T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK

DENEYSEL KRONİK UYKUSUZLUK MODELİNDE EKSOJEN MELATONİNİN GLUKOZ METABOLİZMASINA ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Tuğba KIZIL GÜL

EDİRNE-2023

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK

DENEYSEL KRONİK UYKUSUZLUK MODELİNDE EKSOJEN MELATONİNİN GLUKOZ METABOLİZMASINA ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Tuğba KIZIL GÜL

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2021/62

Tez No:

EDİRNE-2023

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK danışmanlığında doktora öğrencisi Tuğba KIZIL GÜL tarafından tez başlığı "Deneysel kronik uykusuzluk modelinde eksojen melatoninin glukoz metabolizmasına etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 09/01/2023 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Doktora Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza

JÜRİ BAŞKANI

İmza	İmza
ÜYE	ÜYE
İmza	İmza
ÜYE	ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Necdet SÜT

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK'e, Fizyoloji AD öğretim üyeleri Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR ve Doç. Dr. Oktay KAYA'ya, çalışmamızın histopatolojik incelemelerini yapan kıymetli hocam Prof. Dr. Fulya ÖZ PUYAN'a, deney aşamasında emeği geçen tüm Fizyoloji AD asistan ve doktora öğrencilerine, araştırmanın maddi desteğini sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi ile doktora eğitimim boyunca öncelikli alanlarda bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu'na ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

UYKU FİZYOLOJİSİ 3

UYKU KAYBI VE YETERSİZ UYKUNUN FİZYOLOJİK SÜREÇLERE ETKİLERİ 6

KAN GLUKOZUNUN DÜZENLENMESİ 10

GEREÇ VE YÖNTEMLER 21

BULGULAR 30

TARTIŞMA 47

SONUÇLAR 52

ÖZET 53

SUMMARY 54

KAYNAKLAR 56

ŞEKİLLER LİSTESİ 64

ÖZGEÇMİŞ 66

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP	**:**	Adenozin trifosfat
BMI	**:**	Beden kitle indeksi
DM	**:**	Diabetes mellitus
EEG	**:**	Elektroensefalografi
EMG	**:**	Elektromiyografi
EOG	**:**	Elektrookülografi
GTP	**:**	Glukoz tolerans testi
HOMA-IR	**:**	Homeostatic model assessment insülin resistance
ipGTT	**:**	İntraperitonel glukoz tolerans testi
ipİTT	**:**	İntraperitonel insülin tolerans testi
Mel	**:**	Melatonin
NREM	**:**	Non-REM
REM	**:**	Rapid Eye Movement
RMR	**:**	Resting metabolic rate
T2DM	**:**	Tip 2 Diabetes Mellitus

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet kardiyovasküler hastalıklardan ölüme kadar gidebilen ve hasta sayısının giderek arttığı küresel bir sağlık sorunudur. 2021 yılında Uluslararası Diyabet Federasyonu tarafından yayımlanan 10. Diyabet Atlasına göre, Türkiye'nin 2035 yılında diyabetin dünyada en yüksek olacağı ilk 10 ülke arasına gireceği öngörülmektedir. Türkiye'de 2021 yılına ait verilerde 20-79 yaş arası diyabetli hasta sayısının yaklaşık 9 milyon, 2030 yılında 10 milyon, 2045 yılında ise 13 milyon olacağı tahmin edilmektedir. Diyabetle ilgili toplam sağlık harcamalarının ise 2021-2030-2045 yılları itibari ile sırasıyla 9,426 milyon USD, 10,516 milyon USD, 11,731 milyon USD olacağı tahmin edilmektedir (1). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda diyabetin tedavisi ve önlenmesi için yapılacak çalışmalar önem kazanmaktadır.

Modern yaşam tarzı, zaman dilimleri arasında seyahatler ya da vardiyalı çalışma uyku saatlerinin kısalmasına ve kronik uyku yoksunluğuna sebep olmaktadır. Ülkemizde turizm, sağlık, gıda gibi sektörlerde nöbet usulü ya da vardiyalı çalışma sonucu kronik uyku kaybı problemini yaşayan kişi sayısı giderek artmaktadır. 2017 yılında Amerikan Diyabet Derneği ilk kez diyabetli hastalarda uyku sağlığının (düzeni ve süresi) tıbbi değerlendirmenin bir parçası olması gerektiğini önermiştir (2). Yapılan çalışmalar uyku bozukluklarının glukoz homeostazisini bozduğunu ve Tip 2 diyabet açısından risk oluşturduğunu göstermiştir (3).

Melatonin insanlarda gece uykusu sırasında epifiz bezinden salgılanan bir hormondur, salgılanması sirkadyen ritim gösterir (4). Melatoninin MT2 reseptörü ve diyabet arasındaki ilişkinin keşfedilmesiyle birlikte son 10 yılda diyabet ve melatonin çalışmaları hızla yapılmaya başlanmıştır. Melatoninin açlık glukozunu, glukoz toleransını ve Tip2 diyabet riskini arttırıp arttırmayacağı konusunda anlaşmazlıklar vardır (5). Yapılan bir çalışmada

melatoninin yüksek seviyelerde olmasının insülin sekresyonunu azalttığı gösterilmiş (6), başka bir çalışmada ise HbA1c seviyelerinde önemli düşüşe sebep olarak diyabette yararlı olduğu gösterilmiştir (7). Literatürde karşıt bulgular olmasına rağmen Tip2 diyabet ile mücadelede melatonin temelli tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Melatoninin glukoz metabolizmasındaki etkisini açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya gerek vardır.

Literatürdeki bu açığa katkıda bulunabilmek için biz de çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan kronik REM uykusuzluğu modelinde dışarıdan verilen melatoninin kan glukoz düzenlenmesi üzerine etkilerinin araştırılmasını amaçladık.

GENEL BİLGİLER

UYKU FİZYOLOJİSİ

Uykunun Tarihçesi

Uyku konusu bilim insanlarından önce düşünürlerin, sanatçıların, yazarların, şairlerin, heykeltıraşların dikkatini çekmiş ve üretimlerinde yer almıştır. Bilim insanlarının uykunun nedenine ve mekanizmalarına yönelik sorgulamaları ise nispeten daha geç olmuştur. Henüz neden uyuduğumuz sorusu gizemini korusa da uyku tüm memeli türlerinin evrensel bir ihtiyacıdır ve yokluğunda ciddi fizyolojik sonuçlara sebep olur.

İnsanlar yaşamlarının yaklaşık üçte birini uyuyarak geçirir. Uyku ile ilgili fizyolojik ilk açıklama M.Ö. 4. ve 5. yüzyıllarda yapılmıştır. Hipokratın tıbbi teorilerinin olduğu derlemede "uyku sırasında kan, vücudun içine doğru akar" ya da "uyanıkken insanın dışı sıcak, içi soğuk; uykuda ise tam tersidir" gibi tanımlamalar yapılmıştır (8). Homeros'un İliada destanında terbiyeci olarak bahsedilen uyku aynı dönemde ölüm ile benzer bir durum olarak görülmüştür (9).

Beyinde meydana gelen elektriksel aktivitenin kayıt edilebilmesi uyku araştırmaları açısından dönüm noktası niteliğinde olmuştur. İlk olarak Fizyolog Richard Caton tavşan beynindeki aktiviteyi kaydetmeyi başarmıştır (10). Yarım yüzyıl sonra Hans Berger'in 1929'da insan beyninde elektriksel aktiviteleri kaydetmeyi başarmasıyla (11), uyku çalışmalarında EEG kullanılmaya başlanmıştır. Loomis ve arkadaşları EEG'yi uyku çalışmalarında kullanan ilk araştırmacılar olarak 1937'de uykunun beş ayrı dönemi olduğunu tanımlamışlar ancak hızlı göz hareketlerinin olduğu REM döneminin tanımlanması biraz daha zaman almıştır (12). Aserinsky ve Kleitman 1953 yılında uyku dönemlerini, hızlı göz hareketlerinin olduğu ve olmadığı şeklinde iki ana dönem olarak tanımlamışlardır. Hızlı göz

hareketleri periyodunun uyku sırasında rastgele gerçekleşmediğini rüya görmekle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu periyodun uykuya daldıktan yaklaşık üç saat sonra ortaya çıktığı, iki saat sonra tekrarlandığını kaydetmişlerdir (13). 1957'de ise REM uykusu tanımlanmış ve uykunun birbirini izleyen periyodik dönemlerden oluştuğu gösterilmiştir. Uyku REM ve NREM olmak üzere iki ana dönem, NREM'de kendi için dört evreye (Evre 1, 2, 3, 4) olmak üzere toplam beş döneme ayrılmıştır (14). 1968 yılında Rechtschaffen ve arkadaşları, insanda uyku dönemlerinin standart terminoloji, teknik ve skorlama el kitabını (R&K kriterleri) hazırlamışlardır (15). Bu rehber 90'lı yıllara kadar poligrafik uyku değerlendirmesinin geçerli tek kılavuzu olarak kullanılmıştır.

Ancak daha sonra derin uyku dönemini kapsayan Evre 3 ve 4 dönemlerinin ayrı değerlendirilmesinin gereksiz olduğu düşünülmüş, 2007'de Amerikan Uyku Tıbbı Akademisi tarafından NREM Evre 3 ile 4 tek bir evre (Evre N3) olarak birleştirilmiştir. Böylece NREM dönemi Evre N1, N2, N3 olmak üzere üç evrede değerlendirilmeye başlanmıştır (16).

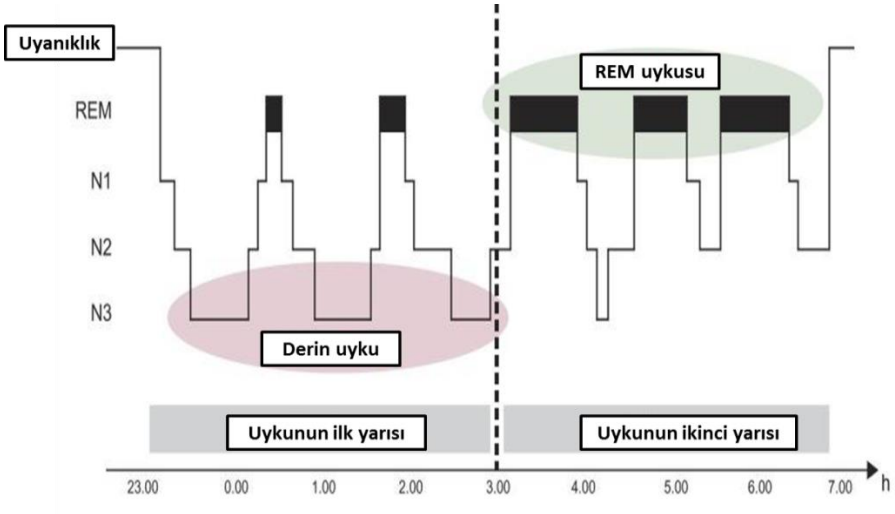
Uykunun Tanımı

Uyku uyaranlara karşı azalmış yanıt ve hareketle karakterize geri döndürülebilen, sinir sisteminin gelişim ve onarımını sağlayan doğal, fizyolojik bir süreçtir. Bir başka deyişle stereotipik postür ve türe özgü diürnal zamanlamayla karakterize bir durumdur (17). Genellikle sırt üstü yatar pozisyonda ve gözler kapalı olarak gerçekleşir. Uyku, beynin basitçe kapandığı pasif bir durum değil aksine aktif bir restorasyon olayıdır.

Uykunun Evreleri

Uyku birbirinden farklı özellikler gösteren bazı alt evrelere ayrılır (Tablo 1). Uyku evrelerini tanımlamak için poligrafik kayıtlardan faydalanılır. Bunlar beyin elektriksel aktivitesi (elektroensefalografi EEG), göz hareketleri (elektrookülografi EOG) ve kas tonusu (elektromiyografi EMG) olmak üzere eş zamanlı olarak yapılan polisomnografi kayıtlarıdır (18).

İnsanlarda uyku birbirini izleyerek tekrarlayan iki evreden oluşur. Birincisi hızlı göz hareketlerinin izlendiği REM (Rapid Eye Movement) dönemi, ikincisi de REM dışında kalan diğer dönemleri kapsayan NREM (Non-REM) dönemidir. REM döneminde beyin uyanıklıktaki kadar aktif olduğu halde vücut adeta felç olmuş gibidir. Göz hareketlerini sağlayan kaslar ve solunum kasları hariç diğer kaslarda atoni meydana gelir. Gecenin ilk yarısında NREM ikinci yarısında REM uykusu baskındır (Şekil 1).



Şekil 1. Normal fizyolojik bir uykunun evreleri (19).

Uyku birbirini takip eden döngüler şeklinde görülür (20). İlk döngü uykunun başlamasından ilk REM'in sonuna kadardır. Sonraki döngüler ilk REM'in sonundan bir sonraki REM sonuna kadardır. Her döngü 80-90 dakika sürer ve gecede 4-5 kez tekrarlanır. İlk REM genellikle uykunun başlamasından en az 80 dakika sonra görülür. Uykuya NREM Evre N1 ile başlanır. Uyanma eşiği düşüktür. Ardından Evre N2 uykuya geçilir. Daha sonra uyku derinleşir ve Evre N3 dönemi görülür. Tekrar Evre N2 döneminin görülmesi ile REM dönemi başlar. İlk REM yaklaşık 5-10 dakika süre ile görülür ve sabaha kadar REM süreleri gittikçe artar Evre N3 süreleri kısalır

Normal fizyolojik bir uykunun yaklaşık %20-25'lik bölümü REM, diğerleri NREM dönemlerinden oluşur. NREM 3 evreden oluşmaktadır.

Evre N1: Uyku NREM Evre N1 ile başlar. Yaklaşık 1-7 dakika sürer. Uykuya geçiş dönemidir. Alfa dalgası kaybolurken yerini düşük voltajlı yavaş aktivitelere bırakır, ardından verteks bölgesinde yüksek amplitüdlü keskin dalgalar belirir. Uykunun yaklaşık %2-5 bölümünü oluşturur.

Evre N2: Evre N1'den sonra görülür. Yüzeyel uyku dönemidir. Bu döneme özgü EEG DE uyku iğcikleri ve K kompleksleri görülür. Uykunun yaklaşık %50-60 bölümünü oluşturur.

Evre N3: Derin uyku dönemidir. EEG de yüksek amplütüdlü, düşük frekanslı delta dalgaları görülür. Uykunun yaklaşık %15-20 bölümünü oluşturur.

Tablo 1. NREM ve REM uyku sırasında görülen fizyolojik değişiklikler (21).

Fizyolojik süreçler	NREM	REM
Beyin aktivitesi	Uyanıklık durumuna göre azalır	NREM e göre artar
Kalp hızı	Uyanıklık durumuna göre düşer	NREM e göre artar
Kan basıncı	Uyanıklık durumuna göre düşer	NREM e göre %30 a kadar artar
Sempatik sinir sistemi aktivitesi	Uyanıklık durumuna göre azalır	Uyanıklık durumuna göre artar
Kas tonusu	Uyanıklık durumuna benzer	Kas atonisi görülür
Beyin kan akımı	Uyanıklık durumuna göre azalır	NREM e göre artar, uyanıklık durumuna benzer
Solunum hızı	Uyanıklık durumuna göre düşer	NREM e göre artar ve duraksamalar, kardiyorespiratuvar düzensizlik görülür
Havayolu direnci	Uyanıklık durumuna göre artar	Uyanıklık durumuna göre artar
Vücut sıcaklığı	Uyanıklık durumuna göre daha düşük bir ayar noktası seçilir	Termoregülasyon kaybı görülür
Cinsel uyarılma	Nadiren görülür	Ereksiyon ve klitoral genişleme görülür

Kısaltmalar: REM, Rapid eye movement; **NREM,** Non-REM.

UYKU KAYBI VE YETERSİZ UYKUNUN FİZYOLOJİK SÜREÇLERE ETKİLERİ

Uyku hem beyin fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi hem de diğer fizyolojik mekanizmaların devamı için oldukça önemlidir. Ancak çalışma şartları, sosyal yaşam ya da psikolojik nedenlerden dolayı pek çok kişi uykusuzluk sorunu yaşamaktadır. Uyku bozuklukları uluslararası rehberde yedi ana başlık altında insomnia, aşırı uykululuk hali, uykuda solunum bozuklukları, parasomniler, sirkadyen ritim uyku uyanıklık bozuklukları, uykuda hareket bozuklukları ve diğer bozukluklar olmak üzere sınıflandırılmıştır (22). Uykusuzluk, uyku yoksunluğu ya da uzamış uykululuk hali olarak tanımlanabilir. Uyku araştırmalarında uyku işlevini anlamak için total uyku kaybı ya da REM uyku yoksunluğu şeklinde çalışmalar yapılmıştır.

Yapılan çalışmalarda genel olarak uyku yoksunluğunun hipertansiyona sebep olduğu (23), kronik yaygın ağrıyla ilişkili olduğu (24), öğrenme ve bellek süreçlerini olumsuz etkilediği (25), bağışıklığı bozduğu (26), glukoz homeostazisini değiştirdiği (3) gösterilmiştir.

Uykusuzluğun Metabolik ve Endokrin Etkileri

Uyku, yaş, cinsiyet ya da ırkına bakılmaksızın insanlar için günlük karşılanması gereken temel fizyolojik bir süreçtir. Uyku düzeninin bozulması, uyku saatlerinin azalması metabolik ve endokrin sistemler üzerinde de değişikliklere sebep olmaktadır (27).

Uyku süresi ve kalitesindeki değişikliklerin obeziyete için risk faktörü oluşturduğu kabul edilmektedir. Berg ve ark.'nın 983 yaşlı bireyde (57-97 yaş aralığı) yapmış oldukları kesitsel bir çalışmada uyku süreleri aktigrafik yöntemle değerlendirilmiş ve beden kitle indeksi (BMI) ve uyku süresi arasındaki ilişki incelenmiştir. Toplam altı gecelik aktigrafik ölçümle hem kısa (<5 saat) hem de uzun (>8 saat) uyuyan yaşlı popülasyonda daha yüksek BMI ve obezite riski olduğu gösterilmiştir (28). Bir gecelik toplam uyku kaybının sonraki gündüz boyunca enerji tüketimi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya 14 sağlıklı erkek birey dâhil edilmiştir. Uykusuzluk sonrası dinlenim metabolizma hızı (RMR) ölçümlerinin normal uyuyan bireylere göre anlamlı olarak düştüğü (açlık ve tokluk sırasıyla %5 ve %20) gösterilmiştir (29). Benzer bir sonuç Hursel ve ark.'nın uykunun bölünmesinin 48 saat boyunca enerji harcamasına etkisinin ölçüldüğü çalışmada da bulunmuştur. Deneklerde uyku bölünmesinin enerji dengesi üzerine kümülatif bir etkisinin olacağı fiziksel aktivitede azalma ve aşırı kiloya yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (30). On dört günlük deneysel uyku kısıtlamasını (yalnızca 4 saatlik uyku) içeren randomize kontrollü bir çalışmada enerji harcaması, enerji alımı değerlendirilmiştir. Uyku kısıtlaması sonrası normal uykuya göre daha enerji alımında artış (308 kcal/gün), kilo alımı (0,5 kg), karın çevresi yağ ölçümünde artış (7,8 cm^2) ile sonuçlanmıştır (31). Uyku kısıtlamasının metabolizma ile ilişkili parametreler üzerine etkisinin sağlıklı yetişkinlerde incelendiği meta analizde 41 randomize kontrollü çalışma incelenmiştir (32). Buna göre uyku kısıtlaması açlık hissi ve günlük kalori alımında artma ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlara bakarak uyku süresi ve kalitesinin enerji metabolizma hızı, iştah, kilo kontrolü ve obezite arasında işlevsel bir rol oynadığı görülmektedir.

Uykunun çeşitli metabolik düzensizliklerle ilişikli olduğu düşünülmüştür. 2016 yılında yapılan bir çalışmada yetersiz uyku düzeylerinin (<6 saat) ve fazla uykunun (>10 saat) özellikle kadınlarda yüksek trigliserit, kan glukozu, kan basıncı ve HDL ile sonuçlandığı bildirilmiş, uyku süresinin kadınlarda metabolik sendrom için daha yüksek risk oluşturduğu vurgulanmıştır (33). Uzun süreli uyku (>10 saat) bir başka çalışmada da hem erkeklerde hem de kadınlarda yüksek trigliserit, kan glukozu düzeyleriyle sonuçlanmış ve metabolik sendrom için yüksek risk oluşturduğu gösterilmiştir (34).

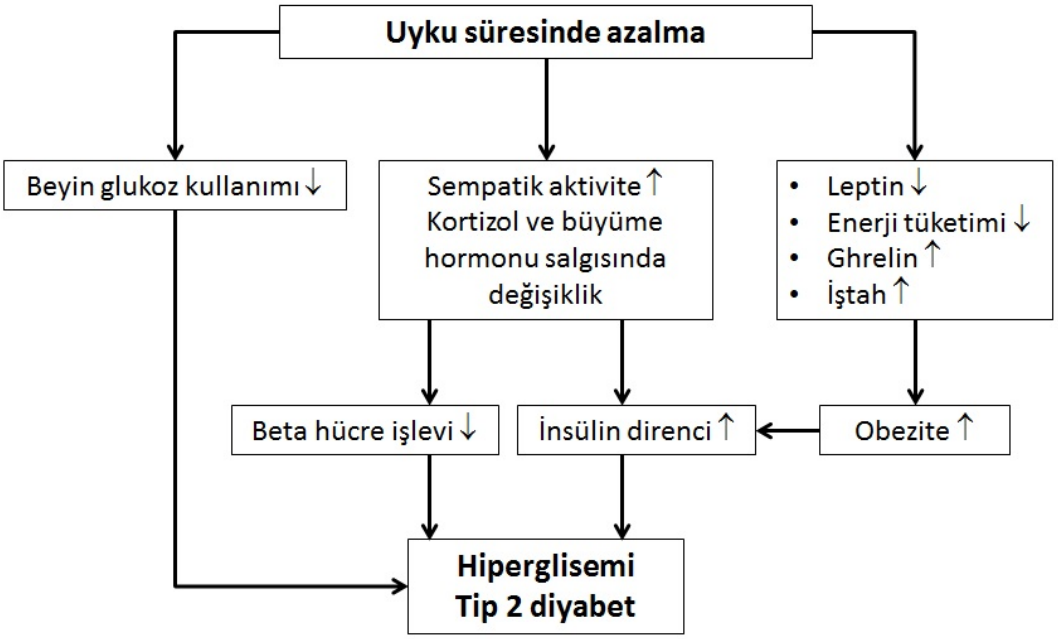
Uyku süresi ve inflamasyon belirteçleri arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada 5 saatten az ya da 9 saatten daha çok uyuyan kadınlarda süre bakımından normal uyuyanlara göre interlökin-6 (IL-6) ve C-reaktif protein (CRP) seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (35). Uyku bozukluğunun kişinin bildirdiği semptomlar ve anketlerle belirlendiği 17 çalışmanın incelendiği bir meta analizde benzer bir şekilde, uyku bozukluğunun daha yüksek CRP ve IL-1 düzeyleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (36).

