ, et al. Blood-cell bioenergetics are associated with physical function and inflammation in overweight/obese older adults. *Experimental gerontology*. 70;84-91,2015.
3. Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Benavides GA, Mitchell T, Dranka BP, et al. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clinical science (London, England : 1979)*. 127(6);367-73,2014.
4. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radical Biology Medicine*. 51(9);1621-35,2011.
5. Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Johnson MS, Hardy RW, Ballinger SW, et al. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Lab Invest*. 93(6);690-700,2013.
6. Kramer PA, Chacko BK, Ravi S, Johnson MS, Mitchell T, Darley-Usmar VM. Bioenergetics and the oxidative burst: protocols for the isolation and evaluation of human leukocytes and platelets. *JoVE*. (85);e51301,2014.
7. Jones N, Piasecka J, Bryant AH, Jones RH, Skibinski DO, Francis NJ, et al. Bioenergetic analysis of human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and experimental immunology*. 182(1);69-80,2015.
8. Lessan N, Ali T. Energy Metabolism and Intermittent Fasting: The Ramadan Perspective. *Nutrients*. 11(5);1192,2019.
9. Meo SA, Hassan A. Physiological changes during fasting in Ramadan. *J Pak Med Assoc*. 65(5 Suppl 1);S6-14,2015.
10. Senior KR. *Blood: physiology and circulation: The Rosen Publishing Group, Inc; 2010. Series.*
11. Chiu P-L, Chang C-H, Lin Y-L, Tsou P-H, Li B-R. Rapid and Safe Isolation of Human Peripheral Blood B and T Lymphocytes through Spiral Microfluidic Channels. *Scientific Reports*. 9(1);8145,2019.
12. Han X, Wang C, Liu Z. Red Blood Cells as Smart Delivery Systems. *Bioconjugate Chemistry*. 29(4);852-60,2018.
13. Rich RR, Chaplin DD. The human immune response. *Clinical Immunology: Elsevier*. p. 3-17. e1. 2019.
14. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. 29(1);17-24,2015.
15. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 132(4);631-44,2008.
16. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood Reviews*. 125(17);2605-13,2015.
17. Ng AP, Alexander WS. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery*. 3;17002,2017.
18. Betts JG, DeSaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse DH, et al. *Anatomy and physiology*.2014.
19. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of*

Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Cham: Springer International Publishing. p. 161-7. 2015.

20. Pourahmad J, Salimi A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res.* 14(4);979-,2015.
21. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 125(2 Suppl 2);S3-S23,2010.
22. Aydın İ, Ağılı M, Aydın FN, Kurt YG, Çaycı T, Taş A, et al. Farklı yaş gruplarında nötrofil/lenfosit oranı referans aralıkları. *Gülhane Tıp Derg.* 57;414-8,2015.
23. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology.* 9(5);503,2008.
24. Karlmark K, Tacke F, Dunay I. Monocytes in health and disease—Minireview. *European Journal of Microbiology Immunology.* 2(2);97-102,2012.
25. Monie TP. Section 1 - A Snapshot of the Innate Immune System. In: Monie TP, editor. *The Innate Immune System: Academic Press.* p. 1-40. 2017.
26. Feher JJ. *Quantitative human physiology: an introduction: Academic press; 2017. Series.*
27. Koopman WJH, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *32(1);9-29,2013.*
28. TeSlaa T, Teitell MA. Chapter Five - Techniques to Monitor Glycolysis. In: Galluzzi L, Kroemer G, editors. *Methods Enzymol.* 542: Academic Press. p. 91-114. 2014.
29. Venugopal SK, Jialal I. Physiology, Glucagon. *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing.* p. 2019.
30. Litwack G. *Glycolysis and Gluconeogenesis. Human Biochemistry.: Academic Press; 2017. Series.*
31. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism.* 298(2);E141-E5,2009.
32. Murray RK, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Harper's illustrated biochemistry.* 28: Citeseer; 2009. Series.
33. Kuo T, McQueen A, Chen T-C, Wang J-C. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Glucocorticoid Signaling: Springer.* p. 99-126. 2015.
34. Salway JG. *Metabolism at a Glance: John Wiley & Sons; 2016. Series.*
35. Stauffer S, Gardner A, Ungu DAK, López-Córdoba A, Heim M. Cellular Respiration. *Labster Virtual Lab Experiments: Basic Biology: Springer.* p. 43-55. 2018.
36. Bar-Even A, Flamholz A, Noor E, Milo R. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nature chemical biology.* 8(6);509,2012.
37. Harris R. Glycolysis Overview. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition: Elsevier Inc.* p. 443-7. 2013.
38. Picard M, Wallace DC, Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion.* 30;105-16,2016.
39. Tzagoloff A. *Mitochondria: Springer Science & Business Media; 2012. Series.*
40. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell.* 148(6);1145-59,2012.
41. Pintus F, Floris G, Rufini A. Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany NY).* 4(11);734-41,2012.