Uykusuzluğun Glukoz Homeostazisi Üzerine Etkileri

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmaların sonucunda uyku kaybının metabolik ve endokrin bozukluklarla özellikle diabetes mellitusla ilişkili olduğu dikkati çekmiştir. Uyku kısıtlamasının bir sonucu olarak glukoz metabolizmasındaki bozulma sonrasında görülen Tip 2 diyabetin muhtemel yolları Şekil 2'de gösterilmiştir (37).

Sağlıklı genç erişkin olan 11 erkek bireyin dâhil edildiği bir çalışmada 6 gün boyunca 4 saatlik uyku sonrası ve 12 saatlik toparlanma uykusu sonrası değerlendirmeleri yapılmıştır. Uyku kaybı sonrası yapılan testlerde, toparlanma uyku sonrasına göre anlamlı derecede daha düşük glukoz toleransı, artan sempatik sinir sistemi aktivitesi ve artan kortizol seviyeleri bildirilmiştir (38).

Uyku kısıtlamasının glikoz metabolizması üzerine etkisinin incelendiği çalışmada HOMA-IR ölçümünde %60 oranında artma bulunmuşken (39), 4 saatlik uyku kısıtlamasının yapıldığı, gıda alımının kontrollü sağlandığı başka bir çalışmada ise normal uykuya göre glikoz düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (40). Çalışmalar arasındaki tutarsızlıkların uyku kısıtlama prosedürleri, diyet listeleri ya da diyet içeriğindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 2. Uyku yetersizliği ve parçalanmayı anormal glikoz metabolizması ve Tip 2 diyabete bağlayan yollar (41).

Uyku sürelerinin Tip 2 diyabet riski açısından incelendiği prospektif bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda 7 saat uyuyanlarla karşılaştırıldığında uyku süresindeki bir saatlik azalma %9, bir saatlik artma ise %14 oranında diyabet riski ile ilişkilendirilmiştir (42). Benzer bir çalışmada kısa uyuyanların (5-6 saat), normal süre uyuyanlara (7-8 saat) göre tip 2 diyabet riskleri 2 kat daha fazla iken uzun uyuyanlar için ise yaklaşık %60 daha fazla olduğu gösterilmiştir (43). Uykunun NREM döneminin 3 gece boyunca akustik uyaranlar verilerek baskılanmasıyla yapılan bir çalışmada, oluşturulan uyku baskılanması sonrası intravenöz glukoz tolerans testi (GTT) yapılmıştır. Uyku baskılanması ve normal uyku sonrası yapılan testlerde normal uykuya göre insülin duyarlılığında %25 oranında azalma ve glukoz toleransında da %23 azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir (44).

Uyku kısıtlamalarının glukoz düzeylerini arttırabildiğinden uyku süresinin düzenlenmesinin etkileri araştırılmıştır. Killick ve ark.'nın 19 sağlıklı erkekte yaptıkları çalışmada insülin duyarlılığının 10 saatlik üç gece uykusundan sonra arttığı gösterilmiştir (45). Kothari ve ark. nın 22 çalışmayı incelediği derlemelerinde uyku eğitiminin uyku sürelerini uzattığı ve anlamlı olmasa da açlık glukoz seviyelerini azalttığı bulunmuştur (46).

KAN GLUKOZUNUN DÜZENLENMESİ

Tanımlar ve Fizyolojik Sınırlar

Kan glukozu belli sınırlar içerisinde korunmak zorundadır. Bunun nedeni yaşamsal olayların sürdürülebilmesi için enerji ihtiyacının sürekli olması ancak beslenme ile enerji desteği sağlanmasının ise aralıklı olmasıdır. Diğer bir değişle beslenme yoluyla enerji sağlayan gıdaların vücuda kazandırılması günün belli saatlerinde gerçekleşirken fizyolojik süreçlerin (örneğin kalp kasılması, böbreklerde taşıma işleri, nöronal aktivite vb.) devamı için enerjinin yani ATP desteğinin sürekli gerekmesidir. ATP üretimi açısından da en önemli kaynak glukoz olduğu için ve bu glukoz tüm dokulara kan dolaşımı yoluyla ulaştırıldığı için dokular aktivite düzeyine göre değişen miktarlarda glukozu dolaşımdan almaktadır. Bu durum kan glukoz düzeylerinde azalma sonuç olarak hipoglisemi riski yaratır. Beslenme dönemlerinde ise mide bağırsak kanalından alınan karbonhidrat türü gıdalar monosakkaritler halinde kan dolaşımına kazandırılırken kan glukoz düzeylerinin artması yani hiperglisemi riski ortaya çıkar. Kan glukoz düzeylerinin fizyolojik sınırlarda korunma amacı bir yandan hiperglisemi ya da hipoglisemi durumlarını engellemek diğer yandan dokuların metabolizmalarını sürdürebilmeleri için gerekli glukoz desteğini kesintisiz biçimde temin etmektir. Amerikan Diyabet Birliği'nin *diabetes mellitus* tanı ve sınıflandırma kriterlerine göre kan glukoz düzeyleri sınırları aşağıdaki Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Amerikan Diyabet Birliği *diabetes mellitus* tanı ve sınıflandırma kriterleri (47)

Adlandırma	Tanım
Normoglisemi	• Kan glukoz düzeyi 60 – 99 mg/dL
Bozulmuş açlık glukozu	• Kan glukoz düzeyi 100 – 125 mg/dl
Bozulmuş glukoz toleransı	• OGTT'de kan glukoz düzeyi 140 – 199 mg/dl
Tip 2 DM	• Açlık kan glukoz düzeyi > 125 mg/dl
	• OGTT'de kan glukoz düzeyi >199 mg/dl

Kısaltmalar: DM, diabetes mellitus; **OGTT,** oral glukoz tolerans testi

Tablo 2'de verilen tanımlara göre 12 saat açlığı takiben yapılan ölçümlerde kan glukoz düzeyinin 60 mg/dl altına düşmesi hipoglisemi, 99 mg/dl'nin üzerine çıkması hiperglisemi olarak adlandırılmaktadır.

Glukoz Tüketimi ve Üretimi

Dinlenim durumunda glukoz tüketiminin %50'sinden nöronal dokular ve beyin sorumludur. Tüketimin geri kalan kısmının %25'i karaciğer ve gastroinsestinal sistemde gerçekleşirken diğer %25'lik kısmı kaslar ve yağ dokusunda görülür. Kana verilen glukozun üretiminde ise karaciğerde gerçekleşen glikojenoliz ve glokoneogenez olayları %85 sorumluyken, böbreklerde gerçekleşen glukoneogenez %15 oranında katkı sağlar. Kan glukoz düzeyinin düzenlenmesi esas olarak hormonal yolla gerçekleşir.

Kan glukozunun hormonal düzenlenmesi

Kan glukozunun düzenlenmesinde çok sayıda hormon görev almaktadır. Bunları kan glukozunu arttıran ve azaltan hormonlar olarak iki grupta incelemek mümkündür. Kan glukoz düzeyini azaltan en önemli hormon insülindir. İnsülin dışında inkretinler adı verilen bir grup hormon da insülin benzeri etkilerle kan glukoz düzeyinin azalması yönünde etki gösterir. Kan glukozunu arttıran hormonlar arasında en güçlüsü kortizol hormonudur. Bu etkisi nedeniyle kortizol glukokortikoid adıyla da anılır. Kortizol dışında glukagon, katekolaminler ve büyüme hormonu da kan glukoz düzeyini yükseltici etkiler gösterir. Tiroid hormonları bir taraftan kan glukozunu yükseltirken diğer taraftan glukoz tüketimini arttırıcı etkileri de güçlendirdiğinden toplamda glukoz düzeyini değiştirmemekle birlikte glukoz üretim tüketim döngüsünü hızlandırır. Kan glukoz düzeyini etkileyen hormonların özeti Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Kan glukoz düzeyini etkileyen hormonlar

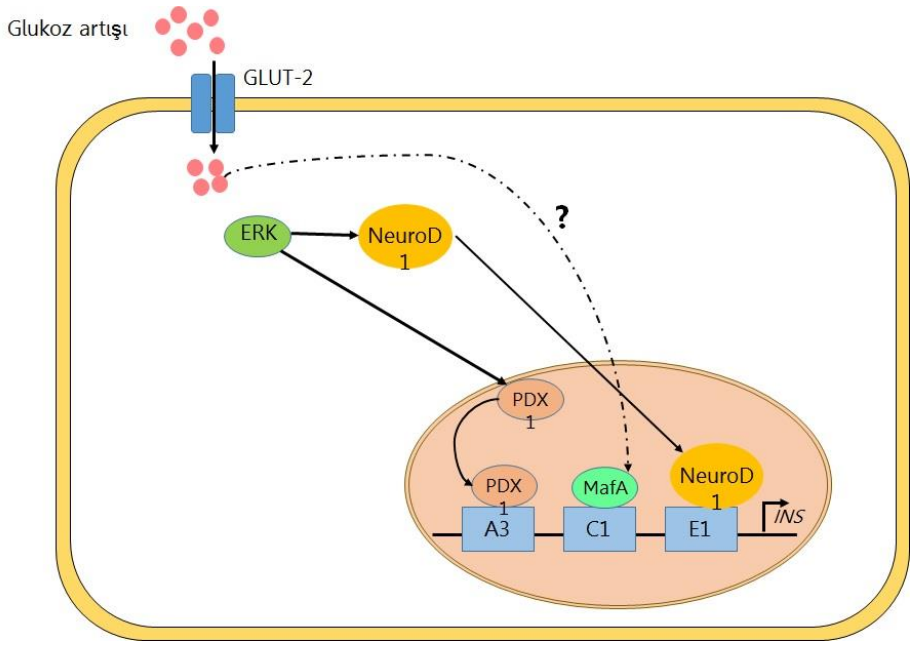
Azaltan hormonlar	Arttıran hormonlar	Döngüyü hızlandıran
İnsülin	Kortizol	Tiroid hormonları
İnkretinler	Glukagon	
	Katekolaminler	
	Büyüme hormonu	

İnsülin

İnsülin hormonu pankreasın beta hücrelerinden salgılanan 51 aminoasitten oluşan protein yapılı bir hormondur. Beta hücrelerinde insülin yapımını kodlayan *INS* geni 11. kromozomda yerleşmiştir. Kan glukoz düzeylerinin artışına yanıt olarak hücre içinde aktive olan PDX1, Neuro D1 ve MafA adı verilen transkripsiyon faktörleri insülin gen transkripsiyonunu arttırarak insülin salgılanmasını etkiler (Şekil 3).

Kan glukozu arttığında hücre çekirdek zarının iç kısmında bulunan PDX1 fosforillenir. PDX1 fosforilasyonu PDX1'in insülin promoter bölgesindeki A3 elementine bağlanmasına neden olur. Neuro D1 ise insülin ekzositozuyla ilişkili genlerin doğrudan aktive edilmesini sağlar. Neuro D1 beta hücresinin sitoplazmasında bulunur. Kan glukozu yükseldiği zaman GLUT2 aracılığıyla hücre içine glukoz girişi Neuro D1'in sitoplazmadan nükleusa translokasyonuna yol açar. Neuro D1 insülin promoter bölgesinde E1 elementine bağlanarak bu etkileri gösterir. Son olarak MafA'nın insülin promoter bölgesinde C1 elementine bağlandığı bilinmekle birlikte glukoz artışının bu transkripsiyon faktörünü nasıl aktive ettiği bilinmemektedir (48).

İnsülin preproinsülin halinde sentezlenir. Preproinsülin granüllü endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra peptidaz enzimi ile parçalanarak proinsüline dönüştürülür. Proinsülin kendi üzerine katlanarak daha sonra A zinciri ve B zinciri olarak adlandırılacak zincirleri yapar. Bu katlantı kısımları birbirine disülfit köprüleriyle (bağları ile) bağlanır. Bu haliyle Golgi aygıtına gönderilen proinsülin sekretuar veziküller içinde paketlenerek salgılanmaya hazır hale getirilir. Vezikül içerisinde yine bir başka enzim (proproteinkonvertaz) etkisiyle yeniden parçalanır. Bu parçalanmadan aktif insülin hormonu ve C peptit adı verilen birleştirici kısım açığa çıkar. İnsanlarda C peptit düzeyleri endojen insülin düzeylerini takip etmede bir belirteç olarak kullanılır. Çünkü dışarıdan verilen insülin preparatlarında C peptit bulunmaz.



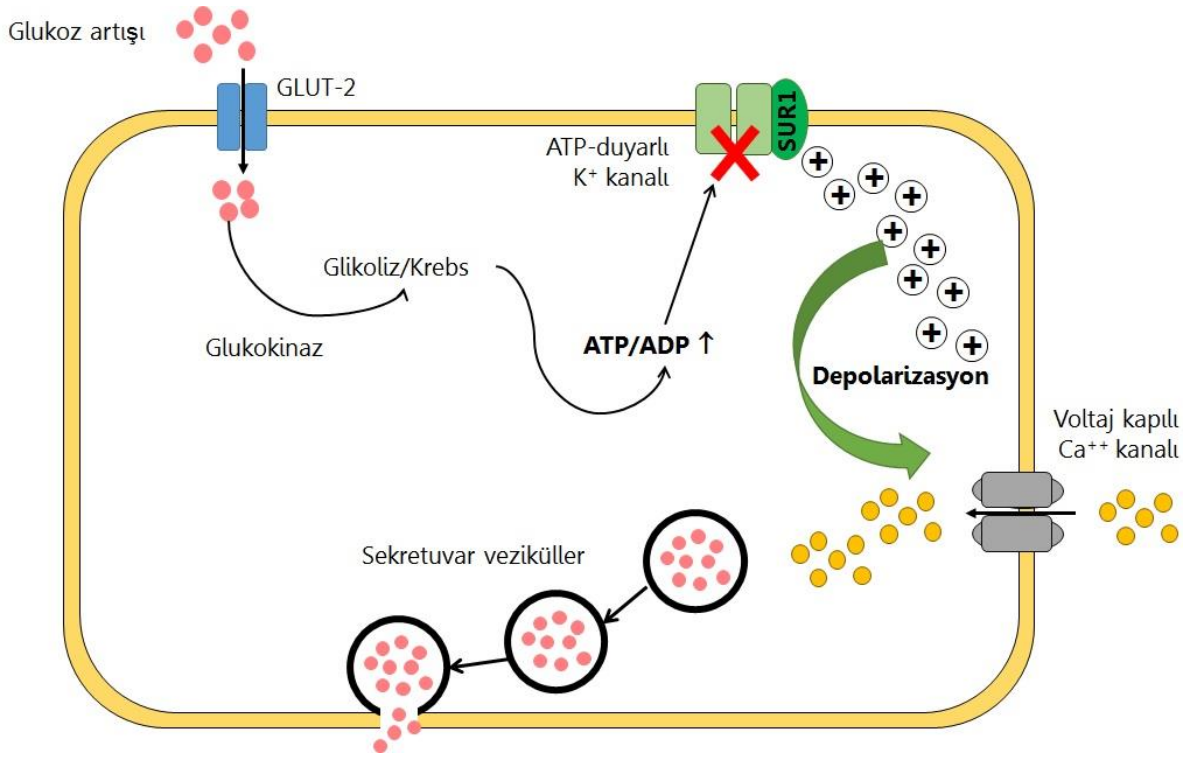
Şekil 3. Kan glukozunun artması sonucu insülin geninin aktive olması (48. kaynaktan yararlanarak çizilmiştir).

İnsülin salgılanması: pankreasın beta hücrelerinden insülin salgılanmasını uyaran olaylar zinciri kandaki glukoz moleküllerinin GLUT2 adı verilen spesifik glukoz taşıyıcısı üzerinden hücre içine girmesiyle başlar. Hücre içine giren glukoz glukokinaz enzimiyle fosforillenerek glikoliz ve oksidatif fosforilasyon süreçlerine girer. Bu süreçler sonucunda hücre içinde ATP/ADP oranı ATP lehine değişir. Hücre içinde ATP artışı beta 2 hücrelerinin hücre zarında bulunan ATP'ye duyarlı K kanallarını etkileyerek bu kanallar üzerinden hücre dışına K^+ çıkışını azaltır. Azalan K çıkışı membran potansiyelinde depolarizasyona yol açar. Depolarizasyon sonucu yine hücre zarında bulunan voltaj kapılı Ca kanalları açılarak hücre içine Ca girişini başlatır. Sitoplazmada Ca miktarlarının artışıyla sekretuar veziküller hareketlenir, membranın aktif bölgelerine yaklaşarak ekzositoz yoluyla içlerinde depolanmış bulunan insülini interstisyel sahaya bırakır (Şekil 4).

Plazma glukoz düzeyi ile insülin bir çeşit geri beslenim halkası oluşturur. Plazma glukoz düzeyi 50 mg/dl altına düştüğünde insülin sekresyonu durur. Plazma glukozu 150 mg/dl civarında iken yarı maksimal, 300 mg/dl civarında ise maksimal insülin salgılanması görülür. İnsülin salgılanması genellikle iki evre şeklinde tarif edilir. İlk evre hazır bulunan depolanmış insülinin salgılanmasıdır. Bu evrede dolaşımdaki insülin düzeyleri hızla artar. İkinci evre yeni insülin yapımının aktive olmasıyla karakterizedir. Daha yavaş bir insülin artışının daha uzun süre devam etmesiyle karakterizedir. Buradan sistemik dolaşıma geçen insülin hedef dokularda etkilerini gösterir.

İnsülinin Etkileri

İnsülinin üç ana hedef dokusu vardır: karaciğer, yağ ve kas dokusu. İnsülin hedef dokulardaki etkilerini hücre zarında bulunan insülin reseptörüne bağlanarak gösterir. İnsülin reseptörü hücre içi kısmında tirozin kinaz aktivitesi gösteren özel bir reseptör tipidir. Hücre içinde ikinci haberci sistemini kullanmaz IRS (insülin reseptör substrat) proteinleri ile etkileşerek GLUT4 glukoz taşıyıcılarını hücre zarına transloke eder ve glukozun hücre içine girişini arttırır.



Şekil 4. Kan glukozunun artması sonucu β-hücrelerinden insülin salgılanması (49.kaynaktan yararlanarak çizilmiştir).

Kısaltmalar: SUR1, düzenleyici altbirim, **GLUT-2,** insülinden bağımsız glukoz taşıyıcısı

İnsülin salınımı pencereli endotel damar sistemiyle çevrili olan pankreasın inserstisyel boşluğuna doğrudan gerçekleşir. Böylece insülin ilk durak olan karaciğere iletilmek üzere portal sisteme girer (49). Karaciğer insülinin vücutta karşılaştığı ilk organdır. Bu nedenle daha yüksek insülin konsantrasyonlarıyla karşılaşır. Portal ven yoluyla karaciğere ulaşan insülin, hepatositlerdeki glikokinaz ve fosfataz enzim aktivitesi ile glikojenolizi baskılayıp, glikojen yapımını ve depolanmasını arttırır. Hepatositlere GLUT 2 aracılığıyla alınan glukoz, glikokinaz aktivitesi ile fosfatlanarak glukoz-6-fosfata dönüşür. Böylece glukozun hücre dışına çıkışı engellenmiş olur. Aynı zamanda insülinin fosfataz aktivitesi ile glikojen sentaz ve glikojen fosfataz enzimleri defosforile edilir. Defosforilasyon sonucunda glikojen sentaz enzimi aktive olur ve glikojen yapımı artar. Glikojen fosfotaz enziminin baskılanmasıyla glikojen yıkımı önlenir. Sonuç olarak glikojen yapımı ve depolanması arttırılır.

Kaslar açlık durumunda enerjiyi daha çok yağ asitlerinden sağlarlar. Egzersiz ve yemek yeme davranışı sonrası ise artan kan glukozuna cevap olarak insülin salgısı artar. Kas hücresi zarında bulunan insülin reseptörüne bağlanan insülin, GLUT4 translokasyonunu arttırarak hücre içine glukozun taşınma hızını arttırır. Heksokinaz ve glikojen sentaz aktivitesi

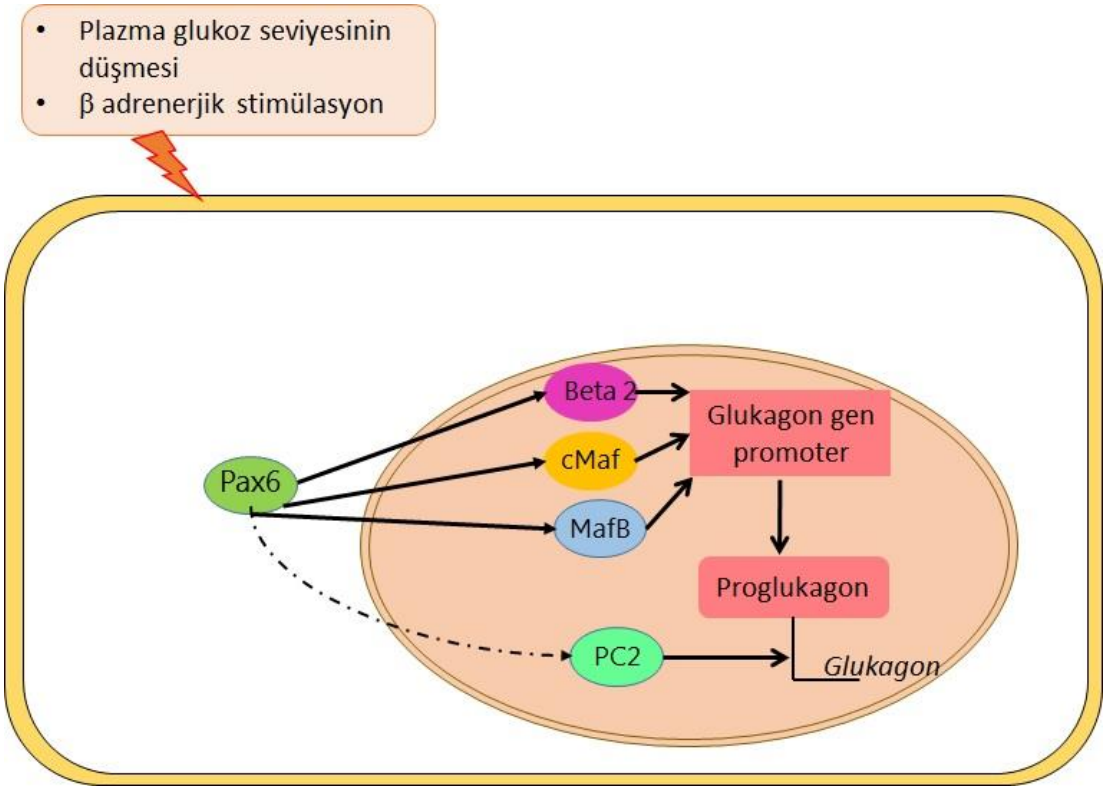
sonrası glikojenin depolanmasını sağlar. Fosfofruktokinaz ve pirüvat dehidrogenazın aktive edilmesiyle glikoliz uyarılır. Hücre içine giren glukoz kasın enerji ihtiyacı olarak yağlarımı kulanmasını azaltır. Son olarak kasta protein sentezini arttırır, yıkımı baskılar. Böylece insülin glukozun hem kullanımını hem de depolanmasını arttırarak kan glukozunun normal seviyelere ulaşmasını sağlar.