42. Munn EA. The structure of mitochondria: Academic Press; 2014. Series.
43. Nigel Turner (June 26th 2013). Mitochondrial Metabolism and Insulin Action, Type 2 Diabetes, Kazuko Masuo, IntechOpen, DOI: 10.5772/56449. Available from: <https://www.intechopen.com/books/type-2-diabetes/mitochondrial-metabolism-and-insulin-action>.
44. Bratic A, Larsson N-G. The role of mitochondria in aging. *The Journal of clinical investigation*. 123(3);951-7,2013.
45. Castellanos E, Lanning NJ. Phosphorylation of OXPHOS Machinery Subunits: Functional Implications in Cell Biology and Disease. *Yale J Biol Med*. 92(3);523-31,2019.
46. Koopman WJ, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO journal*. 32(1);9-29,2013.
47. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International journal of molecular medicine*. 44(1);3-15,2019.
48. Hunte C, Zickermann V, Brandt U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science*. 329(5990);448-51,2010.
49. Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Pacak K, Neuzil J. Mitochondrial complex II: at the crossroads. *Trends in biochemical sciences*. 42(4);312-25,2017.
50. Fernández-Vizarra E, Zeviani M. Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Frontiers in genetics*. 6;134,2015.
51. Kadenbach B, Huettemann M. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*. 24;64-76,2015.
52. Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease*. 35(2);211-25,2012.
53. Jang DH, Greenwood JC, Spyres MB, Eckmann DM. Measurement of mitochondrial respiration and motility in acute care: sepsis, trauma, and poisoning. *Journal of intensive care medicine*. 32(1);86-94,2017.
54. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*. 435(2);297-312,2011.
55. Nicholls DG, Darley-Usmar VM, Wu M, Jensen PB, Rogers GW, Ferrick DA. Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *JoVE*. (46);e2511,2010.
56. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in biochemistry*. 47;53-67,2010.
57. Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol*. 547: Elsevier. p. 309-54. 2014.
58. Kenwood BM, Weaver JL, Bajwa A, Poon IK, Byrne FL, Murrow BA, et al. Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane. *Molecular metabolism*. 3(2);114-23,2014.
59. Van der Windt GJ, Chang CH, Pearce EL. Measuring bioenergetics in T cells using a Seahorse extracellular flux analyzer. *Current protocols in immunology*. 113(1);3.16 B. 1-3. B. 4,2016.
60. Gupta RC, Mukherjee IRM, Malik JK, Doss RB, Dettbarn W-D, Milatovic D. Insecticides. *Biomarkers in toxicology*: Elsevier. p. 455-75. 2019.

61. Soderstrom K, Baum G, Kordower J. Animal models of Parkinson's disease. 2009.
62. Ma X, Jin M, Cai Y, Xia H, Long K, Liu J, et al. Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy. *Chem Biol.* 18(11);1474-81,2011.
63. Tan B, Xiao H, Li F, Zeng L, Yin Y. The profiles of mitochondrial respiration and glycolysis using extracellular flux analysis in porcine enterocyte IPEC-J2. *Anim Nutr.* 1(3);239-43,2015.
64. Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology.* 26(3);192-205,2011.
65. Hartman M-L, Shirihai OS, Holbrook M, Xu G, Kocherla M, Shah A, et al. Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus. *Vascular medicine.* 19(1);67-74,2014.
66. Maynard S, Keijzers G, Gram M, Desler C, Bendix L, Budtz-Jorgensen E, et al. Relationships between human vitality and mitochondrial respiratory parameters, reactive oxygen species production and dNTP levels in peripheral blood mononuclear cells. *Aging (Albany NY).* 5(11);850-64,2013.
67. Czajka A, Ajaz S, Gnudi L, Parsade CK, Jones P, Reid F, et al. Altered mitochondrial function, mitochondrial DNA and reduced metabolic flexibility in patients with diabetic nephropathy. *EBioMedicine.* 2(6);499-512,2015.
68. Tomas C, Brown A, Strassheim V, Elson J, Newton J, Manning P. Cellular bioenergetics is impaired in patients with chronic fatigue syndrome. *PLoS One.* 12(10);e0186802,2017.
69. Omodei D, Pucino V, Labruna G, Procaccini C, Galgani M, Perna F, et al. Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism.* 64(3);396-405,2015.
70. Calton EK, Keane KN, Raizel R, Rowlands J, Soares MJ, Newsholme P. Winter to summer change in vitamin D status reduces systemic inflammation and bioenergetic activity of human peripheral blood mononuclear cells. *Redox Biology.* 12;814-20,2017.
71. Zeng Y, David J, Rémond D, Dardevet D, Savary-Auzeloux I, Polakof S. Peripheral Blood Mononuclear Cell Metabolism Acutely Adapted to Postprandial Transition and Mainly Reflected Metabolic Adipose Tissue Adaptations to a High-Fat Diet in Minipigs. *Nutrients.* 10(11);1816,2018.
72. Chacko BK, Zhi D, Darley-USmar VM, Mitchell T. The Bioenergetic Health Index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes. *Redox Biology.* 8;43-50,2016.
73. Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, Ballinger S, Dell'Italia L, Zhang J, et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological chemistry.* 393(12);1485-512,2012.
74. Baysal A. *Beslenme: Hatiboğlu Basım ve Yayım; 2011. Series.*
75. Ruggiero C, Metter EJ, Melenovsky V, Cherubini A, Najjar SS, Ble A, et al. High basal metabolic rate is a risk factor for mortality: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63(7);698-706,2008.
76. Altın Z. The Physiology of Hunger. *The Journal of Tepecik Education Research Hospital.* 27(3);179-85.
77. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Food intake and starvation induce metabolic changes. *Biochemistry.* 2002.

78. Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism*. 25(2);262-84,2017.
79. Trepanowski JF, Bloomer RJ. The impact of religious fasting on human health. *Nutrition journal*. 9;57,2010.
80. Patterson RE, Sears DD. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. 37(1);371-93,2017.
81. Akpınar Ş. Aralıklı Açlık Diyetlerinin Ağırlık Denetimi ve Sağlık Çıktıları Üzerindeki Etkisi. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*. 10(2);177-83.
82. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 161(1);106-18,2015.
83. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, Harvie M, Longo VD, Malaisse WJ, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(47);16647-53,2014.
84. Traba J, Kwarteng-Siaw M, Okoli TC, Li J, Huffstutler RD, Bray A, et al. Fasting and refeeding differentially regulate NLRP3 inflammasome activation in human subjects. *The Journal of clinical investigation*. 125(12);4592-600,2015.
85. Johnstone AJ. Fasting—the ultimate diet? *Obesity Reviews*. 8(3);211-22,2007.
86. Burke LM, King C. Ramadan fasting and the goals of sports nutrition around exercise. *Journal of Sports Sciences*. 30(sup1);S21-S31,2012.
87. Kul S, Savaş E, Öztürk ZA, Karadağ G. Does Ramadan Fasting Alter Body Weight and Blood Lipids and Fasting Blood Glucose in a Healthy Population? A Meta-analysis. *Journal of Religion and Health*. 53(3);929-42,2014.
88. Rafie C, Sohail M. Fasting during Ramadan: nutrition and health impacts and food safety recommendations.2016.
89. Sadeghirad B, Motaghipisheh S, Kolahdooz F, Zahedi MJ, Haghdoost AA. Islamic fasting and weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Public health nutrition*. 17(2);396-406,2014.
90. Sadiya A, Ahmed S, Siddieg HH, Babas IJ, Carlsson M. Effect of Ramadan fasting on metabolic markers, body composition, and dietary intake in Emiratis of Ajman (UAE) with metabolic syndrome. *Diabetes, metabolic syndrome obesity: targets therapy*. 4;409,2011.
91. Baysal A, Aksoy M, Besler H, Bozkurt N, Keçecioglu S, Merdol T, et al. *Diyet El Kitabı*. 5. baskı. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.2008.
92. *Bebispro for Windows*, Stuttgart, Germany; Turkish Version (Bebis 4), Istanbul 2004. Program Uses Data From Bundeslebensmittelschlüssel (BLS) 11.3 and USDA 15.
93. Jia Y, Xu H, Li Y, Wei C, Guo R, Wang F, et al. A modified Ficoll-Paque gradient method for isolating mononuclear cells from the peripheral and umbilical cord blood of humans for biobanks and clinical laboratories. *Biopreservation biobanking*. 16(2);82-91,2018.
94. Betsou F, Gaignaux A, Ammerlaan W, Norris PJ, Stone M. Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications. *Current Pathobiology Reports*. 7(2);17-27,2019.
95. Pertoft H, Laurent TC, Låås T, Kågedal LJ. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical biochemistry*. 88(1);271-82,1978.
96. Chen X, Williams JA. Purification of pancreatic zymogen granules using percoll gradients. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*.2010.

97. Pertoft H, Johnsson A, Wärmegård B, Seljelid R. Separation of human monocytes on density gradients of percoll®. *Journal of immunological methods.* 33(2);221-9,1980.
98. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Mammalian cell viability: Springer.* p. 7-12. 2011.
99. *Manual Cell Counting With Neubauer Chamber.*
100. Karaboz İ, Kayar E, Akar S. Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi.* 6(2);1-18,2008.
101. Technologies A. Immobilization of Non-Adherent Cells with Cell-Tak for Assay on the Agilent Seahorse XFe/XF96 or XFp Analyzer.
102. Wolfe H, Hannigan C, O'Sullivan M, Carroll LB, Brennan S, Lawlor B, et al. A shift to glycolysis accompanies the inflammatory changes in PBMCs from individuals with an IQ-discrepant memory. *Journal of Neuroimmunology.* 317;24-31,2018.
103. Nicholas D, Proctor EA, Ip BC, Habib C, Ritou E, Grammatopoulos TN, et al. Advances in the quantification of mitochondrial function in primary human immune cells through extracellular flux analysis. 12(2);e0170975,2017.
104. Kang J-G, Wang P-y, Hwang PM. Cell-based measurements of mitochondrial function in human subjects. *Methods Enzymol.* 542;209-21,2014.
105. Maxim LD, Niebo R, Utell MJ. Screening tests: a review with examples. *Inhal Toxicol.* 26(13);811-28,2014.
106. Tyrrell DJ, Bharadwaj MS, Jorgensen MJ, Register TC, Shively C, Andrews RN, et al. Blood-based bioenergetic profiling reflects differences in brain bioenergetics and metabolism. *Oxidative medicine cellular longevity.* 2017,2017.
107. Ünalacak M, Kara IH, Baltacı D, Erdem Ö, Bucaktepe PGE. Effects of Ramadan fasting on biochemical and hematological parameters and cytokines in healthy and obese individuals. *Metabolic syndrome related disorders.* 9(2);157-61,2011.
108. Rahman M, Rashid M, Basher S, Sultana S, Nomani MZ. Improved serum HDL cholesterol profile among Bangladeshi male students during Ramadan fasting. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit.* 10(1-2);131-7,2004.
109. Haouari M, Haouari-Oukerro F, Sfaxi A, Rayana MB, Kaabachi N, Mbazaa A. How Ramadan fasting affects caloric consumption, body weight, and circadian evolution of cortisol serum levels in young, healthy male volunteers. *J Hormone metabolic research.* 40(08);575-7,2008.
110. Waterhouse J, Alkib L, Reilly T. Effects of Ramadan upon fluid and food intake, fatigue, and physical, mental, and social activities: a comparison between the UK and Libya. *Chronobiology international.* 25(5);697-724,2008.
111. Nematy M, Alinezhad-Namaghi M, Rashed MM, Mozhdehifard M, Sajjadi SS, Akhlaghi S, et al. Effects of Ramadan fasting on cardiovascular risk factors: a prospective observational study. *Nutrition journal.* 11(1);69,2012.
112. Al Hourani HM, Atoum MF, Akel S, Hijjawi N, Awawdeh S. Effects of Ramadan fasting on some haematological and biochemical parameters. *J Jordan J Biol Sci.* 2(3);103-8,2009.
113. Al-Hourani HM, Atoum MF. Body composition, nutrient intake and physical activity patterns in young women during Ramadan. *Singapore medical journal.* 48(10);906-10,2007.