İnsülinin etkili olduğu üçüncü temel doku olan yağ dokusunda glukozun taşınmasını ve kullanımını arttırır. İnsülin, adiposit sitoplazmasından membrana doğru GLUT 4 hareketini sağlayarak glukozun kandan yağdokusuna alınmasını hızlandırır. Daha sonra glukozun kasta ve karaciğerde depolanmasının aksine yağ dokusunda glukozun parçalanma süreçlerini başlatır. Diğer yandan pirüvat dehidrogenaz asetil CoA karboksilaz aktivitesi arttırılarak glukozdan yağ asidi sentezi yapılır. Yağ asidi ve α gliserolün tepkimeye girmesi (esterifikasyonu) sonucu yağ birikimi hızlanır. Aynı zamanda hormonsensitif lipazı inhibe ederek yağların parçalanmasını da engeller. Böylece insülin hem yağ asidi yerine tüm vücutta glukozun kullanımını arttırır hem de yağ koruyucu bir hormon olarak etkilerini gösterir (50)

Glukagon

Glukagon pankreasın alfa hücreleri tarafından üretilen ve salgınan, 29 aminoasitlik bir peptit hormondur (51). Kan glukozu normalden düşük olduğunda salgılanır. Bu nedenle dolaşımdaki glukagon düşük seviyelerde bulunur (yaklaşık 10 pmol/L). Uzun süren açlık sonrası ya da hipoglisemide 2-3 kat artabilir (52). Glukagon geni pankreasın alfa hücrelerinde proglukagondan üretilir (Şekil 5).

Glukagon üretimi: kan glukozu düştüğünde alfa hücresinde bulunan transkripsiyon faktörü olan Pax 6, glukagon üretiminde rol oynayan genlerin ekspresyonunu düzenler. Pax 6'nın, cMaf ve MafB ile birlikte glukagon geninin promoter bölgesine bağlanması direk bir yolla glukagon ifadesinin oluşumunu tetikler. Ayrıca indirek olarak da PC2 gen üretimi ile glukagon gen ifadesi başlatılır. Beta 2, cMaf ve MafB glukagon promoter bölgesiyle etkileşime girerek glukagon gen ekspresyonunu aktive eder.

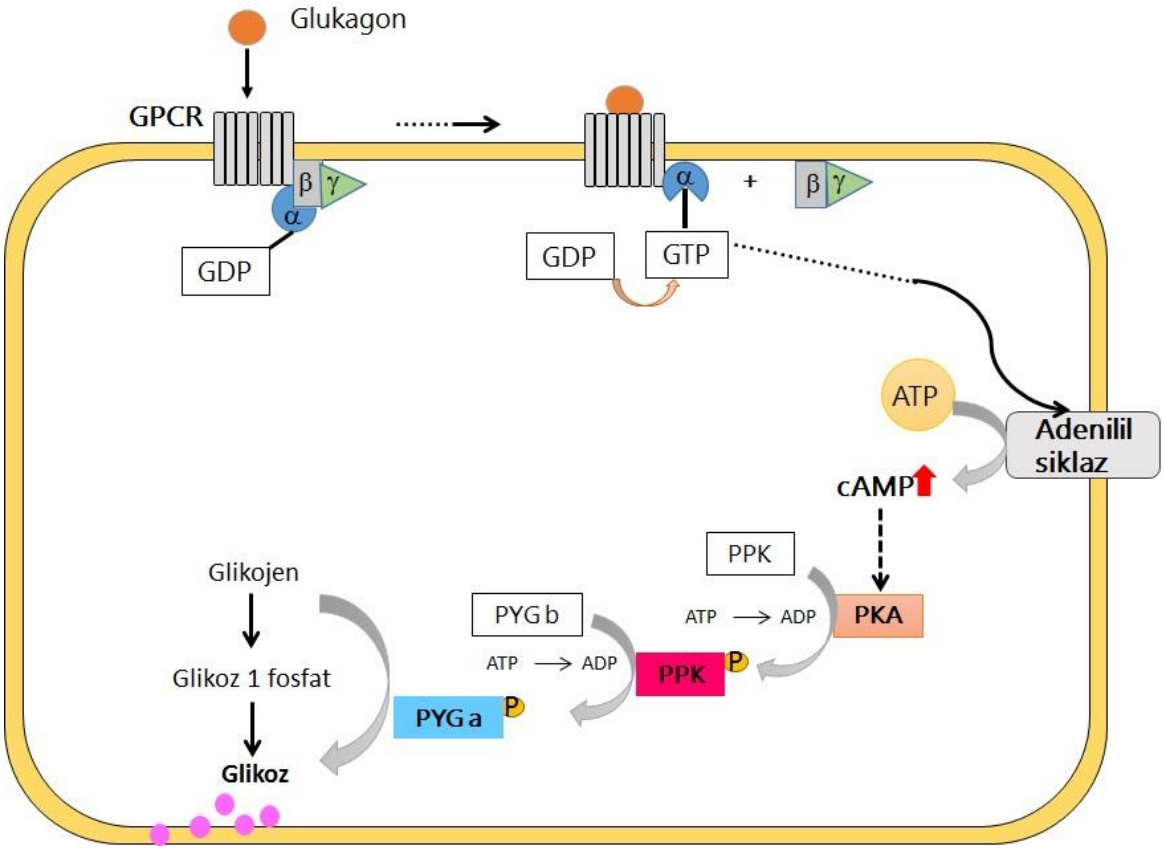


Şekil 5. Pankreasın α-hücrelerinden glukagon geninin aktive olması (53).

Glukagon Etkilerinin Hücre İçi Mekanizması

Glukagon kan glukoz düzeyinin azalmasına yanıt olarak karaciğer hücresi (hepatosit) membranında bulunan G proteinine bağlı reseptör olan glukagon reseptörüne bağlanır (Şekil 6).

G proteini α, β, γ alt birimlerinden oluşur. İnaktif durumda olan α alt birimi glukogonun reseptörüne bağlanmasıyla yapısal değişikliğe uğrar. Bunun sonucunda bağlı olduğu GDP, GTP ye dönüşür ve G proteininden ayrılır. GTP ve α alt birimi adenilil siklazı aktive eder. Aktive olan adenilil siklaz, ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalize eder. Hücre içi ikinci haberci olan cAMP'nin miktarı artar ve protein kinaz A'yı aktive eder. Sırasıyla PPK ve PYGa fosforillenir. PYGa, glikojenden glukoz-1-fosfatın salınmasını kontrol eder (54).



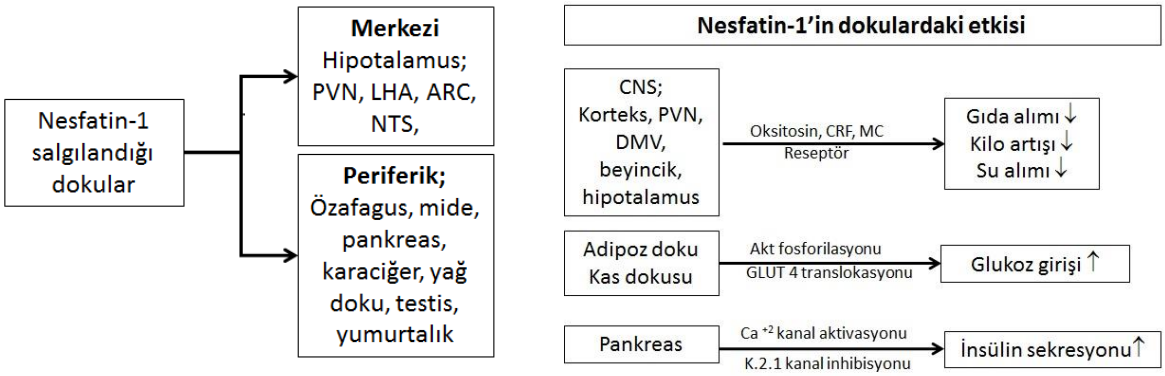
Şekil 6. Glukagon tarafından glikozun hücre içi düzenlenme mekanizması (54. kaynaktan yararlanarak çizilmiştir).
Kısaltmalar: GPCR, G proteinine bağlı reseptör, **Gs,** adenilil siklaz aktivasyonunu arttıran protein, **GDP,** guanozin difosfat, **GTP,** guanozin trifosfat, **ATP,** adenozin trifosfat, **cAMP,** siklik adenozin monofosfat, **PKA,** Protein kinaz A, **PPK,** fosforilaz kinaz, **PYG a,** glikojen fosforilaz a, **PYG b,** glikojen fosforilaz b.

Glukagonun Etkileri

Glukagonun en önemli etkisi, glukoneogenez ve glukojenolizi gerçekleştirmek ve karaciğer yoluyla glikojen yıkımı ile birlikte kan glukoz düzeyini arttırmaktır. Aynı zamanda glikolizisin baskılanmasını da sağlar. Bu etkiler insüline göre tam olarak zıttır. Glukagon bir yandan glukoz yapımını uyarırken bir yandan da glikokinaz ve glikojen sentaz aktivitesini de baskılar. Böylece yeni glikojen yapımı engellenmiş olur. Glukagonun karaciğerde yağ metabolizması üzerine etkileri de vardır. Dolaşımdan karaciğere gelen yağ asitlerini engeller ve depolanmasını durdurur. Tüm bu etkiler sonucu glukagon yardımıyla kan glukoz düzeyleri arttırılmış olur (50).

Nesfatin-1

Nesfatin-1 nükleobindin (*NUCB2*) geni tarafından kodlanan bir nöropeptittir. İlk olarak hipatalamusta üretilen melanokortin sinyalizasyonu ile ilişkili tokluk hormonu olarak tanımlanmıştır (55). Beslenme davranışında ve glukoz metabolizmasında rol oynayan anoreksijenik bir peptittir (56). Daha sonra yağ dokusu, testis, overler, kardiyomiyosit ve pankreasta gibi pek çok periferik dokuda da üretildiği gösterilmiştir (57). Nesfatin-1'in üretildiği dokular ve bu dokulardaki temel etkileri Şekil 7'de gösterilmiştir. Merkez sinir sistemi üzerine olan etkileri genelde gıda alımının azalması ve kilo artışının azalması şeklindeyken, yağ dokusuna etkileri sonucu bu dokulara glukoz girişi artmaktadır. Nesfatin-1 periferik dokulara glukoz girişini hücredeki glukoz taşıyıcısı GLUT4 havuzunu hücre zarına mobilize ederek arttırmaktadır(58).



Şekil 7. Nesfatin-1 'in salgılandığı farklı dokular ve bu dokulardaki etkisi (Schalla 2020).

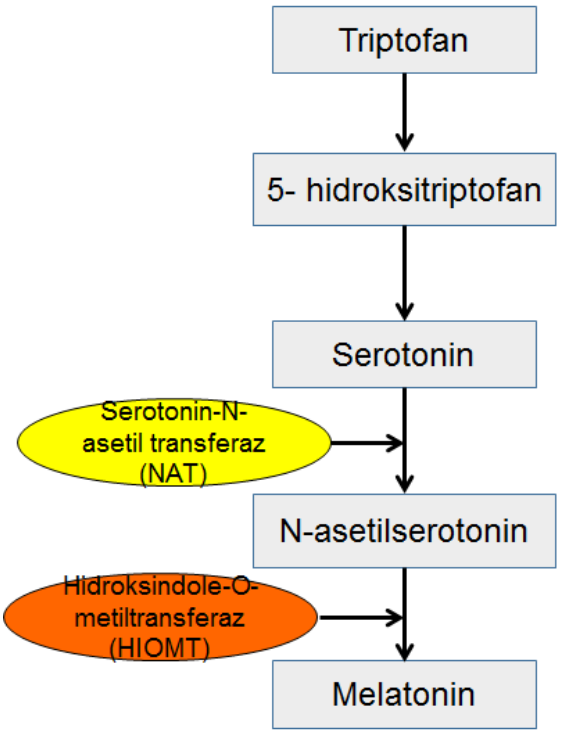
Kısaltmalar: PVN, paraventriküler çekirdek, **LHA,** lateral hipotalamik alan, **ARC,** arcuat çekirdek, **NTS,** nükleus traktus salitorius, **CNS,** merkezisinir sistemi, **DMV,** Vagus sinirin dorsal motor çekirdeği, **CRF,** kortikotropin releasing faktör, **MC,** melanokortin, **AKT,** protein kinaz b, **GLUT4,** glukoz transport tip 4.

Nesfatin-1'in dorsolateral hipatalamus (DLH) ve lateral hipotalemik alanda ve uykunun REM döneminde melanin konsantre edici hormon ile eş zamanlı salgılanması uyku uyanıklık döngüsünde Nesfatin-1 ilişkisini düşündürmüştür. Jego ve ark. polisomnografik kayıtlarla sıçanlarda Nesfatin-1'in uyku üzerindeki etkisinin araştırmıştır(59). Nesfatin-1 atiserum verilen sıçanlarda REM uyku süresinin azaldığı, eksojen Nesfatin-1 verilen

sıçanlarda ise REM uyku süresinin arttığı gösterilmiştir. Sıçanlarda 72 saatlik REM uyku kısıtlamasının yapıldığı bir çalışmada uyku kısıtlaması sonrası DLH bölgesinde, Nesfatin-1'in mRNA ve protein ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (60). Sıçanlarda REM uyku kısıtlamasının 72 saat uygulandığı kannabinoid reseptör blokajı ve santral Nesfatin-1 düzeylerinin incelendiği bir çalışmada kannobinoidlerin somnojenik etkisi Nesfatin-1 azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür (61). Tüm bu çalışmalara bakıldığında Nesfatin-1'in uyku uyanıklık döngüsünde ve uyku düzenlenmesinde rol oynadığı söylenebilir.

Melatonin

Melatonin (N–asetil-5-metoksitriptamin) ilk olarak 1958 yılında Yale Üniversitesinde bir dermatolog olan Lerner ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (62). Yaptıkları çalışmada epifiz bezinden sentezlenen bu maddeye kurbağa derisi melanaforlarını etkilediği ve seratoninin kimyasal yapısıyla ilişkisi nedeniyle melatonin adını vermişlerdir. Epifizde triptofandan seratonine, seratoninden de iki enzimin ardışık aktivitesi sonucu melatonine dönüşüm gerçekleştirilir (Şekil 7) (63).



Şekil 8. Melatonin sentezi

Melatonin hidrofilik özelliklerinin yanında aynı zamanda lipolifik özellikliği olan bir nörohormondur. Bu nedenle depolanmadan direk dolaşım sistemine katılır. Dolaşım sisteminde ise %70 oranında albümine bağlanarak taşınır. Memelilerde epifiz bezinden melatonin sentezi hipotalamik suprakiazmatik çekirdek saati tarafından kontrol edilir. Sentezi, gece saatlerinde plazmada en yüksek konsantrasyonlarda olacak şekilde bir sirkadyen ritim ile düzenlenir. (64).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından TÜHADYEK-2021/11 protokol numarası ile etik onay verilmiştir (Ek-1). Çalışmanın hayvan deneyi aşamaları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde, laboratuvar çalışmaları ise Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Fizyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

DENEY GRUPLARI

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde yetiştirilen toplam 40 adet 8-10 haftalık Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı. Tüm sıçanların bakımı 8 hafta boyunca uluslararası rehberlere uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışma boyunca standart yem ve laboratuvar koşulları (22±1ºC oda sıcaklığı, %50-60 nem oranı ve 12 saat gece, 12 saat gündüz ışık periyodu olmak üzere) sağlandı. Sıçanlar rastgele alınarak 4 gruba ayrıldı (Şekil 9).

Toplam 40 adet Wistar Albino erkek sıçan aşağıdaki gibi 4 gruba ayrıldı			
Kontrol grubu (K, n=10)	Uykusuzluk grubu (U, n=10)	Uykusuzluk+ Melatonin grubu (U + Mel, n=10)	Melatonin grubu (Mel, n=10)

Şekil 9. Deney grupları

KULLANILAN CİHAZLAR

Elisa okuyucu : Biotek, USA

Elisa yıkama cihazı : Biotek, USA

Derin dondurucu : Thermo Elektron Corporation, USA

Soğutmalı santrifüj : MPW 350R, Polonya

Otomatik pipet : Eppendorf Multipette E3, Almanya

Vorteks : Heidolp, Almanya

Hassas terazi : Mettler Toledo, İsviçre

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Melatonin : Sigma, Almanya

Etanol : Riedel de Haen, Almanya

İnsülin : Novo Nordisk, Danimarka

DENEY PROTOKOLÜ

Deney protokolü Şekil 10'da özetlenmiştir. Uykusuzluk (U) ve Uykusuzluk + Melatonin (U+Mel) gruplarındaki sıçanlara 8 hafta süreyle kronik REM uykusuzluğu yöntemi uygulandı. Kontrol (K) ve Melatonin (Mel) gruplarındaki sıçanlar ise kafeslerinde 8 hafta olağan uyku düzenlerini koruyarak geçirdi. Mel ve U+Mel gruplarındaki sıçanlara 8 hafta boyunca gavaj yolu ile 5 mg/kg/gün dozunda melatonin uygulandı. Tüm gruplarda günlük kilo ölçümü ve haftalık kan glukoz ölçümü yapıldı. Sekizinci hafta sonunda ise kan glukoz homeostasisini değerlendirmek için İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi (ipGTT), İntraperitonel İnsülin Tolerans Testi (ipİTT) yapıldı ve ayrıca HOMA-IR yöntemi ile insülin direnci hesaplandı. Deney sonunda tüm gruplardaki sıçanların 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi altında kan örnekleri toplanarak ötanazi uygulandı. Kan örnekleri tüplere alınarak soğutmalı santrifüj ile +4°C'de 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra mikrosantrifüj tüplerine alınarak laboratuvar çalışmaları yapılıncaya kadar derin dondurucuda –80°C'de saklandı. Pankreas dokusu bütün halinde çıkarılarak histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonu içine alındı. Böylece çalışmanın deneysel kısmı sonlandırıldı.

K grubu	U grubu		U+Mel grubu	Mel grubu
• 8 hafta boyunca talaşlı ev kafesinde tutuldu • Her gün %0,1 etanol (vehicle) gastrik gavaj ile melatonin uygulananlara eş hacimde verildi	• 8 hafta boyunca her gün saat 16.00'dan ertesi gün 10.00'a kadar uykusuzluk platformuna alındı • Her gün %0,1 etanol (vehicle) gastrik gavaj ile melatonin uygulananlara eş hacimde verildi		• 8 hafta boyunca her gün saat 16.00'dan ertesi gün 10.00'a kadar uykusuzluk platformuna alındı • Her gün 5 mg/kg dozunda melatonin %0,1 etanolde çözülerek gastrik gavaj ile verildi	• 8 hafta boyunca talaşlı ev kafesinde tutuldu • Her gün 5 mg/kg dozunda melatonin %0,1 etanolde çözülerek gastrik gavaj ile verildi

Sekizinci haftanın sonunda

ipİTT	ipGTT		HOMA-IR	Alınan doku ve sıvı örnekleri
• 12 saat açlık sonrası 0,75 IU/kg insülin i.p. yolla verildi • 0, 15, 30, 60, 90 dakikalarda venöz kan glukoz ölçümü yapıldı	• 12 saat açlık sonrası 2 g/kg glukoz i.p. yolla verildi • 0, 15, 30, 60, 90, 120 dakikalarda venöz kan glukoz ölçümü yapıldı		• İnsülin direnci [açlık glukozu mmol/L × açlık insüli IU/mL] /22,5 formülü ile hesaplandı	• Pankreas dokusu alındı • Kan örneklerinden serum elde edilerek saklandı

Şekil 10. Deney protokolü

Kronik REM Uykusuzluğu Yöntemi

Sekiz hafta boyunca kronik REM uykusuzluğu oluşturmak amacıyla modifiye çoklu platform modeli uygulandı (65). Bu modelde 2-3 cm yüksekliğinde su bulunan kafeslerin (125 x 45 x 45 cm) içine 6,5 cm çapında platformlardan 7 tanesi aralıklı olarak koyuldu. Bunlardan ikisi boş bırakılarak beşine sıçan yerleştirildi. Böylece hem izolasyon stresi hem de immobilizasyon stresini önlemek amaçlandı. Bu modelde su içindeki platform üzerine yerleştirilen sıçanlar uyanık kaldığı sürece ve REM uykusu dışında platform üzerinde kalabilir. Ancak platformun genişliği yatmaya veya uzanmaya izin vermez. Böylece REM uykusu sırasında ortaya çıkan kas atonisi nedeniyle sıçan platform üzerinde kalamaz ve suyun içine düşer. Su derinliği sıçanın su içinde yürümesine izin verdiği halde, sıçan ıslak kalmayı sevmediği için suyun içinde kalmaz veya su içinde uyuyamaz. Suya düşen sıçan tekrar platform üzerine çıkar. Bu basit modelde sıçanın platform üzerine yerleştirildiği süre kadar REM uykusuzluğu oluşturulmuş olur.

Kronik REM uykusuzluğu için U ve U+Mel gruplarındaki sıçanlar 8 hafta boyunca her gün saat 16:00'dan ertesi gün 10:00'a kadar (18 saat) platform üzerinde bırakıldılar. Geri kalan 6 saat ev kafeslerine alındı (66). Böylece total uykusuzluk yerine günlük yaşamda daha sık karşılaşılan uyku kısıtlılığı oluşturulmak hedeflendi.

Melatonin Uygulaması

Melatonin uygulaması her gün saat 09:00 ile 10:00 arasında 5 mg/kg/gün dozunda melatoninin gastrik gavaj yoluyla verilmesi şeklindeydi ve bu uygulama 8 hafta boyunca sürdürüldü (67). Melatonin uygulamadan önce %0,1'lik etanol içerisinde çözdürüldü.

Günlük ve Haftalık Ölçümler

Sıçanların her gün kilo takibi ve haftalık kan glukoz ölçümleri glukometre (Optima, Okmeter, Taiwan) ile yapıldı.

Sekizinci Hafta Sonundaki Ölçümler

Toplam 8 haftanın sonunda İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi (ipGTT), İntraperitoneal İnsülin Tolerans Testi (ipİTT) ve HOMA-IR hesaplaması yapıldı.

İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi (ipGTT)

12 saatlik açlığın ardından sıçanlara 2 g/kg glukoz intraperitoneal yolla verildi. Bunun için 2 gr glukoz 5 ml serum fizyolojik içinde çözdürüldü. Daha sonra 0, 30, 60, 90, 120. dakikalarda kuyruk veninden kan örnekleri alınarak glukometre ile glukoz ölçümü yapıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapılarak glukoz toleransı farklılıkları değerlendirildi (68).

İnsülin Tolerans Testi (İTT)

Tekrar 12 saatlik açlığın ardından sıçanlara 0.75 IU/kg dozunda insülin intraperitonel verildi. Daha sonra 0, 15, 30, 60, 90. dakikalarda ipGTT'de olduğu gibi ölçümler yapıldı (68). Gruplar arasında karşılaştırma yapılarak insülin duyarlılığı değerlendirildi.

HOMA-IR İnsülin Direnci Hesaplaması

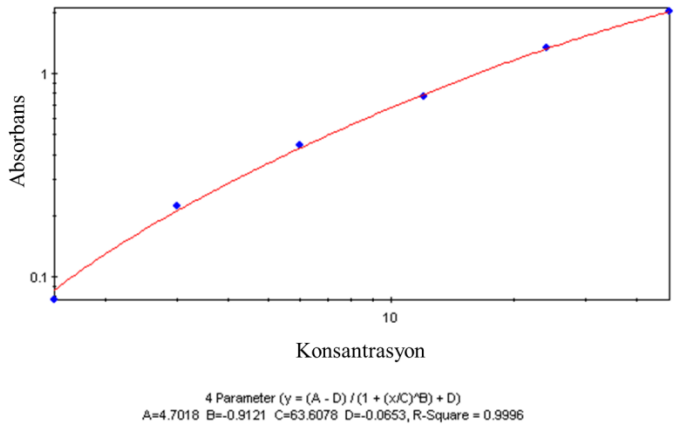
Her sıçanda insülin direnci [açlık glukozu (mmol/L) × açlık insülini (IU/mL)]/22.5 formülü ile hesaplandı (69). Bunun için 12 saatlik açlık sonrası kuyruk veninden kan örnekleri toplandı. Glukoz ve insülin ölçümleri yapılıp HOMA-IR hesaplandı.

Biyokimyasal Ölçümler

Açlık serum insülin, GLP-1, glukagon ve nesfatin-1 düzeyleri T.Ü. Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile incelendi.

İnsülin Ölçümü

Serum örneklerinde insülin ölçümü ELISA kiti (BT LAB- Kat. No: E0707Ra-96T, Shanghai, China) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yapılana kadar -80°C'de bekletilen serum örnekleri ve kit malzemeleri oda sıcaklığına getirildi. Standartlar kit prosedüründe belirtildiği gibi ilgili kuyucuklara 50µl pipetlendi. Serum örnekleri ise 40µl pipetlendi, üzerine 10µl biyotinlenmiş antikor pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı (Bio Tek Instruments, Inc, USA) ile kitte belirtildiği gibi 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 50 µl susbstrat A ve 50 µl substrat B solüsyonu pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 10 dakika bekletildi. Ardından her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve ELİSA reader cihazında (İbo Tek Instruments, İnç, USA) absorbans okumaları yapıldı. çalışmanın standart absorbans grafiği Şekil 11'de verilmiştir.

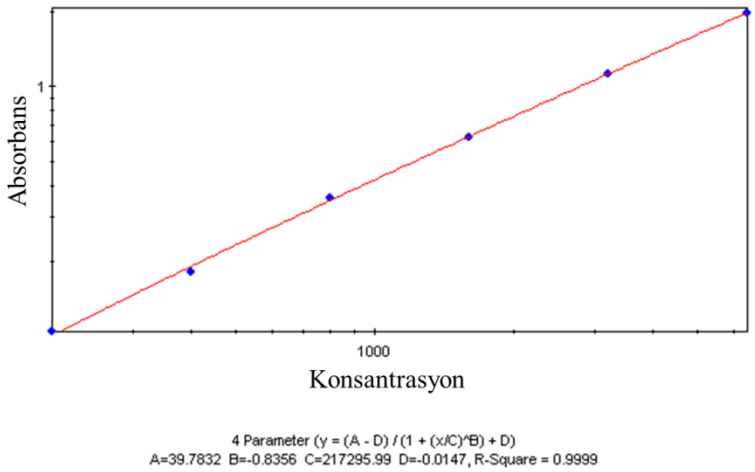


Şekil 11. İnsülin düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği

GLP-1 Ölçümü

Serum örneklerinde GLP-1 ölçümü ELISA kiti (BT LAB- Kat. No: E0719Ra-96T, Shanghai, China) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yapılana kadar -80°C'de bekletilen serum örnekleri ve kit malzemeleri oda sıcaklığına getirildi. Standartlar kit prosedüründe belirtildiği gibi ilgili kuyucuklara 50µl pipetlendi. Serum örnekleri ise 40µl pipetlendi, üzerine 10µl

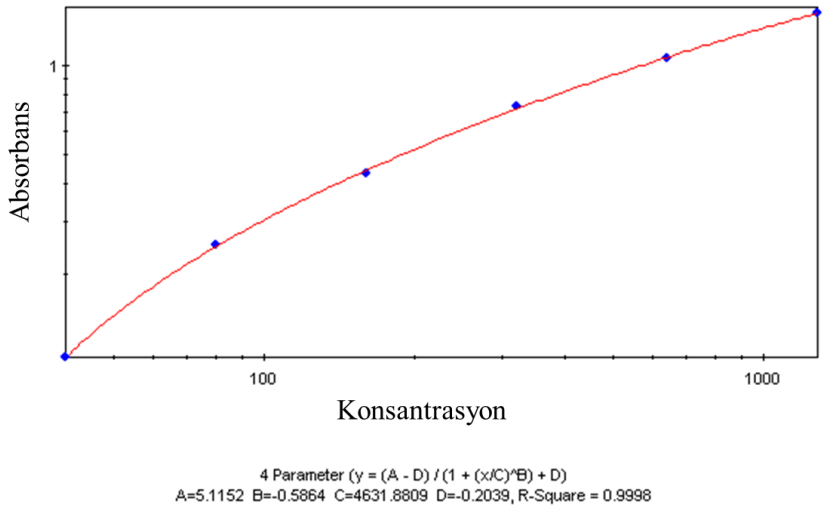
biyotinlenmiş antikor pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı (Bio Tek Instruments, Inc, USA) ile kitte belirtildiği gibi 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 50 µl susbstrat A ve 50 µl substrat B solüsyonu pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 10 dakika bekletildi. Ardından her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve ELİSA reader cihazında (İbo Tek Instruments, İnç, USA) absorbans okumaları yapıldı. çalışmanın standart absorbans grafiği Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 12. GLP-1 düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği

Glukagon Ölçümü

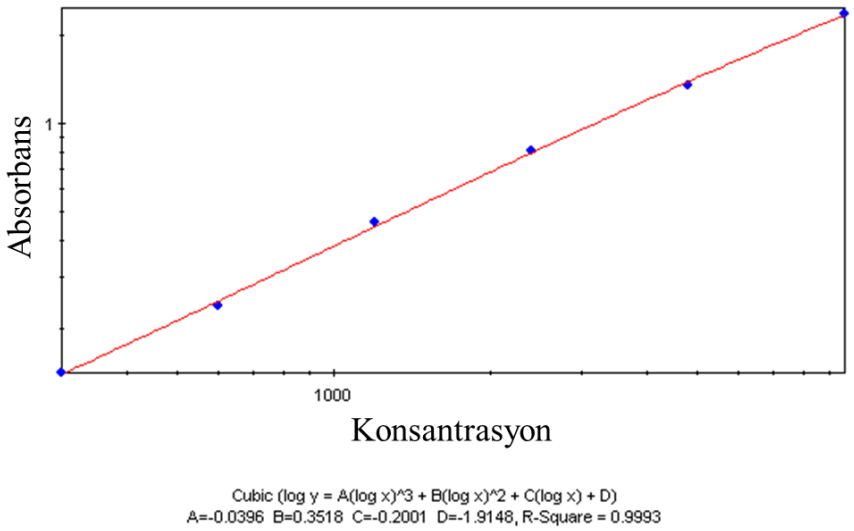
Serum örneklerinde glukagon ölçümü ELISA kiti (BT LAB- Kat. No: E1066Ra-96T, Shanghai, China) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yapılana kadar -80°C'de bekletilen serum örnekleri ve kit malzemeleri oda sıcaklığına getirildi. Standartlar kit prosedüründe belirtildiği gibi ilgili kuyucuklara 50µl pipetlendi. Serum örnekleri ise 40µl pipetlendi, üzerine 10µl biyotinlenmiş antikor pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı (Bio Tek Instruments, Inc, USA) ile kitte belirtildiği gibi 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 50 µl susbstrat A ve 50 µl substrat B solüsyonu pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 10 dakika bekletildi. Ardından her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve ELİSA reader cihazında (İbo Tek Instruments, İnç, USA) absorbans okumaları yapıldı. çalışmanın standart absorbans grafiği Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13. Glukagon düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği

Nesfatin-1 Ölçümü

Serum örneklerinde nesfatin-1 ölçümü ELISA kiti (BT LAB- Kat. No: E0878Ra-96T, Shanghai, China) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yapılana kadar -80°C'de bekletilen serum örnekleri ve kit malzemeleri oda sıcaklığına getirildi. Standartlar kit prosedüründe belirtildiği gibi ilgili kuyucuklara 50µl pipetlendi. Serum örnekleri ise 40µl pipetlendi, üzerine 10µl biyotinlenmiş antikor pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı (Bio Tek Instruments, Inc, USA) ile kitte belirtildiği gibi 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 50 µl susbstrat A ve 50 µl substrat B solüsyonu pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C etüvde 10 dakika bekletildi. Ardından her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve ELISA reader cihazında (İbo Tek Instruments, İnç, USA) absorbans okumaları yapıldı. çalışmanın standart absorbans grafiği Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14. Nesfatin-1 düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği

Histopatolojik İnceleme

Pankreasta hematoksilen eozin ve nesfatin-1 antikor boyaması Trakya Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Hematoksilen-eozin boyama basamakları aşağıdaki gibi uygulandı:

Tüm gruplardaki sıçanların pankreasları çıkarıldı. Yaklaşık 1'er cm olacak şekilde kesilip %10'luk formalin solüsyonunun içinde 24 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra dokular parafin bloklara gömülüp 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. 70°C'lik etüvde 1 saat, oda sıcaklığındaki ksilen içerisinde 45 dakika bekletilerek parafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Lamlar Leica ST 5020 marka otomatik boyoma cihazına alındı. Kesitler alçalan derecelerdeki etil alkolden geçirildi (%96, %80, %70). Mayer Hematoksilende 5 dakika bekletildi. Musluk suyunda durulandı. %1'lik asit alkolde diferansiye edildi. Su ile durulandı. %1'lik amonyakta 1 dakika bekletildi. Su ile durulandı. %96'lık etil alkolden geçirildi. %1'lik alkol bazlı eozinde 20 saniye bekletildi. Yükselen derecelerdeki etil alkolden geçirildi (%70, %80, %96). Lamlar kurutuldu. Ksilende 1 dakika bekletildi. Leica CV 5030 otomatik lam kapama cihazında ksilen bazlı kapatıcıyla kapatıldı. Pankreas adacık sayısı, boyut, yapı ve konjesyon açısından semikantitatif bir skorlama ile aşağıdaki gibi değerlendirildi:

Adacık sayısı

0: Normal, 1: Azalma, 2: Artma

Boyut

0: Normal, 1: Küçülme, 2: Büyüme

Yapı

0: Normal, 1: Bozuk

Konjesyon

0: Yok, 1: Var

İmmünohistokimyasal boyama basamakları aşağıdaki gibi uygulandı:

Nesfatin-1 proteininin tespit edilmesi için proteine karşı geliştirilmiş polikklonal antikor (Boster Bio PB9876-100, Anti-Nucleobindin 2 Antibody, 100 ug) kullanıldı. Tüm gruplardaki sıçanların pankreas kesitleri parafinlendi. Lamlar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH Staining modülüne yerleştirildi. Optiview Universal DAB Detection Kit kullanıldı. Parafin bloklardan kesitler 4 mikron kalınlığındaki pozitif şarjlı lamlara alındı. 70°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Lamlar Benchmark XT marka immünohistokimya cihazına alındı. Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ile ph:8'de (CC1) antijen gerikazanımı yapıldı. antikor inkübasyonu 56 dakika boyunca uygulandı. Arka plan boyama için Mayer Hematoksilen (Ventana Medica Systems) 8 dakika uygulandı. Bluing Reagent (mavileştirme solüsyonu) (Ventana Medica Systems) 4 dakika uygulandı. Lamlar deterjanlı suyla yıkandı. Lamlar absolü alkolde 2 kez çalkalandı. Lamlar deterjanlı suyla yıkandı. Lamlar absolü alkolde 2 kez çalkalandı. Lamlar kurutulup ksilol bazlı kapatıcıyla kapatıldı. Değerlendirme boyamanın yoğunluğuna göre aşağıdaki gibi yapıldı:

0: Normal boyanma

1: Azalmış boyanma

2: Artmış boyanma

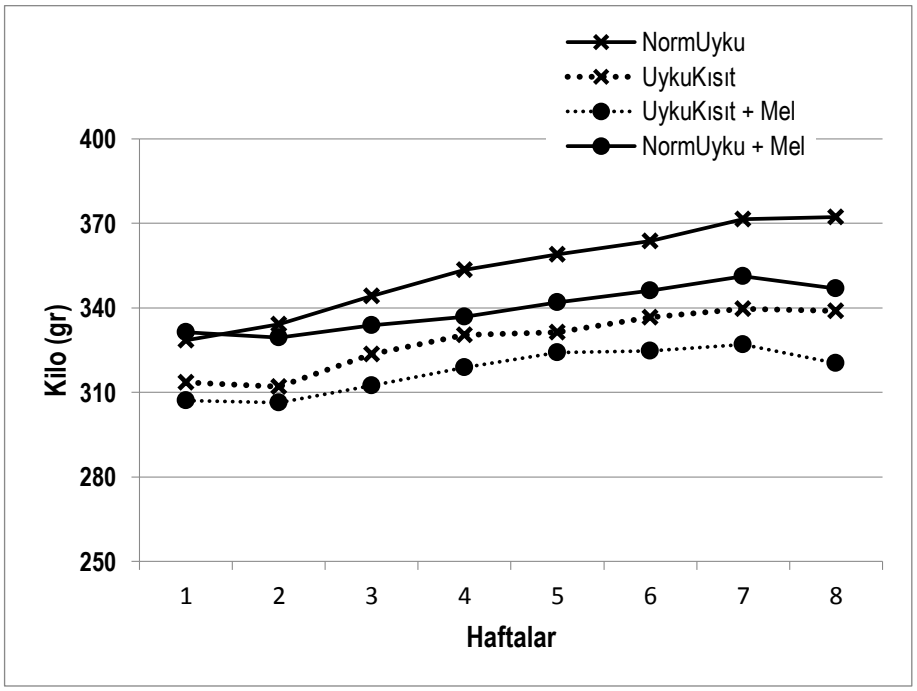
İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistiksel yöntemler kullanıldı. Ham verilerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik değişkenler için ANOVA testi, nonparemetrik değişkenler için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Ağırlık Takibi Bulguları

Dört grupta sekiz hafta süreyle takip edilen deney hayvanlarının ağırlık değişimleri haftalık periyodlarla ölçüldü ve grafik olarak Şekil 15'de verildi. Deney süresince kilo kaybı nedeniyle çalışma dışı bırakılması gereken hayvan olmadı. Dört grubun her bir hafta için ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında 1-7. haftalarda gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken 8. haftada normal uyku grubu ile uykusuzluk+mel grupları arasındaki anlamlı fark (p=0,024) haricinde diğer karşılaştırmalarda fark saptanmadı.



Şekil 15. Tüm gruplarda sekiz hafta süreyle ağırlık değişimi

Her bir grubun kendi içinde sekiz hafta süreyle ağırlık değişiminin karşılaştırılması aşağıdaki tabloda verilmiştir. Buna göre 1. haftadan 8. haftaya tüm gruplarda ortalama olarak ağırlıkların arttığı görülmektedir. Kilo artışı kontrol grubunda %13, uykusuzluk grubunda %8,uykusuzluk+mel grubunda %4 ve melatonin grubunda %5 olarak hesaplandı.

Tablo 4. Tüm grupların sekiz hafta boyunca ağırlık ortalamaları

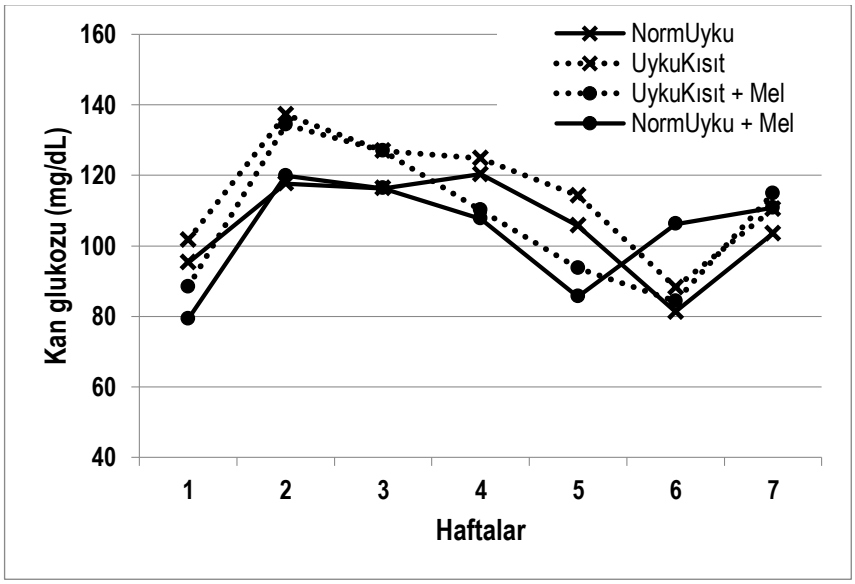
Haftalar	Kontrol	Uykusuzluk	Uykusuzluk+mel	Mel
1	328,5±33,0	313,6±34,4	307,1±30,6	331,3±28,5
2	334,1±35,9	312,1±36,2	306,3±28,5	329,4±26,5
3	344,1±38,0	323,5±37,7	312,3±28,2	333,8±25,5
4	353,5±39,7	330,3±40,6	318,8±30,6	336,8±24,7
5	359,0±41,5	331,4±41,8	324,2±30,6	342,0±24,0
6	363,7±42,6	336,7±41,5	324,6±34,3	346,1±23,3
7	371,5±44,8	339,6±44,4	327,0±34,5	351,2±22,4
8	372,2±45,3	338,9±44,6	320,3±37,1	346,9±23,5
P değeri*	0,000	0,009	0,003	0,001

*tekrarlayan ölçümlerde ANOVA

Kan Glukozu Bulguları

Tüm gruplarda kan glukoz düzeyi ölçümleri haftalık periyodla ve tokluk kan şekeri ölçümü şeklinde gerçekleştirildi. Bu ölçümlerin grafiği Şekil 16'da verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda 2, 5 ve 6. haftalarda anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla p=0,019, p=0,002 ve p=0,001). ANOVA sonrası yapılan Post Hoc ikili karşılaştırmalarda ise ikinci haftada kontrol ve uykusuzluk grupları (p=0,005) ile uykusuzluk ve melatonin grupları (p=0,005) arasında fark saptanırken 5. haftada kontrol ve melatonin grupları (p=0,008), uykusuzluk ve uykusuzluk+mel grupları (p=0,022) ile uykusuzluk ve melatonin grupları (p=0,001) arasında anlamlı fark bulunmuştur. Son olarak, 6. hafta ikili karşılaştırmalarında kontrol ve uykusuzluk grupları (p=0,036), kontrol ve melatonin grupları (p=0,001), uykusuzluk ve melatonin (p=0,001) ile uykusuzluk+mel ve melatonin (p=0,001) grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur. Özetle 6. haftada normal uyku+mel grubunun kan glukoz düzeyleri diğer üç gruptan anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. İkinci haftada uyku kısıtlaması grubunun kan glukoz düzeyinin normal uyku grubu ile normal uyku+melatonin gruplarından anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmektedir. Beşinci haftada uyku kısıtlaması+mel grubunun

kan glukoz düzeyinin sadece uyku kısıtlaması grubuna göre daha düşük ortalama değer gösterdiği bulunmuştur. Uykusuz bırakılan gruplarda kan glukozu ilk üç hafta benzer bir profil gösterirken üçüncü haftadan sonra melatonin verilen grupta kan glukozu sadece uykusuz bırakılan gruba göre düşmeye başlamış ve beşinci haftada aradaki fark en yüksek değerine ulaşmıştır. Bu bulgu melatonin uygulamasının uykusuzlukta kan şekeri üzerine düzeltici etkilerinin üçüncü haftadan sonra belirginleştiğini düşündürmüştür. Melatoninin daha uzun süre kullanımında (6. ve 7. haftalar) kan şekerini yükseltici etkisinin ön plana geçtiği ve uykusuzluk grubu ile uykusuzluk+mel grubu arasındaki farkın ortadan kalktığı görülmektedir. Normal uyku+mel grubunda 5.haftadan itibaren kan glukozunun yükselmeye başlaması ve 6.haftada diğer gruplardan daha yüksek seyretmesi yine bu etki lehine değerlendirilebilir. Kan glukoz düzeylerinin 7 hafta boyunca izlenmesi uykusuzluk koşullarında melatoninin 3-5.haftalar arasında kan glukozunu düşürdüğü 5.haftadan sonra yükselttiği diğer bir deyişle melatoninin kan glukozu üzerine etkisinin süreye bağlı olarak bifazik olabileceğini düşündürmektedir.