114. Ongsara S, Boonpol S, Prompalad N, Jeenduang N. The Effect of Ramadan Fasting on Biochemical Parameters in Healthy Thai Subjects. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 11(9);Bc14-bc8,2017.
115. Fakhrzadeh H, Larijani B, Sanjari M, Baradar-Jalili R, Amini MR. Effect of Ramadan fasting on clinical and biochemical parameters in healthy adults. *Annals of Saudi medicine*. 23(3-4);223-6,2003.
116. Fernando HA, Zibellini J, Harris RA, Seimon RV, Sainsbury A. Effect of Ramadan Fasting on Weight and Body Composition in Healthy Non-Athlete Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 11(2);478,2019.
117. Hajek P, Myers K, Dhanji A-R, West O, McRobbie H. Weight change during and after Ramadan fasting. *Journal of Public Health*. 34(3);377-81,2011.
118. Aksungar FB, Eren A, Ure S, Teskin O, Ates G, metabolism. Effects of intermittent fasting on serum lipid levels, coagulation status and plasma homocysteine levels. *J Annals of nutrition metabolism*. 49(2);77-82,2005.
119. Barkia A, Mohamed K, Smaoui M, Zouari N, Hammami M, Nasri M, et al. Change of diet, plasma lipids, lipoproteins, and fatty acids during Ramadan: a controversial association of the considered Ramadan model with atherosclerosis risk. *Journal of health, population*. 29(5);486-93,2011.
120. Souissi N, Souissi H, Sahli S, Tabka Z, Dogui M, Ati J, et al. Effect of Ramadan on the Diurnal Variation in Short-Term High Power Output. *Chronobiology International*. 24(5);991-1007,2007.
121. Lamine F, Bouguerra R, Jabrane J, Marrakchi Z, Ben MR, Ben CS, et al. Food intake and high density lipoprotein cholesterol levels changes during ramadan fasting in healthy young subjects. *La Tunisie Médicale*. 84(10);647-50,2006.
122. Bakhotmah BA. The puzzle of self-reported weight gain in a month of fasting (Ramadan) among a cohort of Saudi families in Jeddah, Western Saudi Arabia. *Nutrition journal*. 10;84,2011.
123. Trepanowski JF, Bloomer RJ. The impact of religious fasting on human health. *Nutrition journal*. 9(1);57,2010.
124. Yeoh EC, Zainudin SB, Loh WN, Chua CL, Fun S, Subramaniam T, et al. Fasting during Ramadan and Associated Changes in Glycaemia, Caloric Intake and Body Composition with Gender Differences in Singapore. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 44(6);202-6,2015.
125. Norouzy A, Salehi M, Philippou E, Arabi H, Shiva F, Mehrnoosh S, et al. Effect of fasting in Ramadan on body composition and nutritional intake: a prospective study. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*. 26 Suppl 1;97-104,2013.
126. Khaled BM, Belbraouet S. Effect of Ramadan fasting on anthropometric parameters and food consumption in 276 type 2 diabetic obese women. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 29(2);62-8,2009.
127. TC Sağlık Bakanlığı. Türkiye Beslenme Rehberi, TÜBER 2015. Ankara: TC Sağlık Bakanlığı, 2016.
128. Caimari A, Oliver P, Keijer J, Palou A. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *Omics : a journal of integrative biology*. 14(2);129-41,2010.
129. Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends in Endocrinology Metabolism*. 27(2);105-17,2016.

130. Drew JE, Farquharson AJ, Horgan GW, Duthie SJ, Duthie GG. Postprandial cell defense system responses to meal formulations: stratification through gene expression profiling. *Molecular nutrition & food research*. 58(10);2066-79,2014.
131. Manoel-Caetano FS, Xavier DJ, Evangelista AF, Takahashi P, Collares CV, Puthier D, et al. Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. *Gene*. 511(2);151-60,2012.
132. Ghosh S, Dent R, Harper M-E, Gorman SA, Stuart JS, McPherson R. Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. *BMC medical genomics*. 3(1);56,2010.
133. Tangen SE, Tsinajinnie D, Nuñez M, Shaibi GQ, Mandarino LJ, Coletta DK. Whole blood gene expression profiles in insulin resistant Latinos with the metabolic syndrome. *PloS one*. 8(12);e84002,2013.
134. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *Journal of aging research*. 2012,2012.
135. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*. 48(7);905-14,2010.
136. Sansbury BE, Jones SP, Riggs DW, Darley-Usmar VM, Hill BG. Bioenergetic function in cardiovascular cells: the importance of the reserve capacity and its biological regulation. *Chemico-biological interactions*. 191(1-3);288-95,2011.
137. Nachvak SM, Pasdar Y, Pirsahab S, Darbandi M, Niazi P, Mostafai R, et al. Effects of Ramadan on food intake, glucose homeostasis, lipid profiles and body composition composition. *European Journal of Clinical Nutrition*. 73(4);594-600,2019.
138. Van der Windt GJ, Everts B, Chang CH, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity*. 36(1);68-78,2012.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.17434
Konu : Etik Kurulu Kararı

12/06/2019

Sayın Şeyma KABLAN

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 03/05/2019 tarihli 366 karar no ile onay verilen "İnsan Kan Hücrelerinde Metabolik Aktivite Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi ve Ramazan Orucunun Kan Hücre Metabolizmasına Etkisi" isimli başvurunuzun başlığını "Mononükleer Kan Hücrelerinde Mitokondriyal Aktivite Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi ve Ramazan Orucunun Bu Aktiviteye Etkisi" olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 12.06.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 983A13F3X1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.15416
Konu : Etik Kurulu Kararı

10/05/2019

Sayın Şeyma Kablan

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "İnsan Kan Hücrelerinde Metabolik Aktivite Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi ve Ramazan Orucunun Kan Hücre Metabolizmasına Etkisi" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 10.05.2019 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden FFF56C8AXF kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinçiler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU







BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan Kan Hücrelerinde Metabolik Aktivite Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi ve Ramazan Orucunun Kan Hücre Metabolizmasına Etkisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Şeyma Kablan			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Diyetisyen			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 366	Tarih: 03/05/2019				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMIRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ilknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet UÇIŞIK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban ÖLÇAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şeyma	Soyadı	Kablan
Doğum Yeri	Sultanbeyli	Doğum Tarihi	24.12.1996
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	
E-mail	skablan@medipol.edu.tr	Tel	0536 217 07 77

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi / Beslenme ve Diyetetik	2018
Lise	Özel Altnay Anadolu Lisesi	2014

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırmacı	İstanbul Medipol Üniversitesi/ REMER	2018-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi

Yabancı Dil Sınav Notu	
YÖKDİL	93,75
YDS	78,75

□□

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	86,03	87,19	74,38

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
SPSS İstatistik Programı	Çok iyi

Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2018
-------------------------------	---------------------------------------	------