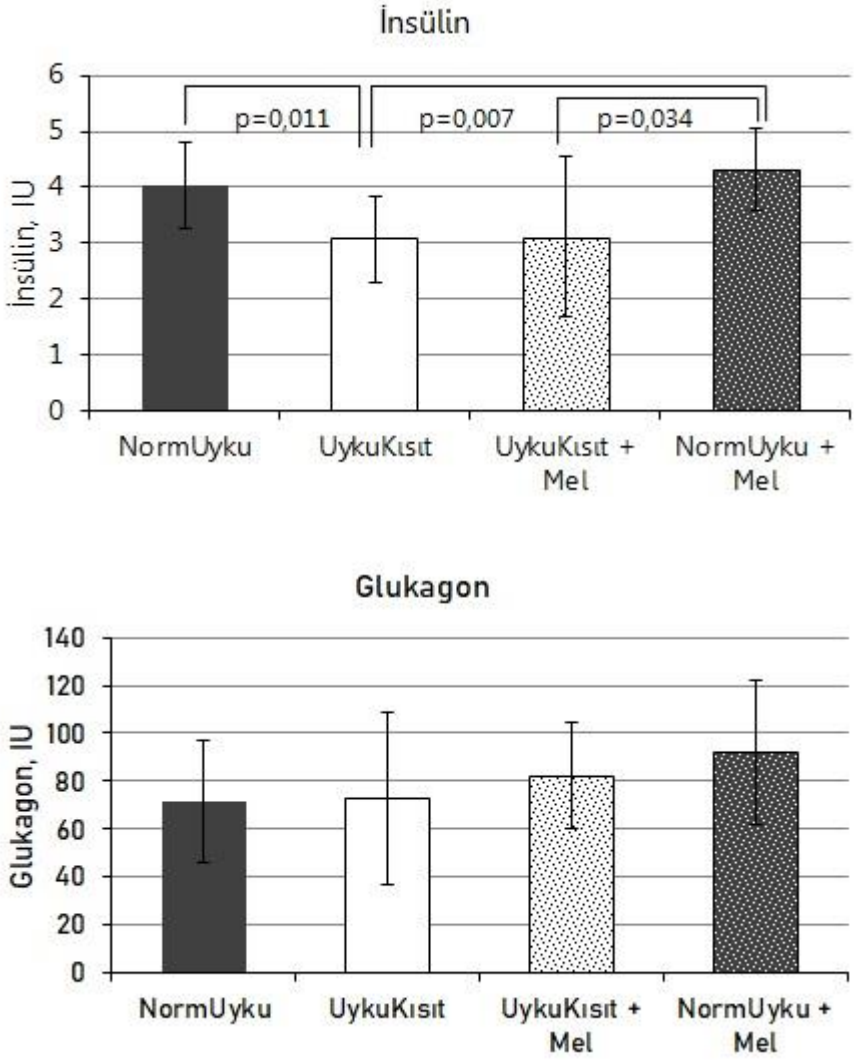


Şekil 16. Tüm gruplarda yedi hafta süreyle tokluk kan glukozu değişimi

Hormon Ölçüm Bulguları

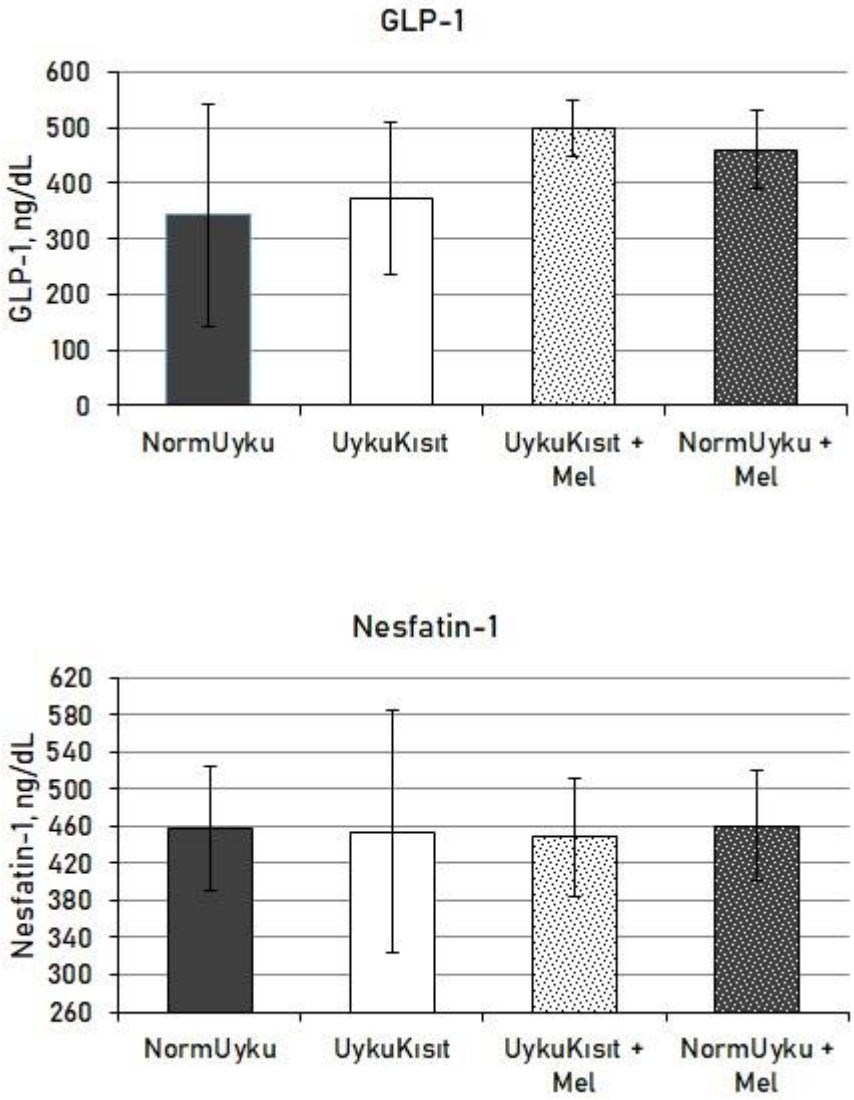
Sekiz hafta uyku kısıtlaması sonucunda sakrifiye edilen hayvanların serum örneklerinde kan glukoz düzenlenmesi ile ilgili insülin ve glukagon hormonlarının düzeyleri ölçüldü (Şekil 17). Normal uyku grubu ile karşılaştırıldığında uyku kısıtlaması grubunda serum insülin düzeylerinin azaldığı görüldü. Ancak, kronik melatonin uygulanan uyku

kısıtlaması grubunda insülin düzeyleri uyku kısıtlaması grubundan anlamlı düzeyde değişiklik göstermedi.



Şekil 17. Çalışma gruplarında serum insülin ve glukagon düzeyleri. Kruskal-Wallis sonuçları: insülin için p=0,012; glukagon için p=0,181. İnsülin için yapılan post-hoc Mann-Whitney U testinde. Normal uyku ve uyku kısıtlaması grupları için p=0,011; uyku kısıtlaması ve melatonin grupları için p=0,007; uyku kısıtlaması+melatonin ve melatonin grupları için p=0,034.

Toplanan serum örneklerinde insülin ve glukagon dışında GLP-1 ve nesfatin-1 düzeyleri de ölçüldü (Şekil 18). Nesfatin-1 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Ortalama GLP-1 düzeyleri arasında anlamlı fark vardı (p=0,046). Post hoc testler bu anlamlılığın uyku kısıtlaması grubu ile uyku kısıtlaması + melatonin grubu arasındaki farktan kaynaklandığını gösterdi. Normal uyku grubu ile uyku kısıtlaması + melatonin grubu arasında anlamlı fark bulunamaması normal uyku grubunda standart sapmanın genişliği ile ilgili olabileceği düşünüldü.



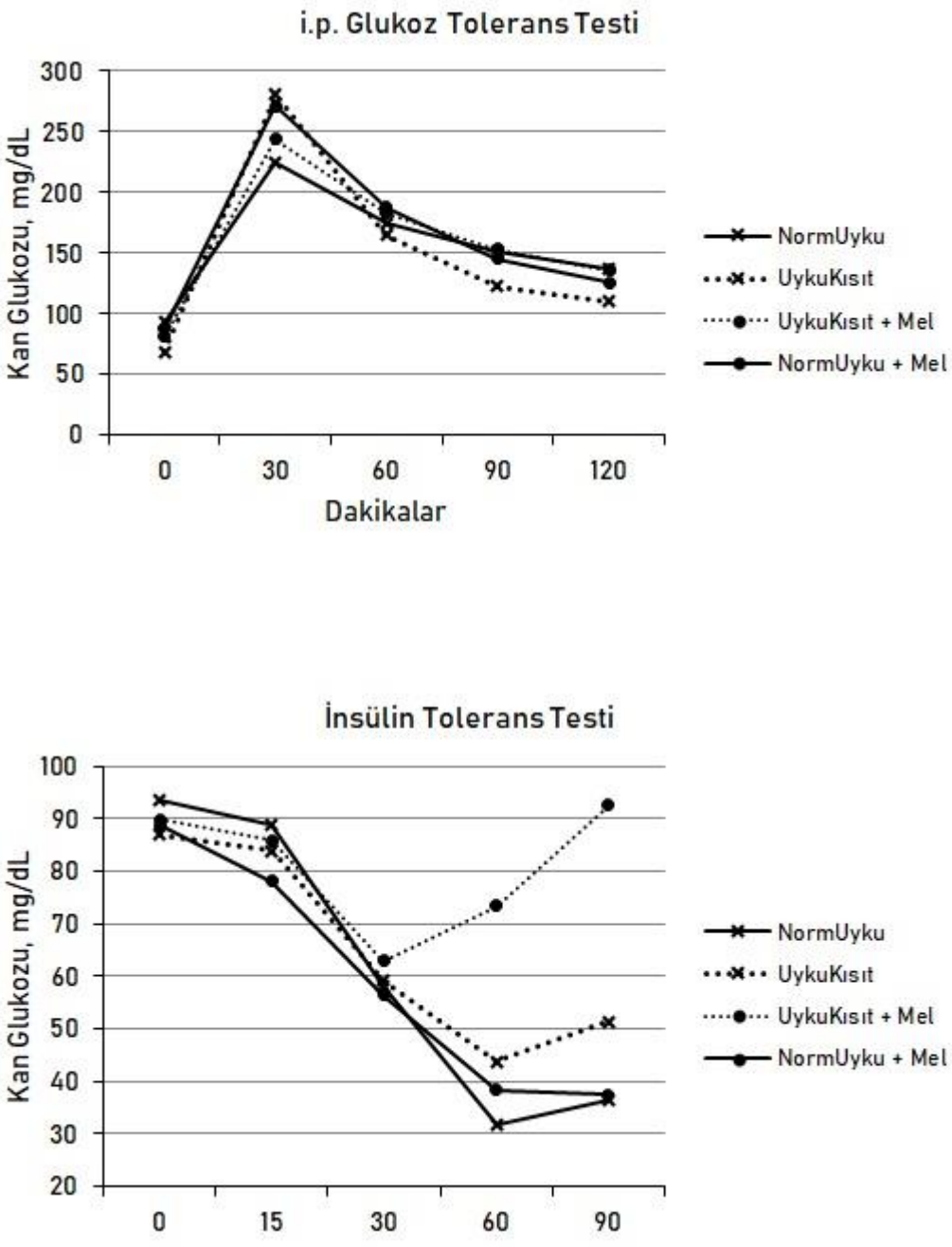
Şekil 18. Çalışma gruplarında serum GLP-1 ve nesfatin-1 düzeyleri. Kruskal-Wallis sonuçları: GLP-1 için p=0,046; nesfatin-1 için p=0,885. GLP-1 için yapılan post-hoc Mann-Whitney U testinde. Uyku kısıtlaması grubu ile uyku kısıtlaması + melatonin grubu için p=0,002.

Glukoz Tolerans Testi ve İnsülin Tolerans Testi Bulguları

Sekiz hafta uyku kısıtlaması sonucunda tüm gruplarda yapılan intraperitoneal glukoz tolerans testi ve insülin tolerans testi sonuçları aşağıdaki Şekil 19'da verilmiştir. GTT'de gruplar arasında 0, 30 ve 60.dak ölçümlerinde anlamlı fark olmamasına rağmen 90 ve 120.dak kan glukoz düzeyi ortalamaları anlamlı düzeyde farklı bulundu. GTT sonuçları parametrik test koşullarını karşıladığı için burada grupların karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi post hoc Tukey ile birlikte kullanıldı. Buradaki farkların 90.dak için normal uyku ile uyku kısıtlanması grupları arasında (p=0,035) ve uyku kısıtlanması ile uyku kısıtlanması + melatonin grupları arasında (p=0,022) olduğu görüldü. Testin 120.dak'sında görülen fark da yine normal uyku grubu ile uyku kısıtlınması grubu arasında (p=0,047) idi. Dikkati çeken bir diğer nokta ise tüm gruplarda testin 30.dak'sında kan glukoz değerlerinin 200 mg/dL üzerine çıkmasıydı. Ortalama değerler açısından bakıldığında en yüksek 30.dak kan glukoz değerleri uyku kısıtlanması grubunda gözlenirken en düşük 30.dak kan glukoz değerleri normal uyku grubunda ölçüldü. GTT süresince kan glukozunun dalgalanma aralığını (genliğini) belirlemek için 30. dakika değerlerinden 120.dakika değerlerini çıkardık. Normal uyku grubunda glukoz değişim genliği (225,2-136,6=) 88,6 iken, uykusuz kalan grupta bu rakam (280,6-109,7=) 98,9 oldu. Bu bulgular dikkate alındığında normal uyku grubunda kan glukozunun daha dar bir aralıkta tutulabildiği ancak uykusuzluk grubunda dalgalanmanın daha geniş olduğu görüldü. Bu da kan glukozunu düzenleyen sistemlerin kontrol gücünde azalma şeklinde yorumlandı. Uykusuzluk koşullarında melatonin uygulaması bu genliği azaltmadı (243,6-135,4=108,2) aksine arttırıyor göründü.

İnsülin tolerans testinde (ITT) dört grupta da kan glukoz düzeyi ortalamaları testin 0, 15 ve 30.dakikalarında benzer seyrederken testin 60 ve 90. dakikalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark gösterdi. ITT verileri parametrik test kriterlerini sağlamadığı için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştı. Bu nedenle post hoc değerlendirmeler Mann Whitney U testi ile yapıldığında 60 ve 90. dakikalarda farkın uyku kısıtlanması + melatonin grubu ölçümlerinden kaynaklandığı görüldü. ITT için post hoc Mann Whitney U sonuçları şu şekildeydi: normal uyku ile uyku kısıtlanması + melatonin karşılaştırmasında 60.dakika p=0,015 ve 90. dakika p=0,001; uyku kısıtlanması ile uyku kısıtlanması + melatonin karşılaştırmasında 90. dakika p=0,019; uyku kısıtlanması + melatonin ile normal uyku + melatonin karşılaştırmasında 60. dakika p=0,035 ve 90.dak p=0,001. Normal uyku grubu ile

uyku kısıtlanması grubu arasında fark saptanmadığı için kronik 8 hafta süreli uyku kısıtlanmasının insüline kan glukoz yanıtını anlamlı düzeyde etkilemediği düşünüldü.

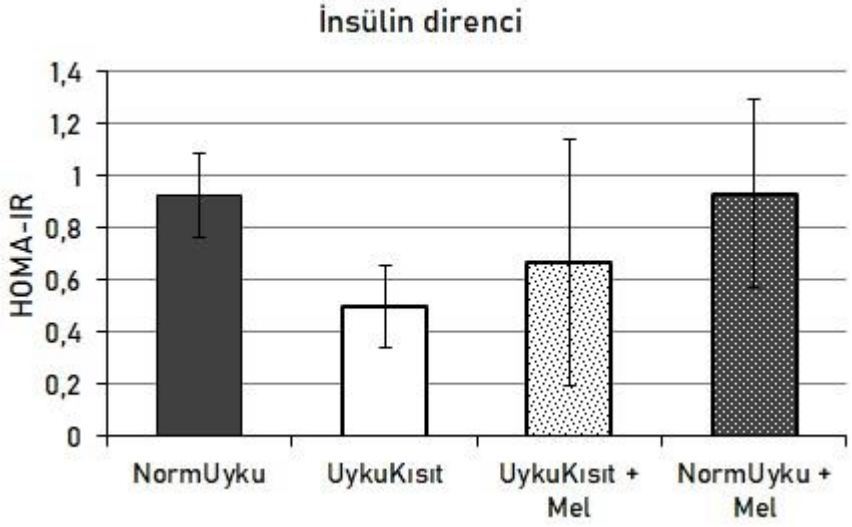


Şekil 19. İntraperitoneal glukoz tolerans testi ve insülin tolerans testi sonuçları. ipGTT için tek yönlü ANOVA sonuçları: 0.dak, p=0,143; 30.dak, p=0,111; 60.dak, p=0,514; 90.dak, p=0,016; 120.dak, p=0,036. ITT için Kruskal-Wallis sonuçları: 0.dak, p=0,659; 15.dak, p=0,660; 30.dak, p=0,942; 60.dak, p=0,053; 90.dak, p=0,001.

Ayrıca kronik uyku kısıtlanması koşullarında melatonin uygulaması kan glukoz düzeyinin daha hızlı biçimde başlangıç düzeyine gelmesini sağladı. Diğer bir deyişle dışarıdan insülin verilmesine karşı gözlenen glukoz düşmesi yanıtının daha küçük ve basık olmasına neden oldu.

İnsülin Direnci Bulguları

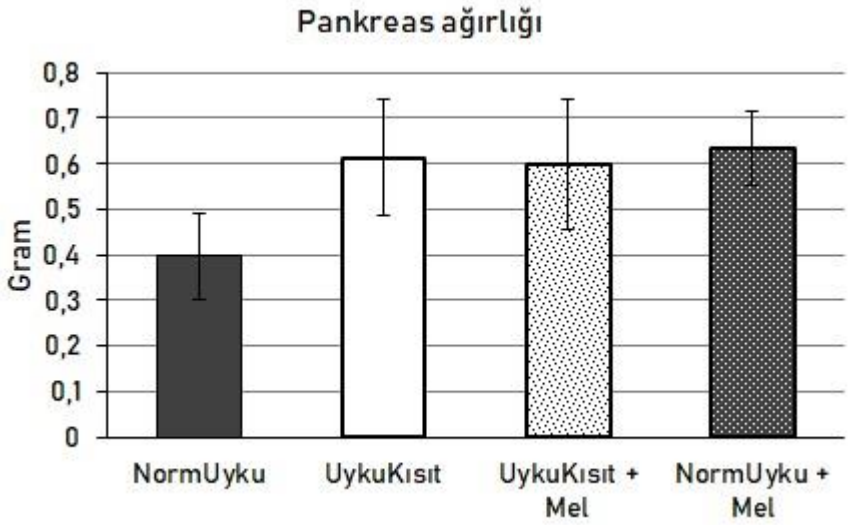
Çalışma gruplarının HOMA-IR modeli ile hesaplanan insülin direnci değerlerinin karşılaştırması Şekil 20'de verildi. Uyku kısıtlaması grubunda insülin direnci değerleri hem normal uyku grubuna göre hem de normal uyku + melatonin grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. HOMA-IR modelinde değerin <1 olması optimal insülin duyarlılığı anlamına gelir. HOMA-IR değeri >1,9 olması erken insülin direnci, >2,9 olması belirgin insülin direnci olarak değerlendirilir. Bu sınırlara göre tüm gruplarda HOMA-IR değerleri 1'in altında bulunmuştur. Diğer bir deyişle tüm gruplarda optimal insülin duyarlılığı olduğu gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasına rağmen bu fark klinik açıdan anlamlı görülmemiştir.



Şekil 20. HOMA insülin direnci ortalamalarının karşılaştırılması. Tek yönlü ANOVA p=0,01; post hoc Tukey testinde normal uyku grubu ile uyku kısıtlaması grubu karşılaştırması için p=0,024; uyku kısıtlaması grubu ile normal uyku + melatonin grubu karşılaştırması için p=0,022.

Pankreas Ağırlığı Bulguları

Deney tamamlandıktan sonra sakrifiye edilen hayvanlarda pankreas dokusu bütün olarak çıkarıldı ve tartıldı. Pankreas ağırlığı ortalamalarının gruplar arasında karşılaştırılması Şekil 21'de verildi. Normal uyku grubunda ortalama pankreas ağırlığının diğer gruplara göre anlamlı derecede daha düşük olduğu görüldü. Uyku kısıtlaması grubu ile uyku kısıtlaması + melatonin grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

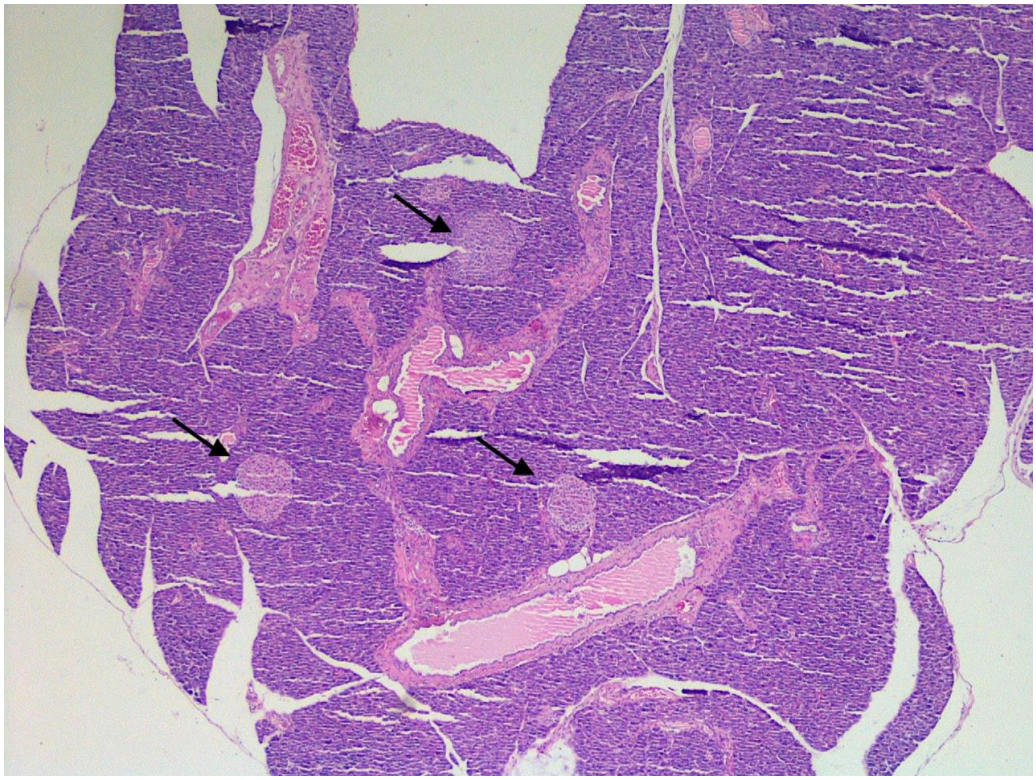


Şekil 21. Pankreas ağırlığı ortalamalarının karşılaştırması. Tek yönlü ANOVA p=0,001; post hoc Tukey testinde normal uyku grubu ile diğer üç grubun karşılaştırması için p=0,01.

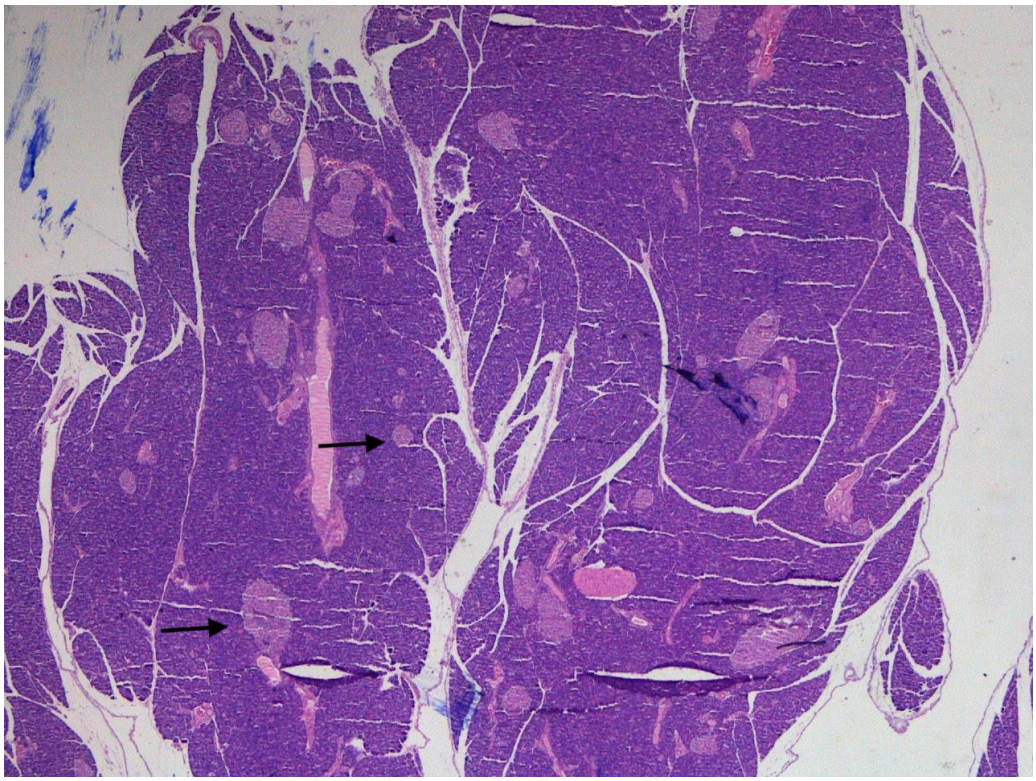
Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Tüm gruplarda deneysel süreci tamamlayan hayvanlar sakrifiye edildikten sonra histopatolojik inceleme için pankreas dokuları çıkarıldı. Histopatolojik incelemede hematoksilen eosin boyama yanısıra nesfatin-1 için immün histokimya incelemesi yapıldı. Hematoksilen eosin boyama ile elde edilen görüntüler Şekil 22-25'de verildi. Küçük büyütme (×4) ile bakıldığında normal uyku grubunda görülen pankreas adacık morfolojisine kıyasla uyku kısıtlanması grubunda adacık boyutlarında artış, adacık sınırlarında düzensizleşme ve dokuda konjesyon izlendi (bkz. Şekil 22 ve 23). Büyük büyütme (×40) ile bakıldığında uyku kısıtlanması + melatonin grubunda pankreas adacığında boyutsal artış, sınırlarda düzensizlik ve konjesyon izlenirken uyku kısıtlanması grubunda pankreas adacığında boyutsal artış ve konjesyon görüldü (Şekil 24A ve 24B).

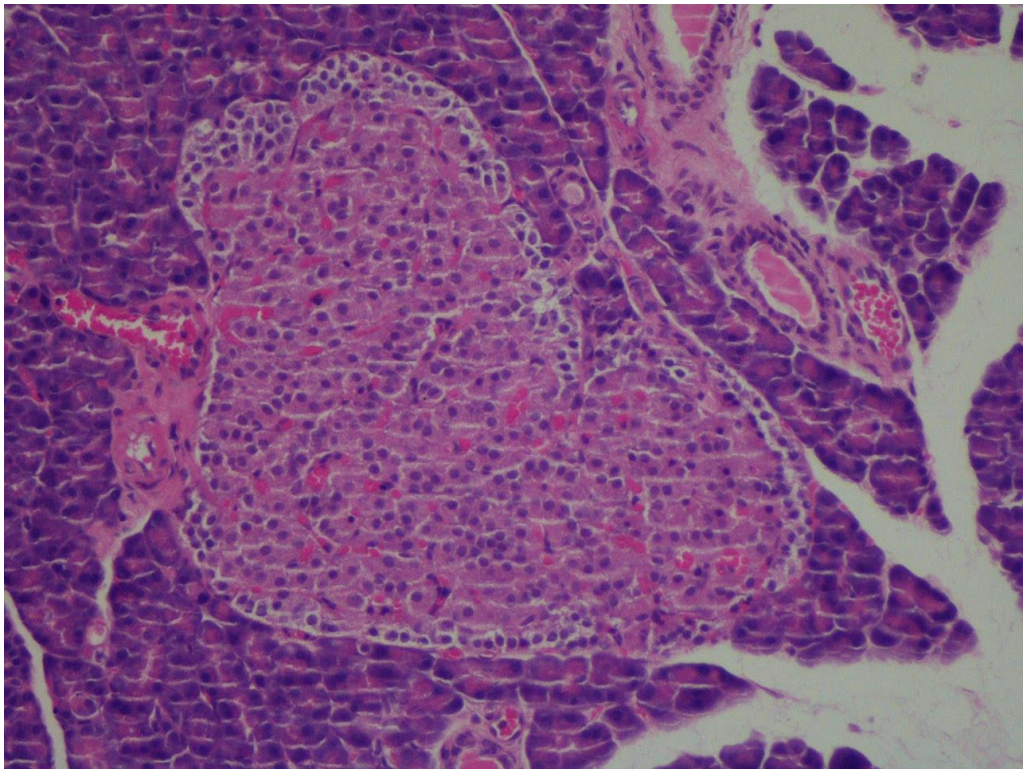
Normal uyku uyuyan ancak kronik melatonin uygulamasına maruz kalan grupta ise Langerhans adacıklarında sayıca azalma ve adacık büyüklüğünde küçülme görüldü (Şekil 25).



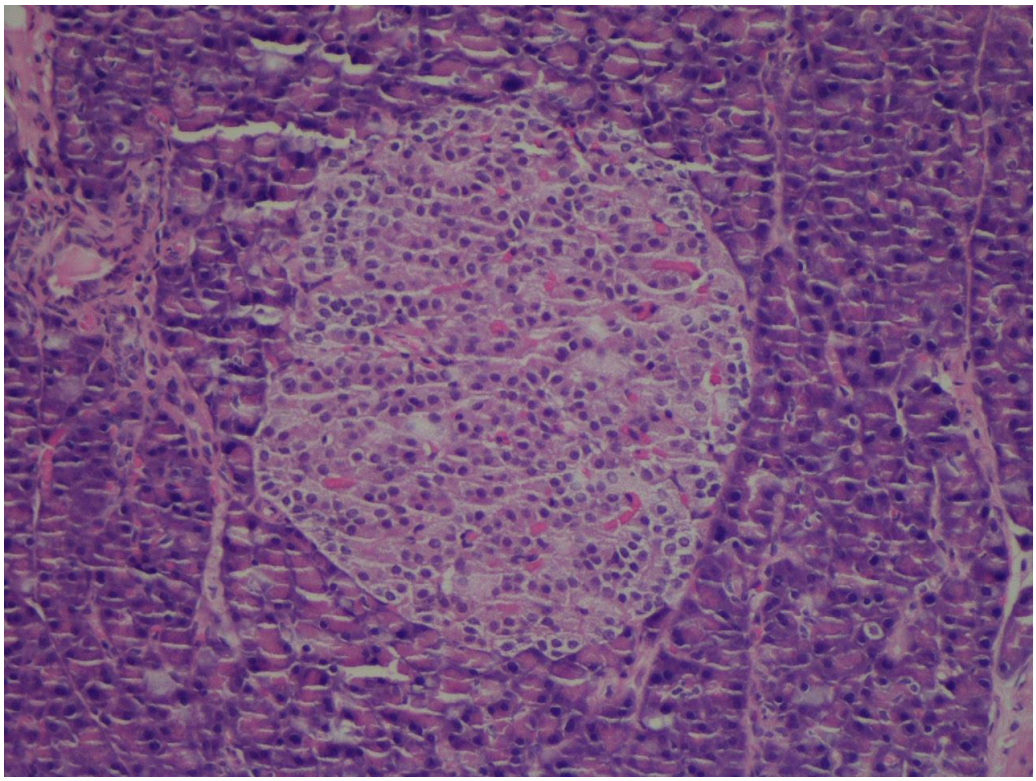
Şekil 22. **Normal uyku grubunda normale yakın morfolojideki pankreas dokusunda orta boyutlu yuvarlak şekilli pankreas adacıkları (H&E ×4).**



Şekil 23. **Uyku kısıtlanması grubunda pankreas adacık sayısında artış, yapıda değişkenlik (H&E ×4)**

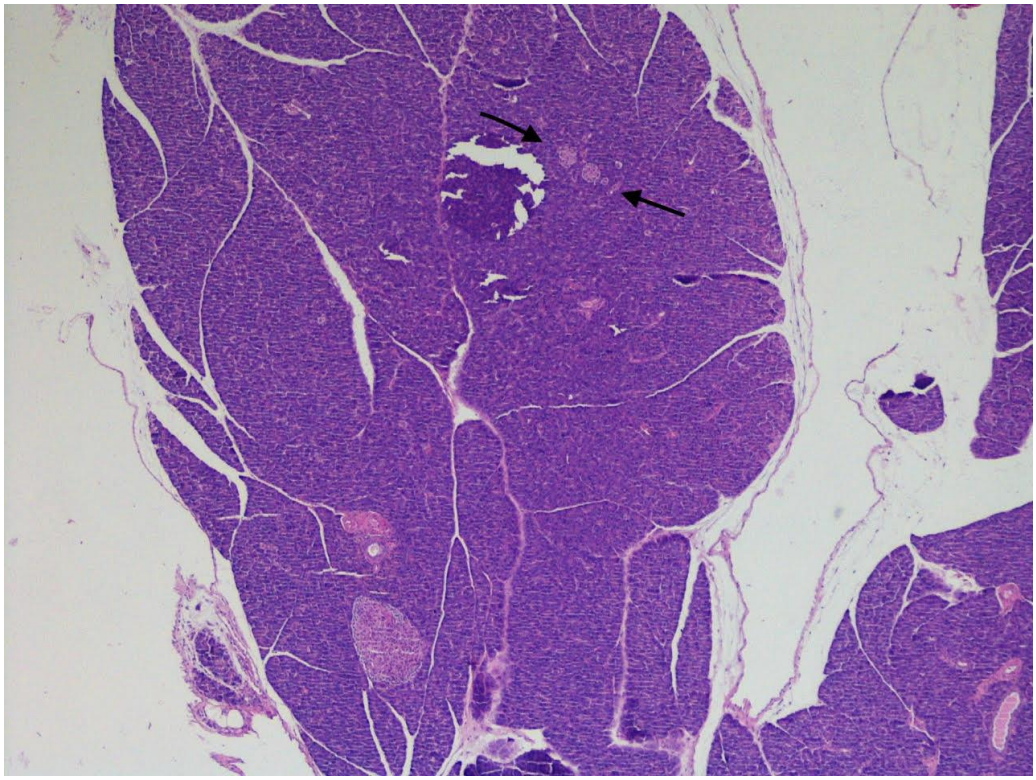


A



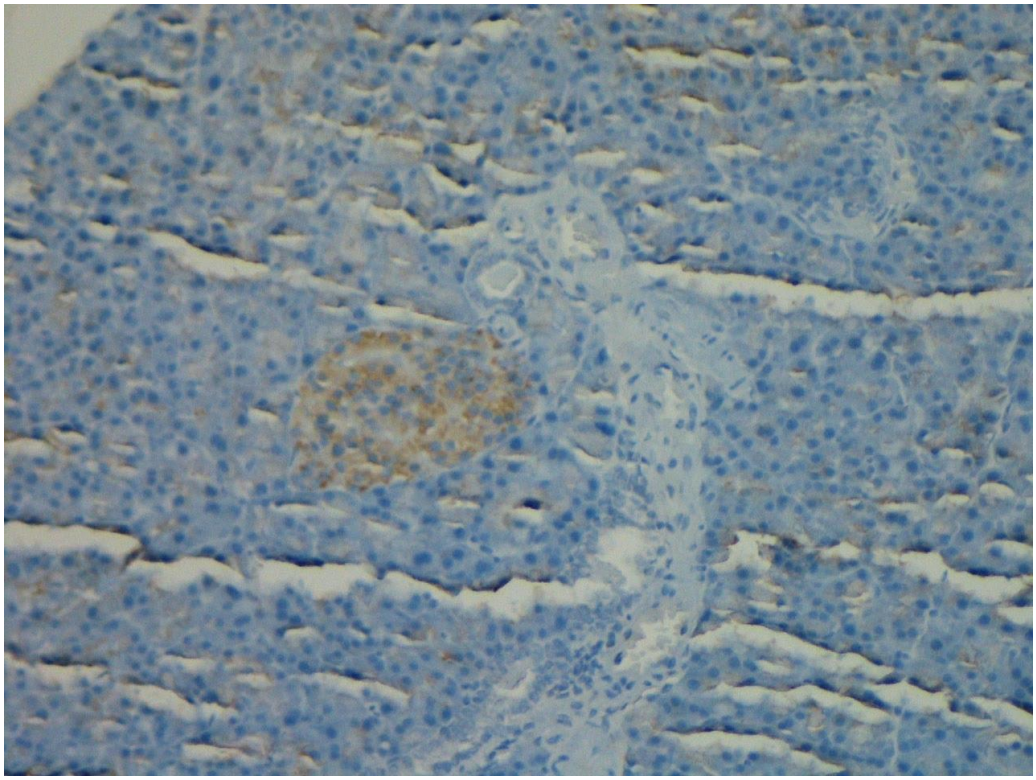
B

Şekil 24. **A, Uyku kısıtlanması + melatonin grubunda pankreas adacığında boyutsal artış, sınırlarda düzensizlik ve konjesyon (H&E ×40). B, Uyku kısıtlanması grubunda pankreas adacığında boyutsal artış ve konjesyon (H&E ×40)**

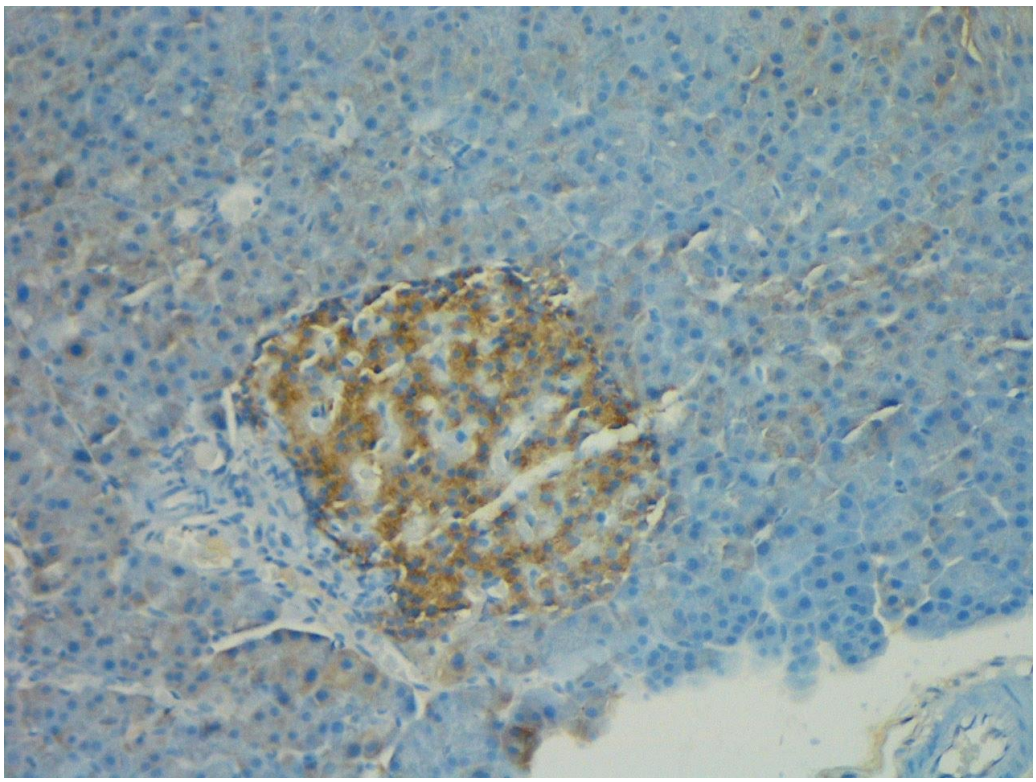


Şekil 25. Normal uyku + melatonin grubunda pankreas adacık sayısında çoğu alanda azalma, boyutta küçülme (H&E ×4).

Histopatoloji çalışması kapsamında pankreas dokusunda nesfatin-1 immün histokimya çalışması da yapıldı. Bu çalışmaya ait görüntüler Şekil 26-28'de verildi. Mikroskop büyütme gücü ×20 ile bakıldığında normal uyku grubunda adacık hücrelerinde zayıf homojen sitoplazmik nesfatin-1 boyanması (Şekil 26A), uyku kısıtlanması + melatonin grubunda adacık hücrelerinde nesfatin-1 pozitifliği izlendi (Şekil 26B). Uykusuzluk grubunda ise küçük büyütme ile (×10) artmış ve irileşmiş adacıklarda kuvvetli nesfatin-1 ifadesi görülürken (Şekil 27A), büyük büyütmede (×40) boyut artışı gösteren pankreas adacığında sitoplazmik granüler nesfatin-1 boyanması izlendi (Şekil 27B). Uykusuzluk + melatonin grubunda normal yapıdaki pankreas adacığında nesfatin-1 ifadesinde azalma izlendi (Şekil 28).

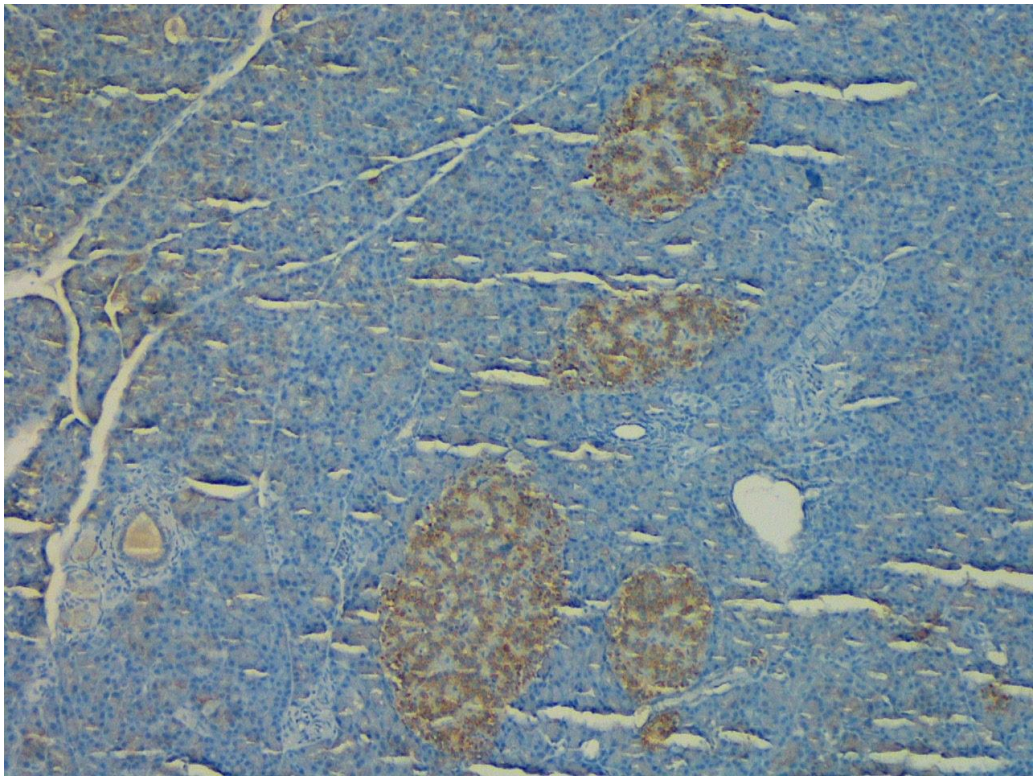


A

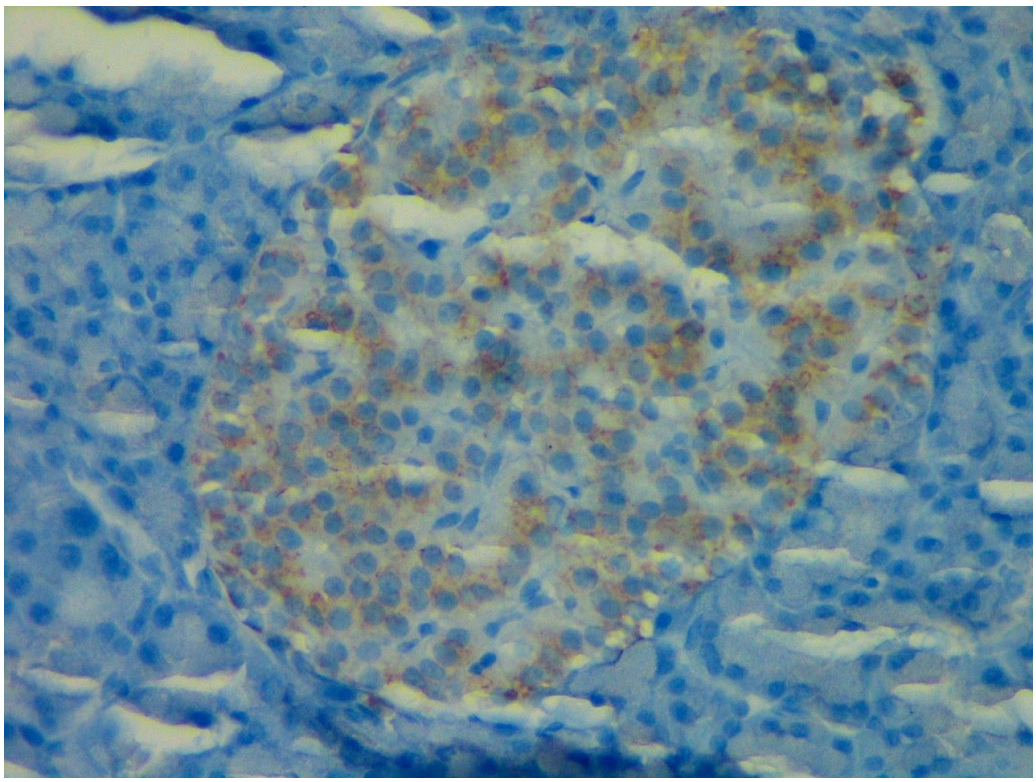


B

Şekil 26. A, normal uyku grubunda adacık hücrelerinde zayıf homojen sitoplazmik nesfatin-1 boyanması (İHK ×20); B uyku kısıtlanması + melatonin grubunda adacık hücrelerinde nesfatin-1 pozitifliği (İHK ×20).

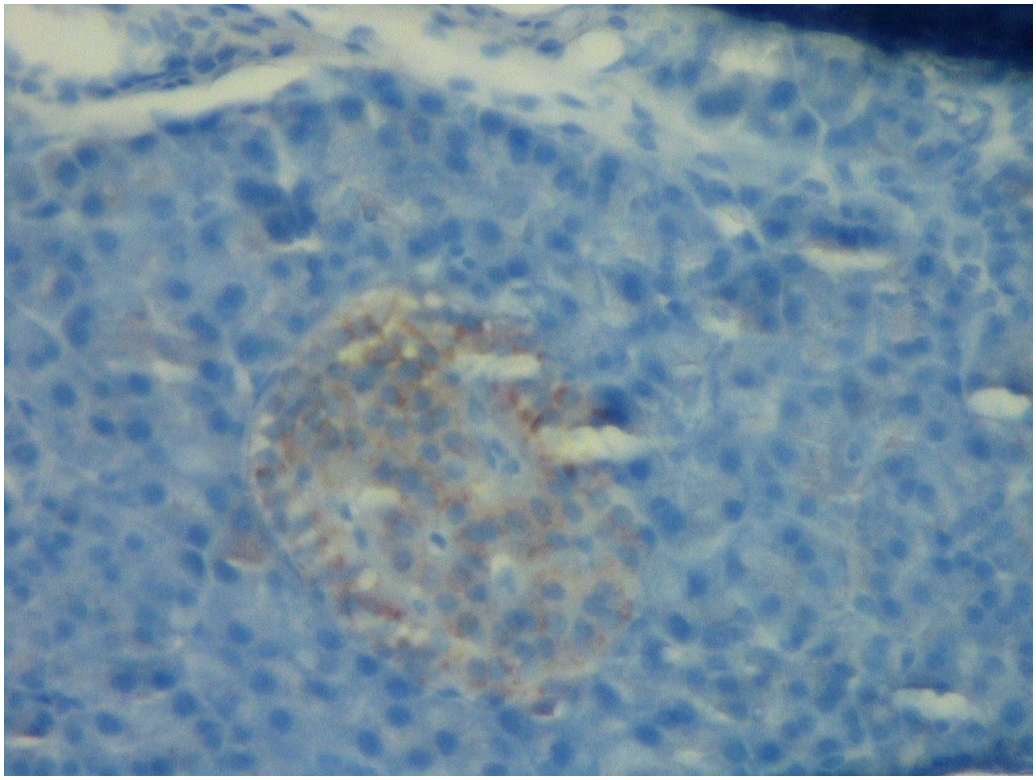


A



B

Şekil 27. A, Uykusuzluk grubunda artmış ve irileşmiş adacıklarda kuvvetli nesfatin-1 ifadesi (İHK ×10). B, boyut artışı gösteren pankreas adacığında büyük büyütmede sitoplazmik granüler nesfatin-1 boyanması (İHK ×40).



Şekil 28. Uykusuzluk+melatonin gruplarında normal yapıdaki pankreas adacığında nesfatin-1 ifadesinde azalma (İHK ×20).

Histopatolojik inceleme fakültemiz Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Fulya ÖZ PUYAN tarafından gerçekleştirildi. Histopatolojik inceleme kapsamında skorlama yapıldı ve skorlama sonuçları aşağıdaki Tablo 5'de verildi. Grupların histopatolojik skorlarının karşılaştırılmasında çapraz tablolar ve Chi-kare testi kullanıldı. Adacık sayısı, adacık boyutu, konjesyon ve nesfatin-1 immün boyama bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Adacık yapısının değerlendirilmesinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Chi-kare p=0,04). Normal uyku uyuyan ancak kronik melatonin uygulamasına maruz kalan grupta adacık yapı bozukluğu %90 oranında saptanırken bu oran uyku kısıtlanması grubunda %30 bulundu (Tablo 6).

Tablo 5. Histopatolojik değerlendirme skorları

Denek no	Adacık sayısı	Boyut	Yapı	Konjesyon	Nesfatin-1
	H&E	H&E	H&E	H&E	IHK
G1-1	0	0	0	0	0
G1-2	1	0	1	1	0
G1-3	0	2	1	1	2
G1-4	0	2	1	1	2
G1-5	0	2	1	1	0
G1-6	2	0	1	1	2
G1-7	2	1	0	1	0
G1-8	0	2	1	1	2
G1-9	1	1	1	1	1
G1-10	0	0	0	1	0
G2-1	1	1	0	1	2
G2-2	1	1	0	1	2
G2-3	1	1	0	1	2
G2-4	2	2	1	1	2
G2-5	1	2	1	1	0
G2-6	1	1	0	1	2
G2-7	1	1	0	1	2
G2-8	1	0	0	0	0
G2-9	1	1	0	1	0
G2-10	0	0	1	1	0
G3-1	1	2	1	1	2
G3-2	1	0	1	1	2
G3-3	0	2	1	1	0
G3-4	0	2	1	1	0
G3-5	0	1	0	1	1
G3-6	1	1	0	1	2
G3-7	1	2	1	1	0
G3-8	1	1	0	0	0
G3-9	1	1	0	1	0
G3-10	0	0	0	1	0
G4-1	1	1	1	1	0
G4-2	0	2	1	1	2
G4-3	1	0	0	1	2
G4-4	1	1	1	1	2
G4-5	2	2	1	1	0
G4-6	0	2	1	0	2
G4-7	0	2	1	0	0
G4-8	1	2	1	0	0
G4-9	1	1	1	1	2
G4-10	1	1	1	1	0

Kısaltmalar: H&E, hematoksilen eosin boyama; **IHK,** immün histokimya boyama

Tablo 6. Histopatolojik skorlamanın gruplar arasında karşılaştırılması

Adacık yapısı	GRUPLAR				
	Normal uyku	Uykusuzluk	Uyk + Mel	Melatonin	Toplam
Normal	3	7	5	1	16
Bozuk	7	3	5	9	24
Toplam	10	10	10	10	40

TARTIŞMA

Uykusuzluk stres, çeşitli hastalıklar, vardiyalı çalışma koşulları gibi sebeplerle sıklıkla karşılaşılan bir problem haline gelmiştir. Hizmette süreklilik gerekliliği, ekonomik rekabet, üretimin devamlılığı gibi sebeplerle sağlık, gıda ya da ulaşım alanlarında vardiyalı çalışma şartları ve çalışan sayısı giderek artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'ne bakıldığında tüm çalışan nüfusun %18'i, İngiltere'de ise %14'ü (3.6 milyon kişi) vardiyalı olarak çalışmaktadır. Avrupa Yaşama ve Çalışma Koşullarını İyileştirme Vakfı (Eurofound)'nın yayımladığı araştırma sonuçlarına göre (70) Türkiye'de 2003 yılında, çalışan nüfusun %8'i vardiyalı olarak çalışmıştır. O yılki çalışan nüfusun 21 milyon 147 bin kişi olduğu dikkate alındığında, 1.691.760 kişi vardiyalı olarak çalışmıştır (71). Bu bilgilere bakarak vardiyalı çalışan sayısı ve buna bağlı gelişen uyku bozukluklarının arttığı düşünüldüğünde uykusuzluk çalışmaları ve uykusuzluğun organizma üzerine etkilerinin anlaşılması önem kazanmaktadır. Bu çalışmada sıçanlarda 8 hafta süreli kronik REM uykusuzluğunun kan glukoz düzenlenmesi üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca dışarıdan melatonin uygulaması sonucunda glukoz metabolizmasındaki değişiklikler araştırıldı. Bu kadar uzun süreli uyku kısıtlaması insan gönüllülerde yapılamayacağından hayvan modelinde çalışılma kararı verildi.

Sıçanlarda uykusuzluk oluşturulan önceki çalışmalarda kullanılan uykusuz bırakma yöntemlerinin bazı yönlerden stres yanıtını artırabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle yapılan çalışmalarda oluşan etkinin uykusuzluğa bağlı mı yoksa yöntemin kendisinden mi kaynaklandığı netlik kazanmamıştır (72). Platform modelinde özellikle sosyal izolasyon ve immobilizasyon bu türden kısıtlılıklar oluşturduğu için model modifiye edilerek bir kafes içindeki platform sayısı artırılmış ve birden fazla hayvan konularak sosyal izolasyon önlenmiş, ayrıca hayvan sayısından daha fazla sayıda platform konularak platformdan

platforma geçiş mümkün kılınmış böylece immobilizasyon da en aza indirilmiştir. Biz de çalışmamızda sıçanlarda immobilizasyon ve izolasyon stresini en aza indiren modifiye çoklu platform modeli ile uykusuzluk oluşturduk. Böylece oluşan etkinin uykusuzluğun kendisinden kaynaklanmasını hedefledik. Ayrıca bu yöntem daha önceden valide edilmiş bir yöntem olduğu için EEG kaydı yapılmasına gerek kalmadan uykusuzluk metodu oluşturulabildi (73). Uykusuzluk oluşturmak için kafeslere sıçanların üzerinde durabileceği genişlikte olan 6,5 cm çapında 10 cm yüksekliğinde platformlar yerleştirdik. Aynı uykusuzluk kafesine 5 sıçan yerleştirirken platform sayısını 7 olarak belirledik (65).

Sekiz hafta süreyle kilo takipleri yapılan gruplarda 4 grupta da kilo artışı saptanmakla birlikte kronik uykusuzluk normal uyku durumuna kıyasla kilo artış hızını azalttı. Koban ve ark. tarafından yapılan 3 hafta süreli kronik REM uykusuzluğu çalışmasında sıçanlarda gıda alımının artmasına rağmen kilo kaybettikleri ve sıçan metabolizma hızının arttığı gösterilmiştir (74). Benzer şekilde Machado ve ark. da sıçanlarda 3 haftalık kronik REM uykusuzluğunun kilo kaybına neden olduğunu göstermiştir (75). Bu sonuçların muhtemel nedeni modifiye saksı yönteminde REM uykusu sırasında sıçanların düştüğü suyun soğukluğu ya da dar bir alana sahip platform üzerinde kalmaları sonucu artan strese maruz kalmaları olabilir. Uykusuzluk ve kilo arasındaki ilişkiyi incelemek için yapılan hayvan modellerinin karşılaştırıldığı bir derlemede stresli yöntemlerle uyku yoksunluğunun kilo kaybına yol açtığını, daha az şiddetli uyku yoksunluğu veya uyku kısıtlaması yöntemlerinin ise kilo alımını artırdığı sonucuna varılmıştır (76). Uykusuzluk yönteminin 9 gün boyunca uygulandığı sıçan çalışmasında ise kontrol grubuna kıyasla uykusuz bırakılan grupta kilo artışı olduğu gösterilmiştir (77). Sıçanlarda 8 hafta uyku kısıtlamasının yapıldığı bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla ilk hafta kilo kaybı görüldüğü daha sonra 8. haftaya kadar kilo artışının devam ettiği gösterilmiştir (78). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ilk hafta kilo kaybıyla birlikte daha sonra sekizinci haftanın sonuna kadar dört grupta da kilo artışı devam etmiştir. Bu bulgu sıçanları şiddetli bir strese maruz bırakmadan uykusuzluk yöntemi uyguladığımızı düşündürmüştür. Çalışmamızda nesfatin-1 düzeyleri de incelenmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunmamıştır. Nesfatin-1'in anoreksijenik bir peptit (56) olduğu düşünüldüğünde gruplardaki kilo alımındaki azalamanın, uykusuzluk metodunun uygulanmasından kaynaklandığı, nesfatin-1 düzeyleri ile ilişkili olmadığı sonucuna vardıldı.

Uykusuz bırakılan gruplarda melatonin uygulamasının kilo alımı üzerine etkilerine bakıldığında melatonin kilo artışını kontrol grubuna kıyasla engelledi. Menapoz sonrası

kadınlarda (79), metabolik sendromlu bireylerde (80), alkolden bağımsız karaciğer yağlanması olan gruplarda (81) yapılan çalışmalarda melatonin uygulamasının vücut ağırlığını ve vücut kitle indeksini azalttığı gösterilmiştir. 2021 yılında yapılan bir meta analizde plasebo uygulaması ile karşılaştırıldığında melatonin uygulamasının mekanizma net olarak bilinmese de vücut ağırlığını azalttığı bildirilmiştir (82). Bizim çalışmamızda da sekizinci hafta sonuçları karşılaştırıldığında uykusuzluk+mel grubunda normal uyku grubuna kıyasla kilo alımında anlamlı bir azalma oldu. Sekiz hafta sonundaki kilo alımı kontrol grubunda %13, uykusuzluk grubunda %8, uykusuzluk+mel grubunda %4 ve melatonin grubunda %5 olarak bulundu. Hem melatonin, hem de uykusuzluk uygulaması benzer bir şekilde kontrol grubuna kıyasla kilo alımını azalttığı görüldü.

Son on yılda melatonin MT2 reseptörünü kodlayan gen (*MTNR1B*)'deki bir varyantın bozulmuş açlık glikozu ve T2DM arasındaki ilişkinin keşfedilmesiyle (83) melatonine olan ilgi de artmıştır. Melatonini 8 hafta boyunca her gün uyguladığımız çalışmamızda haftalık kan glukozu ölçümleri yapıldı ve melatonin uygulamasının kan glukozuna süreye bağlı olarak zıt yönde etkisi olduğu görüldü. Literatüre bakıldığında da melatonin uygulamasının glukoz düzeylerini arttırdığı ya da azalttığı yönünde birbiriyle çelişen sonuçlar bulan çalışmalar vardır. Araştırmacıların bazıları çalışmalarında melatonin uygulamasının kan glukoz düzeylerini bozarak diyabet riskini arttıracağı yönünde sonuçlara ulaştılar. Menapoz sonrası kadınlarda yapılan bir çalışmada bir günlük 1 mg melatonin uygulamasının akut olarak kan glukozunu arttırdığı gösterilmiştir, diyabette melatonin uygulamasından kaçınılması gerektiği bildirilmiştir (84). Plasebo kontrollü sağlıklı kadınlarda yapılan bir çalışmada dört günlük hem sabah hem de akşam günlük 5 mg uygulanan melatoninin glukoz tolerans testi sonucunda plasebo grubuna göre akut olarak glukoz düzeylerini arttığı gösterilmiştir (85). Bizim çalışmamızda ise erken dönemde melatonin verilen gruplar ile melatonin verilmeyen gruplar arasında kan glukoz düzeyi bakımından fark yoktu. Ancak 3.hafta itibari ile uyku kısıtlaması ve uyku kısıtlaması+mel grubunda bir ayrışma izlendi. Sadece uyku kısıtlaması yapılan grupta kan glukozu yüksek seyrederken melatonin verilen grupta uyku kısıtlamasına rağmen kan glukoz seviyeleri daha düşük seyretmeye başladı. Ve bu etki 6.haftaya kadar sürdü. Benzer şekilde literatürde bazı çalışmalarda melatonin uygulamasının kan glukoz düzeylerini iyileştirdiği yönünde sonuçlara ulaşıldı. Tip 2 diyabetli hasta grubunda yapılan bir in vitro çalışmada melatoninin moleküler stres ile ilişkili beta hücre kaybını ve yapı bozukluğunu azalttığı gösterilmiş ve bunun sonucu olarak diyabette melatonin potansiyel bir koruyucu ve tedavi edici ajan olarak öne sürülmüştür (86). Oliveira ve ark. diyabet modeli

oluşturdukları sıçanlarda melatonin ve insülinin hem ayrı hem de kombine tedavisini uyguladıkları çalışmada 8 hafta sonunda kombine tedavinin daha iyi bir glisemik kontrol sağladığını bulmuşlardır (87). Uykusuzluk şikâyeti olan diyabetli hastalarda yapılan bir çalışmada ise 3 haftalık melatonin tedavisinden sonra ortalama serum glukoz düzeyleri melatonin tedavi grubunda daha düşük olduğu görülmüştür (7). Melatonin ve kan glukozu arasındaki verilerin çelişkili olması melatonin uygulama zamanındaki değişikliklere, uygulama dozuna, in vitro çalışmalardaki doku farklılıklarına, melatoninin lipolifik özelliği sebebiyle reseptörlerinden bağımsız hücre zarlarını kolayca geçerek reseptöründen bağımsız metabolizmayı etkileyebilecek olmasına bağlanmıştır (5). Ayrıca bizim çalışmamızdaki sonuçlara bakarak 3-6.haftalar arasında kan glukozunu düşürmesi diğer haftalarda farklı etki göstermesinden dolayı melatoninin kan glukozu üzerindeki bifazik özellikte olmasının da literatürdeki çelişkili sonuçların sebebi olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle biz de çalışmamızda melatonininin kan glukozu üzerine etkisini daha net görebilmek için her hafta kan glukozu ölçümü yaparak 8 haftalık süreçteki değişimini gösterdik.

Kan glukoz düzenlenmesinde görev alan sistemlerin bir bütün halinde değerlendirilebilmesi için ipGTT ve ipİTT testleri yapıldı. Bu testler sistemin tüm parçalarını orkestrasyon sürecinde değerlendirdi. Kan glukozu ve insülin düzeyi ölçümlerine kıyasla daha işlevsel ölçüm şansı sağladı. Kronik REM uykusuzluğu modelinin 3 ay uygulandığı bir çalışmada kontrol grubuna göre uykusuzluk grubunda GTT ölçümünde plazma glukoz düzeylerinin daha yüksek olduğu, HOMA-IR düzeylerinin yüksek olduğu ve ITT de daha yüksek glukoz seviyelerinin olduğu gösterilmiştir (68). İnsanlarda yapılan bir çalışmada sağlıklı ve T2DM hasta gruplarında oral GTT sonucu diyabetli grubun daha yüksek plazma pik glukoz düzeyleri sergilediği gösterilmiştir (88). Bizim çalışmamızda da ipGTT'de 30.dakikadaki pik glukoz değerleri ortalamalarına bakıldığında en yüksek glukoz değerlerinin uyku kısıtlaması grubunda, en düşük ise normal uyku grubunda olduğu bulundu. Bu sonuç uykusuzluk grubunda glukoz toleransının bozulduğu yönünde açıklanabilir. Uykusuzluk grubundaki bozulmuş glukozun nedeni insülin salgısındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülebilir. Serum insülin düzeylerine bakıldığına uykusuzluk gruplarında normal uyku gruplarına göre daha düşük insülin düzeylerinin ölçülmesi bu yorumu desteklemektedir.

Çalışmamızda uykusuzluğun insülin direncine etkisini incelemek için HOMA-IR hesaplaması da yapıldı. Tüm gruplarda HOMA-IR değerleri insülin direnci sınırlarının altında kaldı. Literatüre bakıldığında uykusuzluğun insülin direncini etkilemediği yönünde sonuçlar bulunmuştur. Normal kilolu 30-45 yaş arası sağlıklı kadın ve erkeklerde 3 gece boyunca uyku

kısıtlaması yapılan çalışmada uykusuzluk glukoz, insülin ve HOMA-IR düzeylerinde değişiklik yaratmamıştır. Sıçanlarda yapılan sekiz haftalık uyku kısıtlaması çalışmasında uykusuzluğun insülin duyarlılığı ve insülin direncini değiştirmediği gösterilmiştir (78). Bizim çalışmamızda da sekiz hafta sonunda yapılan HOMA-IR hesaplaması sonucu tüm grupların optimal insülin direncine sahip olmaları uykusuzluğun insülin direncini etkilemediği şeklinde yorumlanabilir. Zhan ve ark. (89) tarafından benzer şekilde kronik uyku kısıtlaması yapılan sıçanlarda glukoz düzeylerinin arttığı, insülin düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Bunun sebebi olarak pankreas adacıklarındaki beta hücre disfonksiyonu olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda da uykusuzluk grubunda görülen bozulmuş glukoz toleransının nedeni insülin direnci gelişmemiş olmasına rağmen adacık işlev bozukluğu olabileceği düşünüldü. Çalışmamızda yapılan histopatolojik inceleme sonucu normal uyku grubunda pankreas adacık morfolojisinin normal, uykusuzluk grubunda ise adacık yapısındaki düzensizlik bu yorumu güçlendirebilir.

Sonuç olarak çalışmamızda sıçanları sekiz hafta uykusuz bırakarak her gün gavaj yoluyla melatonin uygulaması yapıldı ve glikoz metabolizmasındaki değişiklikler değerlendirildi. Sekiz haftalık uykusuzluğun glukoz homeostazisini bozduğunu haftalık kan glukozu ölçümleri sonucu gösterdik. Günlük tek doz melatonin uygulamasının 3.haftadan sonra kan glukozunu azalttığı sonucuna ulaştık.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yapılan bu çalışmada sekiz hafta süre ile uykusuz bırakılan sıçanlarda melatonin uygulamasının kan glukoz düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Sıçanların günlük kilo takibi, haftalık kan glukoz ölçümleri ve sekizinci hafta sonunda ipGTT ve ipİTT ile HOMA-IR hesaplaması yapılmıştır. Elde edilen bulgular sonucu aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1-Sekiz haftalık uykusuzluk kilo alış hızını azalttı. Kilo alımının en çok görüldüğü grup normal uyuyan kontrol grubuydu. Uykusuzluk ve melatonin uygulaması kilo artış hızını azalttı.

2- Sekizinci haftanın sonunda yapılan ipGTT sonucunda pik glukoz değerlerine bakıldığında en yüksek değer uykusuz bırakılan gruptaydı. Bu bulgu ile uykusuz bırakılmanın kan glukozunu bozduğu sonucuna ulaşıldı.

3- Sekiz hafta süreli melatonin uygulaması sıçan kan glukozunu etkiledi. Bu etki 3.haftadan sonra ortaya çıktı. Ve düşürücü yönde 6.haftaya kadar devam etti.

4- Sekizinci haftanın sonunda uykusuzluk gruplarında ölçülen hormon sonuçlarına göre insülin seviyeleri normal uyku gruplarına göre anlamlı olarak daha düşüktü. Glukagon, GLP-1, nesfatin-1 seviyelerinde anlamlı bir fark görülmedi.

5- Sekizinci haftanın sonunda yapılan HOMA-IR ölçüm sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlılık olsa da tüm gruplar optimal insülin direncine sahipti. Uykusuzluk bizim çalışmamızda insülin direncini etkilemedi.

.

ÖZET

Ortalama uyku süresi günlük 7-8 saattir. Fakat değişen çalışma ve yaşam koşulları nedeniyle uyku süreleri yetersiz kalmakta ve sağlığı olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan çalışmalar uykusuzluğun glukoz metabolizmasını bozacağını, kan glukoz düzeylerini arttıracağını göstermiştir. Diyabetli hasta popülasyonun hızlı bir şekilde artması ile uykusuzluk ve glukoz düzeyleri arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalar daha çok önem kazanmış ve bu ilişki aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu nedenle biz de uykusuzluğun glukoz metabolizması üzerine etkisini ve melatoninin bu etkiyi hangi yönde değişirtireceğini göstermeyi amaçladık. Çalışmamızda 40 adet sıçan kullanarak sekiz hafta boyunca kronik REM uykusuzluğu oluşturuldu. Uykusuzluk metodu sıçanları her gün saat 16:00'dan ertesi gün saat 10:00'a kadar uykusuzluk platformlarına daha sonra da saat 10:00-16:00 arasında ev kafeslerine alarak gerçekleştirildi. Sekiz hafta boyunca her gün 5 mg/kg/gün dozunda melatonin oral gavaj yoluyla verildi. Günlük kilo takibi ve haftalık kan glukozu ölçümü yapıldı. Sekizinci haftanın sonunda ipİTT, ipGTT ve HOMA-IR hesaplaması yapıldı. ELISA ile insülin, glukagon, nesfatin-1 ve GLP-1 düzeyleri incelendi ve pankreasta histopatolojik incelemeler hematoksilen-eosin boyama ve nesfatin-1 immün histokimya ile yapıldı. Bulgularımıza bakıldığında sekiz hafta uyku kısıtlaması tüm sıçanlarda kan glukoz profilini bozdu. Kronik melatonin uygulaması 3.haftadan itibaren uykusuzluğa rağmen kan glukozunu düşürücü etki gösterdi. Serum nesfatin-1 düzeylerinde anlamlı fark yoktu. GLP-1 uyku kısıtlaması+mel grubunda uyku kısıtlaması grubuna göre yüksekti ($p=0,002$). Histopatolojik incelemede uyku kısıtlaması Langerhans adacık boyutlarında artış, sınırlarında düzensizleşme ve doku konjesyonuna neden oldu. Bu bulgular serum insülin düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde kronik uykusuzluğun pankreasta insülin salgısını azaltabileceği yönünde yorumlandı.

Anahtar Kelimeler: REM uyku kısıtlaması, GLP-1, Glukoz homeostazisi, İnsülin tolerans testi, Nesfatin-1.

EFFECTS OF MELATONIN ON GLUCOSE METABOLISM IN CHRONIC SLEEP DEPRIVATION

SUMMARY

Average daily sleep is 7-8 hours. However, due to changing working and living conditions, the sleep durations are insufficient and sleep health is affected negatively. The studies showed that sleep deprivation will disrupt glucose metabolism and increase blood glucose levels. Increasing number of diabetic patients stress the relationship between blood glucose levels and sleep loss. Therefore, we aimed to show the effects of sleep deprivation on glucose metabolism and to demonstrate healing effects of exogen melatonin. Forty rats were used in our study using chronic REM sleep deprivation for eight weeks. Sleep deprivation was performed daily from 16:00 to 10:00 on deprivation platforms and then in home cages from 10:00 to 16:00. Melatonin was given by oral gavage at dose of 5 mg/kg/day every day for eight weeks. Daily weight monitoring and weekly blood glucose measurements were performed. At the eighth week, ipITT, ipGTT, HOMA-IR were performed. Insulin, glucagon, nesfatin-1, GLP-1 levels were examined by ELISA. Pancreas histopathology was made by hematoxylin-eosin staining and immune histochemistry for nesfatin-1. Considering our findings, eight weeks of sleep restriction deteriorated the blood glucose profile in all rats. Chronic melatonin administration decreased blood glucose from the 3rdweek despite sleep deprivation. There was no significant difference in serum nesfatin-1 levels. GLP-1 was higher in the sleep deprivation+mel group than in the sleep deprivation group($p=0.002$).In histopathological examination, sleep deprivation caused an increase in Langerhans islet size,

irregular borders and tissue congestion. When these findings were evaluated together with serum insulin levels, it was interpreted that chronic sleep deprivation may decrease insulin secretion in the pancreas.

Keywords: REM sleep deprivation, GLP-1, Glucose homeostasis, Insulin tolerance test, Nesfatin-1.

KAYNAKLAR

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. Diabetes Res Clin Pract 2022;183:109119.

2. Association AD. Standards of medical care in diabetes—2017 abridged for primary care providers. Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association 2017;35(1):5.

3. Ryan S. Sleep and diabetes. Curr Opin Pulm Med 2018;24(6):555-60.

4. Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. Br J Pharmacol 2016;173(18):2702-25.

5. Garaulet M, Qian J, Florez JC, Arendt J, Saxena R, Scheer FA. Melatonin effects on glucose metabolism: time to unlock the controversy. Trends Endocrinol Metab 2020;31(3):192-204.

6. Zibolka J, Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Peschke E. Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. J Pineal Res 2018;65(1):e12480.

7. Garfinkel D, Zorin M, Wainstein J, Matas Z, Laudon M, Zisapel N. Efficacy and safety of prolonged-release melatonin in insomnia patients with diabetes: a randomized, double-blind, crossover study. Diabetes Metab Syndr Obes 2011;4:307.

8. Wittern R. Sleep theories in the antiquity and in the renaissance In: J. Horne (ed) Sleep'88. Gustav Fischer Verlag, New York; 1989.

9. Öztürk L. Yanıtını arayan eski bir soru: niçin uyuruz? J Ist Faculty Med 2007;70(4):114-21.

10. Caton R. The electric currents of the brain. Br Med J 1875;2:278.

11. Berger H. Über das elektroenkephalogramm des menschen. Arch Psychiatr Nervenkr 1929;87(1):527-70.

12. Loomis AL, Harvey EN, Hobart GA. Cerebral states during sleep as studied by human brain potentials. Journal of Experimental Psychology 1937;45(2):191-2.

13. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. Science 1953;118(3062):273-4.

14. Dement W, Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1957;9(4):673-90.

15. Hori T, Sugita Y, Koga E, Shirakawa S, Inoue K, et al. Proposed supplements and amendments to 'a manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects', the Rechtschaffen & Kales (1968) standard. Psychiatry Clin Neurosci 2001;55(3):305-10.

16. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Marcus C, Vaughn BV. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events. Rules, Terminology and Technical Specifications. American Academy of Sleep Med 2012;176:2012.

17. Öztürk L. Uyku ve uyanıklığın güncel fizyolojisi. Turkiye Klinikleri Journal of Pulm Med Special Topics 2008;1(1):5-10.

18. Simon NR, Manshanden I, da Silva FHL. A MEG study of sleep. Brain Res 2000;860(1-2):64-76.

19. Rasch B, Born J. About sleep's role in memory. Physiol Rev 2013.

20. Karadağ M. Solunum sistemi ve hastalıkları temel başvuru kitabı. İstanbul: Medikal Yayıncılık Bilimsel Eserler dizisi 2010:2099-100.

21. Altevogt BM, Colten HR. Sleep disorders and sleep deprivation: an unmet public health problem. Washington (DC): National Academies Press (US); 2006.

22. Medicine AAoS. The International Classification of Sleep Disorders:(ICSD-3): American Academy of Sleep Medicine; 2014.

23. Gangwisch JE. A review of evidence for the link between sleep duration and hypertension. Am J Hypertens 2014;27(10):1235-42.

24. McBeth J, Wilkie R, Bedson J, Chew-Graham C, Lacey RJ. Sleep disturbance and chronic widespread pain. Curr Rheumatol Rep 2015;17(1):1-10.

25. Rauchs G, Desgranges B, Foret J, Eustache F. The relationships between memory systems and sleep stages. J Sleep Res 2005;14(2):123-40.

26. Spiegel K, Sheridan JF, Van Cauter E. Effect of sleep deprivation on response to immunizaton. JAMA 2002;288(12):1471-2.

27. AlDabal L, BaHammam AS. Metabolic, endocrine, and immune consequences of sleep deprivation. Open Respir Med J 2011;5:31.

28. Van den Berg J, Knvistingh Neven A, Tulen J, Hofman A, Witteman J, Miedema H, et al. Actigraphic sleep duration and fragmentation are related to obesity in the elderly: the Rotterdam Study. Int J Obes (Lond) 2008;32(7):1083-90.

29. Benedict C, Hallschmid M, Lassen A, Mahnke C, Schultes B, Schiöth HB, et al. Acute sleep deprivation reduces energy expenditure in healthy men. Am J Clin Nutr 2011;93(6):1229-36.

30. Hursel R, Rutters F, Gonnissen HK, Martens EA, Westerterp-Plantenga MS. Effects of sleep fragmentation in healthy men on energy expenditure, substrate oxidation, physical activity, and exhaustion measured over 48 h in a respiratory chamber–. Am J Clin Nutr 2011;94(3):804-8.

31. Covassin N, Singh P, McCrady-Spitzer SK, St Louis EK, Calvin AD, Levine JA, et al. Effects of experimental sleep restriction on energy intake, energy expenditure, and visceral obesity. J Am Coll Cardiol 2022;79(13):1254-65.

32. Zhu B, Shi C, Park CG, Zhao X, Reutrakul S. Effects of sleep restriction on metabolism-related parameters in healthy adults: a comprehensive review and meta-analysis of randomized controlled trials. Sleep Med Rev 2019;45:18-30.

33. Yoon H-S, Lee K-M, Yang JJ, Lee H-W, Song M, Lee S-A, et al. Associations of sleep duration with metabolic syndrome and its components in adult Koreans: from the health examinees study. Sleep Biol Rhythms 2016;14(4):361-8.

34. Kim CE, Shin S, Lee H-W, Lim J, Lee J-k, Shin A, et al. Association between sleep duration and metabolic syndrome: a cross-sectional study. BMC Public Health 2018;18(1):1-8.

35. Miller MA, Kandala N-B, Kivimaki M, Kumari M, Brunner EJ, Lowe GD, et al. Gender differences in the cross-sectional relationships between sleep duration and markers of inflammation: Whitehall II study. Sleep 2009;32(7):857-64.

36. Irwin MR, Olmstead R, Carroll JE. Sleep disturbance, sleep duration, and inflammation: a systematic review and meta-analysis of cohort studies and experimental sleep deprivation. Biol Psychiatry 2016;80(1):40-52.

37. Reutrakul S, Van Cauter E. Sleep influences on obesity, insulin resistance, and risk of type 2 diabetes. Metabolism 2018;84:56-66.

38. Allen RP. Article reviewed: Impact of sleep dept on metabolic and endocrine function. Sleep Med 2000;2(1):149-50.

39. van Leeuwen W, Hublin C, Sallinen M, Härmä M, Hirvonen A, Porkka-Heiskanen T. Prolonged sleep restriction affects glucose metabolism in healthy young men. Int J Endocrinol 2010;2010.

40. St-Onge M-P, O'Keeffe M, Roberts AL, RoyChoudhury A, Laferrère B. Short sleep duration, glucose dysregulation and hormonal regulation of appetite in men and women. Sleep 2012;35(11):1503-10.

41. Reutrakul S, Punjabi NM, Van Cauter E. Impact of sleep and circadian disturbances on glucose metabolism and type 2 diabetes. Diabetes in America 3rd edition 2018.

42. Shan Z, Ma H, Xie M, Yan P, Guo Y, Bao W, et al. Sleep duration and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. Diabetes Care 2015;38(3):529-37.

43. Chaput J-P, Després J-P, Bouchard C, Tremblay A. Association of sleep duration with type 2 diabetes and impaired glucose tolerance. Diabetologia 2007;50(11):2298-304.

44. Tasali E, Leproult R, Ehrmann DA, Van Cauter E. Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(3):1044-9.

45. Killick R, Hoyos CM, Melehan KL, Dungan GC, Poh J, Liu PY. Metabolic and hormonal effects of 'catch-up'sleep in men with chronic, repetitive, lifestyle-driven sleep restriction. Clin Endocrinol (Oxf) 2015;83(4):498-507.

46. Kothari V, Cardona Z, Chirakalwasan N, Anothaisintawee T, Reutrakul S. Sleep interventions and glucose metabolism: systematic review and meta-analysis. Sleep Med 2021;78:24-35.

47. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2013;36(Suppl 1):S67.

48. Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL, Özcan S. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β-cells. Biochem J 2008;415(1):1-10.

49. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. J Cell Biol 2018;217(7):2273-89.

50. Ağar E. İnsan Fizyolojisi. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi, 2021: 957-59.

51. Lefèbvre PJ. Glucagon and its family revisited. Diabetes Care 1995;18(5):715-30.

52. Kleinert M, Sachs S, Habegger KM, Hofmann SM, Müller TD. Glucagon regulation of energy expenditure. Int J Mol Sci 2019;20(21):5407.

53. Gosmain Y, Cheyssac C, Heddad Masson M, Dibner C, Philippe J. Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in α-cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. Diabetes Obes Metab 2011;13:31-8.

54. Yu Q, Shuai H, Ahooghalandari P, Gylfe E, Tengholm A. Glucose controls glucagon secretion by directly modulating cAMP in alpha cells. Diabetologia 2019;62(7):1212-24.

55. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature 2006;443(7112):709-12.

56. Anwar GM, Yamamah G, Ibrahim A, El-Lebedy D, Farid TM, Mahmoud R. Nesfatin-1 in childhood and adolescent obesity and its association with food intake, body composition and insulin resistance. Regul Pept 2014;188:21-4.

57. Schalla MA, Unniappan S, Lambrecht NW, Mori M, Taché Y, Stengel A. NUCB2/nesfatin-1–Inhibitory effects on food intake, body weight and metabolism. Peptides 2020;128:170308.

58. Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, García-Rúa V, Mosquera-Leal A, Otero MF, Pereira E, et al. Nesfatin-1 in human and murine cardiomyocytes: synthesis, secretion, and mobilization of GLUT-4. Endocrinology 2013;154(12):4757-67.

59. Jego S, Salvert D, Renouard L, Mori M, Goutagny R, Luppi P-H, et al. Tuberal hypothalamic neurons secreting the satiety molecule Nesfatin-1 are critically involved in paradoxical (REM) sleep homeostasis. PLoS One 2012;7(12):e52525.

60. Vas S, Ádori C, Könczöl K, Kátai Z, Pap D, Papp RS, et al. Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats. PLoS One 2013;8(4):e59809.

61. Kaya O, Yilmaz ME, Bayram S, Gunduz O, Kizilay G, Ozturk L. Effects of cannabinoid modulation on hypothalamic nesfatin-1 and insulin resistance. Chin J Physiol 2019;62(5):182.

62. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. Journal of the american chemical society 1958;80(10):2587-.

63. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. Neurochirurgie 2015;61(2-3):77-84.

64. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. Front Neuroendocrinol 2004;25(3-4):177-95.

65. Erfanizadeh M, Noorafshan A, Namavar MR, Karbalay-Doust S, Talaei-Khozani T. Curcumin prevents neuronal loss and structural changes in the superior cervical (sympathetic) ganglion induced by chronic sleep deprivation, in the rat model. Biol Res 2020;53(1):1-15.

66. Venancio DP, Suchecki D. Prolonged REM sleep restriction induces metabolic syndrome-related changes: mediation by pro-inflammatory cytokines. Brain Behav Immun 2015;47:109-17.

67. Kamsrijai U, Wongchitrat P, Nopparat C, Satayavivad J, Govitrapong P. Melatonin attenuates streptozotocin-induced Alzheimer-like features in hyperglycemic rats. Neurochem Int 2020;132:104601.

68. Xu X, Wang L, Zhang Y, Su T, Chen L, Ma W, et al. Effects of chronic sleep deprivation on glucose homeostasis in rats. Sleep Biol Rhythms 2016;14(4):321-8.

69. Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos M. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295(5):E1269-E76.

70. EUROFOUND (2003). Katılmakta Olan ve Aday Ülkelerde Çalışma Koşulları, http://www.eurofound.europa.eu/publications/bydate/list2003.htm, Erişim Tarihi 12.12.2007.

71. Yıldız AN, Gedikli FG, Küçükbiçer B. Vardiyalı çalışmalarda iş sağlığı ve güvenliği konuları. Türkiye İşçi Sendikaları Konfederasyonu. Aydoğdu Ofset, Ankara 2012, sayfa 7.

72. Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. Physiol Behav 2000;68(3):309-16.

73. Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Comparison of the sleep pattern throughout a protocol of chronic sleep restriction induced by two methods of paradoxical sleep deprivation. Brain Res Bull 2006;70(3):213-20.

74. Koban M, Swinson KL. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005;289(1):E68-E74.

75. Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. Behav Brain Res 2005;160(2):356-64.

76. Mavanji V, Billington CJ, Kotz CM, Teske JA. Sleep and obesity: a focus on animal models. Neurosci Biobehav Rev 2012;36(3):1015-29.

77. Mavanji V, Teske JA, Billington CJ, Kotz CM. Partial sleep deprivation by environmental noise increases food intake and body weight in obesity-resistant rats. Obesity 2013;21(7):1396-405.

78. Zheng Pp, Zhang L-n, Zhang J, Chang X-m, Ding S, Xiao F, et al. Evaluating the effects of different sleep supplement modes in attenuating metabolic consequences of night shift work using rat model. Nat Sci Sleep 2020;12:1053.

79. Chojnacki C, Kaczka A, Gasiorowska A, Fichna J, Chojnacki J, Brzozowski T. The effect of long-term melatonin supplementation on psychosomatic disorders in postmenopausal women. J Physiol Pharmacol 2018;69(2).

80. Bahrami M, Cheraghpour M, Jafarirad S, Alavinejad P, Cheraghian B. The role of melatonin supplement in metabolic syndrome: A randomized double blind clinical trial. Nutr Food Sci 2019.

81. Bahrami M, Cheraghpour M, Jafarirad S, Alavinejad P, Asadi F, Hekmatdoost A, et al. The effect of melatonin on treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized double blind clinical trial. Complement Ther Med 2020;52:102452.

82. Delpino FM, Figueiredo LM. Melatonin supplementation and anthropometric indicators of obesity: A systematic review and meta-analysis. Nutrition 2021;91:111399.

83. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégel P, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. Nat Genet 2009;41(1):82-8.

84. Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, et al. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. Clin Endocrinol (Oxf) 2001;54(3):339-46.

85. Rubio-Sastre P, Scheer FA, Gómez-Abellán P, Madrid JA, Garaulet M. Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening. Sleep 2014;37(10):1715-9.

86. Costes S, Boss M, Thomas AP, Matveyenko AV. Activation of melatonin signaling promotes β-cell survival and function. Mol Endocrinol 2015;29(5):682-92.

87. de Oliveira AC, Andreotti S, Sertie RAL, Campana AB, de Proença ARG, Vasconcelos RP, et al. Combined treatment with melatonin and insulin improves glycemic control, white adipose tissue metabolism and reproductive axis of diabetic male rats. Life Sci 2018;199:158-66.

88. Bagger JI, Knop FK, Lund A, Vestergaard H, Holst JJ, Vilsbøll T. Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2011;96(3):737-45.

89. Zhan S, Wu Y, Sun P, Lin H, Zhu Y, Han X. Decrease in circulating fatty acids is associated with islet dysfunction in chronically sleep-restricted rats. Int J Mol Sci 2016;17(12):2102.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Normal fizyolojik bir uykunun evreleri 5
Şekil 2. Uyku yetersizliği ve parçalanmayı anormal glikoz metabolizması ve Tip 2 diyabete bağlayan yollar 9
Şekil 3. Kan glukozunun artması sonucu insülin geninin aktive olması 12
Şekil 4. Kan glukozunun artması sonucu β-hücrelerinden insülin salgılanması 14
Şekil 5. Pankreasın α-hücrelerinden glukagon geninin aktive olması 16
Şekil 6. Glukagon tarafından glikozun hücre içi düzenlenme mekanizması 17
Şekil 7. Nesfatin-1 'in salgılandığı farklı dokular ve bu dokulardaki etkisi. 18
Şekil 8. Melatonin sentezi 19
Şekil 9. Deney grupları 21
Şekil 10. Deney protokolü 23
Şekil 11. İnsülin düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği 25
Şekil 12. GLP-1 düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği 26
Şekil 13. Glukagon düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği 27
Şekil 14. Nesfatin-1 düzeyinin standart çalışması regresyon grafiği 28
Şekil 15. Tüm gruplarda sekiz hafta süreyle ağırlık değişimi 30
Şekil 16. Tüm gruplarda yedi hafta süreyle tokluk kan glukozu değişimi 32
Şekil 17. Çalışma gruplarında serum insülin ve glukagon düzeyleri 33
Şekil 18. Çalışma gruplarında serum GLP-1 ve nesfatin-1 düzeyleri 34
Şekil 19. İntraperitoneal glukoz tolerans testi ve insülin tolerans testi sonuçları 36

Şekil 20. HOMA insülin direnci ortalamalarının karşılaştırılması 37
Şekil 21. Pankreas ağırlığı ortalamalarının karşılaştırması 38
Şekil 22. Normal uyku grubunda normale yakın morfolojideki pankreas dokusunda orta boyutlu yuvarlak şekilli pankreas adacıkları 39
Şekil 23. Uyku kısıtlanması grubunda pankreas adacık sayısında artış, yapıda değişkenlik ... 39
Şekil 24A. Uyku kısıtlanması + melatonin grubunda pankreas adacığında boyutsal artış, sınırlarda düzensizlik ve konjesyon 40
Şekil 24B. Uyku kısıtlanması grubunda pankreas adacığında boyutsal artış ve konjesyon 40
Şekil 25. Normal uyku + melatonin grubunda pankreas adacık sayısında çoğu alanda azalma, boyutta küçülme 41
Şekil 26A. Normal uyku grubunda adacık hücrelerinde zayıf homojen sitoplazmik nesfatin-1 boyanması 42
Şekil 26B. Uyku kısıtlanması + melatonin grubunda adacık hücrelerinde nesfatin-1 pozitifliği 42
Şekil 27A. Uykusuzluk grubunda artmış ve irileşmiş adacıklarda kuvvetli nesfatin-1 ifadesi 43
Şekil 27B. Boyut artışı gösteren pankreas adacığında büyük büyütmede sitoplazmik granüler nesfatin-1 boyanması 43
Şekil 28. Uykusuzluk+melatonin gruplarında normal yapıdaki pankreas adacığında nesfatin-1 ifadesinde azalma 44

TABLOLAR

Tablo 1. NREM ve REM uyku sırasında görülen fizyolojik değişiklikler 6
Tablo 2. Amerikan Diyabet Birliği diabetes mellitus tanı ve sınıflandırma kriterleri 10
Tablo 3. Kan glukoz düzeyini etkileyen hormonlar 11
Tablo 4. Tüm grupların sekiz hafta boyunca ağırlık ortalamaları 31
Tablo 5. Histopatolojik değerlendirme skorları 45
Tablo 6. Histopatolojik skorlamanın gruplar arasında karşılaştırılması 46

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İstanbul'un Kadıköy ilçesinde doğdum. Lisans eğitimimi Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'nda, yüksek lisans eğitimimi Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladım. Doktora eğitimime 2018 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda başladım. Doktora eğitimimde YÖK'ün belirlidiği 'Metabolizma ve kronik hastalıklar' öncelikli alanında 48 ay boyunca YÖK 100/2000 bursiyeri olarak çalışmalar yaptım.

Mesleki hayatıma Trakya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde stajyer fizyoterapist olarak başladım. 2016-2017 yıllarında Babaeski Özel Aylin Şen Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi'nde, 2018-2019 yıllarında Edirne Özel Marmara Yunuslar Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi'nde çalıştım. 2022 yılından itibaren Edirne Özel Yağmur Çocuklar Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi'nde fizyoterapist olarak çalışmaktayım.

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2021/03 **Karar Tarihi**: 31.03.2021
Karar No: 2021.03.03
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 40 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK'ün yaptığı, Tuğba KIZIL'ın Doktora Tezi olarak planlanan, TÜHADYEK-2021/11 protokol nolu "**Deneysel Kronik Uykusuzluk Modelinde Eksojen Melatoninin Glukoz Metabolizmasına Etkisi"** başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Necdet SÜT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

– KATILMADI –
Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Vet. Hek. Kanan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

– KATILMADI –
Ayhan YILMAZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır