



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR
(BDNF) HETEROZİGOT FARELERDE
YÜKSEK YAĞLI DİYETİN BAZI
ADİPOKİNLERİN GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

İmran İNCE

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR
(BDNF) HETEROZİGOT FARELERDE
YÜKSEK YAĞLI DİYETİN BAZI
ADİPOKİNLERİN GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

İmran İNCE

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2017

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi İmran İNCE'nin hazırladığı **“Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Heterozigot Farelerde Yüksek Yağlı Diyetin Bazı Adipokinlerin Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ahmet ALVER

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Prof. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL

Doç. Dr. H. Avni UYDU

Tarih: .././2017

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Tarih: .../.../2017

İmran İNCE

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca derin bilgisi ile her zaman yol gösteren, örnek aldığım, tez çalışmamın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda yardımını esirgemeyen, değerli emekleri için danışmanım sayın Prof. Dr Ahmet ALVER'e,

Lisansüstü hayatım boyunca yetişmemde çok büyük katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Çalışmamızdaki hayvanların teminini sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, bu süreçte yapmış oldukları katkı ve yardımlar için Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. İsmail ABİDİN ve değerli eşi sayın Doç. Dr. Selcen ABİDİN'e,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ersan KALAY ve Arş. Gör. İdris ER'e

Eğitimim boyunca her aşamada yanımda olan, birlikte yıllarımızı geçirdiğimiz, değerli dönem ve çalışma arkadaşlarım Akın BODUR, Serap ÖZER YAMAN'a,

Çalışmamda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ayşe ŞENTÜRK'e ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde maddi olanak ve destek sağlayan TÜBİTAK'a

Koşulsuz desteklerinin ve inançlarının tükenmeyeceğini bildiğim, gösterdikleri tüm sabır, özveri ve emekleri için, varlıkları bana destek veren, en büyük dayanaklarım olan sevgili ailem ve hayatımdaki en büyük desteğim, varlığıyla huzur bulduğum nişanlım Metehan AKÇA'ya,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

İmran İNCE

Bu tez çalışması 114S553 numaralı TÜBİTAK projesi bütçesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Nörotrofinler	5
4.2. BDNF ve Genel Özellikleri	6
4.2.1. BDNF ve Enerji Metabolizmasının Düzenlenmesi	10
4.3. Yağ Dokusu	14
4.4. Adipokinler	16
4.4.1. Leptin	17
4.4.2. Adiponektin	20
4.4.3. Rezistin	21
4.4.4. Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1	22
4.5. Obezite	23
4.6. Diyet ve Obezite	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	28
5.1. Gereçler	28
5.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	28
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
5.1.3. Kullanılan Ticari Kitler	29
5.1.4. Kullanılan Fareler	30
5.2. Yöntemler	30
5.2.1. Farelerin Genotiplerinin Belirlenmesi	31

5.2.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi	32
5.2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	33
5.2.3. Serumda Yapılan Ölçümler	34
5.2.3.1. Glukoz ve Triglicerit Ölçümü	34
5.2.3.2. İnsülin Ölçümü	34
5.2.3.3. BDNF ölçümü	35
5.2.3.4. Leptin Ölçümü	36
5.2.3.4. Adiponektin Ölçümü	37
5.2.3.5. Rezistin Ölçümü	38
5.2.3.5. PAI-1 Ölçümü	39
5.2.4. Yağ Dokularında Gen Ekspresyonu Analizi	40
5.2.4.1. Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu	40
5.2.4.1.1. Elde edilen RNA'ların Kalite Kontrolü ve Miktarının Belirlenmesi	41
5.2.4.2. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Elde Edilmesi	42
5.2.4.3. Real Time PCR Aşaması	43
5.3. İstatistiksel Analizler	47
6. BULGULAR	48
6.1. Genotipleme ile ilgili Bulgular	48
6.2. Morfolojik Bulgular	48
6.3. BDNF Değerleri ile İlgili Bulgular	52
6.4. Leptin Değerleri ile İlgili Bulgular	53
6.5. Adiponektin Değerleri ile İlgili Bulgular	55
6.6. Rezistin Değerleri ile İlgili Bulgular	55
6.7. PAI-1 Değerleri ile İlgili Bulgular	56
6.8. Yağ Dokularında Ölçülen Genlerin Ekspresyonları İle İlgili Bulgular	56
6.8.1. Leptin Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	57
6.8.2. Adiponektin Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	58
6.8.3. Rezistin Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	60
6.8.4. PAI-1 Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	61
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	64
8. ÖNERİLER	85

9. KAYNAKLAR	86
10. EKLER	104
10.1. Beslenme süresince kullanılan standart diyetin (D12450J) içeriği	104
10.2. Beslenme süresince kullanılan yüksek yağlı diyetin (D12492) içeriği	105
11. ETİK KURUL ONAYI	106
12. ÖZGEÇMİŞ	107



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan cihazlar, malzemeler ve üretici firmaları	29
Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları	30
Tablo 3. Kullanılan kitler, üretici firmaları ve kodları	31
Tablo 4. Genotipleme için kullanılan BDNF ve Neomisin primerleri	32
Tablo 5. Genotipleme için hazırlanan PCR karışımı	33
Tablo 6. Total RNA’lardan cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri	43
Tablo 7. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	44
Tablo 8. Real Time PCR analizi için kullanılan reaksiyon bileşenler	45
Tablo 9. RT-PCR Protokolü	46
Tablo 10. Grupların başlangıç ve deney sonu ağırlıkları ile serum glukoz, trigliserit, insülin değerleri ve HOMA-IR skorları	51
Tablo 11. Grupların serum BDNF konsantrasyonları	52
Tablo 12. Grupların serum leptin konsantrasyonları.	53
Tablo 13. Grupların serum adiponektin konsantrasyonları	54
Tablo 14. Grupların leptin/adiponektin oranları	55
Tablo 15. Grupların serum rezistin konsantrasyonları	56
Tablo 16. Grupların serum PAI-1 konsantrasyonları	57
Tablo 17. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait leptin ekspresyon sonuçları	58
Tablo 18. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait adiponektin ekspresyon sonuçları	60
Tablo 19. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait rezistin ekspresyon sonuçları	61
Tablo 20. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait PAI-1 ekspresyon sonuçları	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Nörotrofinler ve reseptörleri	7
Şekil 2.	Fare ve sıçan BDNF genlerinin yapıları ve alternatif transkriptleri	8
Şekil 3.	BDNF'nin sentezi ve salgılanma mekanizması	9
Şekil 4.	BDNF reseptörleri ve sinyal yolları	10
Şekil 5.	Adipoz dokudan sentezlenen bazı faktörler ve fonksiyonları	18
Şekil 6.	Adipokinler, obezite ve risk faktörleri	26
Şekil 7.	İnsülin standart grafiği	36
Şekil 8.	BDNF standart grafiği	37
Şekil 9.	Leptin standart grafiği	38
Şekil 10.	Adiponektin standart grafiği	39
Şekil 11.	Rezistin standart grafiği	40
Şekil 12.	PAI-1 standart grafiği	41
Şekil 13.	Actb, Retn, Lep, Serpine1, Adipoq genlerine ait elde edilen amplifikasyon eğrileri	47
Şekil 14.	Standart ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen wild tip, BDNF (+/-) gruplardaki farelerin 4 ay boyunca ortalama ağırlık artışı	49
Şekil 15.	Grupların serum BDNF konsantrasyonlarının karşılaştırılması	52
Şekil 16.	Grupların serum leptin konsantrasyonlarının karşılaştırılması	53
Şekil 17.	Grupların serum adiponektin konsantrasyonlarının karşılaştırılması	54
Şekil 18.	Grupların leptin/adiponektin oranlarının karşılaştırılması	55
Şekil 19.	Grupların serum rezistin konsantrasyonlarının karşılaştırılması	56
Şekil 20.	Grupların serum PAI-1 konsantrasyonlarının karşılaştırılması	57
Şekil 21.	Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının leptin ekspresyonu karşılaştırılması	59
Şekil 22.	Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının adiponektin ekspresyonu karşılaştırılması	60
Şekil 23.	Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının rezistin ekspresyonu karşılaştırılması	62
Şekil 24.	Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının PAI-1 ekspresyonu karşılaştırılması	63

RESİMLER DİZİNİ

Resim		Sayfa
Resim 1.	RNA izolasyonu sonrası bazı örneklerin jel görüntüsü	43
Resim 2.	RT-PCR'dan sonra agaroz jelde ürünlerin görüntüsü	47
Resim 3.	BDNF ve neomisin bantlarının gösterildiği örnek bir agaroz jel görüntüsü	49
Resim 4.	Beslenme periyodu sonunda yüksek yağ içerikli ve standart diyet ile beslenen farelerin görüntüleri	50
Resim 5.	Deney sonunda standart ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen farelerden alınan subkutan yağ dokuları	51
Resim 6.	Deney sonunda standart ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen farelerden alınan epididimal yağ dokuları	51

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ACRP30	Adiposit kompleman-ilişkili protein 30
AgRP	Agouti-ilişkili protein
AMPK	Adenosin monofosfat aktive olan protein kinaz
ATP	Adenozin tri fosfat
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CNS	Merkezi sinir sistemi
CRP	C-reaktif protein
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GLP-1	Glukagon-benzeri peptit-1
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment
ICV	İntraserebroventriküler
IL	İnterlökin
IRS	İnsülin reseptör substratı
LTP	Uzun süreli potansiyalizasyon
MAPK	Mitojenlerle aktive edilen protein kinaz
mBDNF	Olgun Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
MC4R	Melanokortin-4 Reseptörü
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein -1
MCT2	Monokarboksilat taşıyıcı-2
NF-κB	Nükleer faktör kappa b
NGF	Sinir büyüme faktörü
NMDA	N-metil D-aspartat
NPY	Nöropeptit Y
NT	Nörotrofin
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PCL-γ	Fosfolipaz C-gama
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
ProBDNF	Öncül Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
RBP4	Retinol bağlayıcı protein

RNA	Ribo nükleik asit
RT-PCR	Real-Time polimeraz zincir reaksiyonu
TG	Trigliserit
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
Trk	Tropomiyozin reseptör kinaz
UCP-1	Uncoupling protein-1
VMH	Ventromedial hipotalamus
α-MSH	Melanosit uyarıcı hormonlar

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
g	Gram
μ	Mikro
n	Nano
U	Ünite
L	Litre
A	Amper

Formüller

CaCl₂	Kalsiyum Klorür
CH₃COOH	Asetik Asit
CHCl₃	Kloroform
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür

1. ÖZET

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Heterozigot Farelerde Yüksek Yağlı Diyetin Bazı Adipokinlerin Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF), enerji metabolizmasının merkezi kontrolünde görev alan bir nörotrofindir. BDNF ekspresyonunun az olduğu hayvanlarda hiperfaji, obezite ve diyabet görülmektedir. Yağ dokusu, salgıladığı adipokinler vasıtasıyla besin alımı, insülin direnci, inflamasyon gibi birçok fizyolojik olayda fonksiyon gösterir. Yağ kütlesinin arttığı durumlarda, adipokinlerin sentezinde değişiklikler meydana gelmekte ve bu da obeziteyle ilgili birçok komplikasyonu beraberinde getirmektedir. Periferde etkileri çok iyi bilinmeyen BDNF'nin yağ dokusunda sentezi olmakta ve reseptörü bulunmaktadır. Çalışmamızda bu proteinin standart ve yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde yağ dokusundan adipokin sentezine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Farklı metabolik etkileri olduğundan subkutan ve visceral yağ dokularının her ikisinde de belirlenen adipokinlerin ekspresyonları araştırıldı.

C57BL/6J ırkı wild tip ve BDNF (+/-) farelerden 4 grup oluşturuldu. Bu gruplar standart ve yüksek yağlı diyetle 4 ay boyunca beslendi. Beslenme periyodunun sonunda alınan serumlarda insülin, BDNF, leptin, rezistin, PAI-1 seviyeleri ELISA kitleriyle ölçüldü. Yağ dokularında ise leptin, rezistin, adiponektin ve PAI-1 gen ekspresyonlarına bakıldı.

Serum leptin, insülin seviyeleri yüksek yağlı ve standart diyetle beslenen BDNF (+/-) gruplarında yüksek, adiponektin seviyeleri ise bu gruplarda düşük bulundu. Serum rezistin seviyeleri yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarda yüksek bulundu. Epididimal yağ dokusunda leptin ve PAI-1 ekspresyonları kontrole göre yüksek, rezistin ekspresyonu ise düşük bulundu. Adiponektin ekspresyonu yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF(+/-) grubunda düşük bulundu. Subkutan yağ dokusunda leptin ve PAI-1 ekspresyonları yüksek bulundu ($p<0.05$). BDNF'nin bazı adipokinlerin sentezini ve salgılanmasını düzenleyerek yağ dokusu fonksiyonunu etkileyebileceği ve obezitede koruyucu rol oynayabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: BDNF, leptin, nöropeptit, obezite, yağ dokusu

2. SUMMARY

Investigation of Effect of High Fat Diet on Some Adipokines Gene Expression in Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Heterozygous Mice

BDNF is a neurotrophin involved in the central control of energy metabolism. In animals with low BDNF expression, hyperphagia, obesity and diabetes are observed. Adipose tissue functions in many physiological events such as food intake, insulin resistance, and inflammation through secreted adipokines. When fat mass increases, synthesis of adipokines changes, which leading to many complications with obesity. BDNF, whose effects are not known at the periphery, is also synthesized in fat tissue and has its receptor. In our study, we aimed to investigate effect of this protein on adipokine synthesis of adipose tissue in mice fed with standard and high fat diets. Because of their different metabolic effects, the expression of adipokines identified in both subcutaneous and visceral fat tissues was investigated.

Four groups were generated by C57BL/6J wild type and BDNF (+/-) mice . These groups were fed on standard and high fat diets for 4 months. Insulin, BDNF, leptin, resistin, PAI-1 levels were measured by ELISA kits at the end of the feeding period. Leptin, resistin, adiponectin and PAI-1 gene expressions were measured in adipose tissues.

Serum leptin, insulin levels were high in the BDNF (+/-) group fed with high fat and standard diet, and adiponectin levels were low in these groups. Serum resistin levels were higher in the groups fed the high fat diet. Leptin and PAI-1 expressions were higher and resistin expression was lower than control in epididymal adipose tissue. Adiponectin expression was found to be low in the BDNF (+/-) group fed on a high fat diet. Leptin and PAI-1 expressions were high in subcutaneous adipose tissue ($p < 0.05$). It has been concluded that BDNF may play a protective role in obesity by regulating the synthesis and secretion of some adipokines and affecting fatty tissue function.

Key Words: BDNF, leptin, neuropeptide, obesity, adipose tissue

3. GİRİŞ ve AMAÇ

BDNF, merkezi sinir sisteminin gelişimi ve fonksiyonlarının kontrolünde önemli roller üstlenen bir nörotrofindir. BDNF, TrkB (tropomiyozin reseptör kinaz B) reseptörü aktivasyonu sonucu nöronlarda farklılaşma, hayatta kalım, sinaptik plastite gibi birçok nöronal fonksiyonu destekler (1). Kemirgenlerde kronik intraserebroventriküler (ICV) BDNF uygulamasının vücut ağırlığı artışıdaki azalmaları indüklediği gösterilerek, beslenme davranışının kontrolündeki rolü ilk kez ortaya koyulmuştur (2, 3). Daha sonraki çalışmalarla iştahın kontrolünde BDNF'nin önemi, hiperfajik davranış gösteren ve vücut ağırlığı yükselen BDNF (+/-) mutant farelerde gözlenmiştir (4). Vücut ağırlığında meydana getirdiği artışlara ek olarak, merkezi BDNF azalması olan BDNF (+/-) farelerde, leptin ve insülin direnci, dislipidemi, hiperglisemi de dahil olmak üzere metabolik sendromun diğer semptomları da gelişmektedir (5). Güçlü nöronal etkileri sebebiyle birçok nörolojik rahatsızlıkla ilişkisi ortaya koyulan bu proteinin, metabolizmanın düzenlenmesindeki merkezi etkilerinden dolayı obezite, diyabet gibi metabolik hastalıkların gelişiminde rol aldığı belirlenmiş olsa da metabolizmada önemli yeri olan ve bu hastalıkların patolojilerinin oluşumuna katkısı olan yağ dokusu, pankreas, karaciğer gibi periferik dokular üzerine etkisiyle ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. BDNF'yi sentezleyen ve reseptörünü bulunduran yağ dokusu, metabolik kontrolün düzenlenmesinde rolü olan endokrin organların önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Leptin, adiponektin, rezistin, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), vaspin, apelin, gibi salgıladığı birçok molekül vasıtasıyla beslenme, iştah, enerji dengesi, insülin ve glukoz metabolizması, lipid metabolizması, kan basıncının düzenlenmesi, vasküler yapılanma, koagülasyon, inflamasyon gibi vücudun birçok fizyolojik işlevinde görev almaktadır (6). Yağ dokusunun artmasıyla sentezlenen adipokinlerin miktarında değişiklik meydana gelmekte ve bu durum obeziteyle birlikte birçok patolojinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Adipokin sentezi, reseptör içeriği gibi bazı özellikler beyaz yağ dokularının yerleşimine göre (subkutan, visceral) farklılık gösterdiğinden, bu yağ dokularının metabolik etkileri ve ortaya çıkaracağı patolojiler değişiklik göstermektedir.

Kronik olarak alınan enerjinin fazla olmasına bağlı olarak gelişen obezite son yıllarda öne çıkan sağlık problemlerinden biridir. Giderek yaygınlaşan ve önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelen obezite ve özellikle visceral yağ birikimi; tip 2 diyabet,

kardiyovasküler hastalık, hipertansiyon, hiperkolestrolemi, hipertrigliseridemi ve bazı kanser türleri gibi birçok hastalığın oluşumu için risk faktörüdür (7). Çalışmalarda obezitenin altında yatan biyokimyasal mekanizmaları anlayabilmek, olası tedavi yaklaşımları geliştirebilmek ve ilaç etkinliklerini araştırabilmek için hayvanlarda obezite oluşturma sıklıkla kullanılmaktadır. Obezite etiyolojisinde hormonların, çevresel ve genetik faktörlerin rol aldığı kompleks bir hastalıktır. İnsanlarda ortaya çıkan obezite büyük oranda diyet kaynaklı olduğu için bu konudaki araştırmalarda çevresel faktörlerden biri olan diyetle indüklenmiş hayvan obezite modelleri çoğunlukla tercih edilmektedir (8).

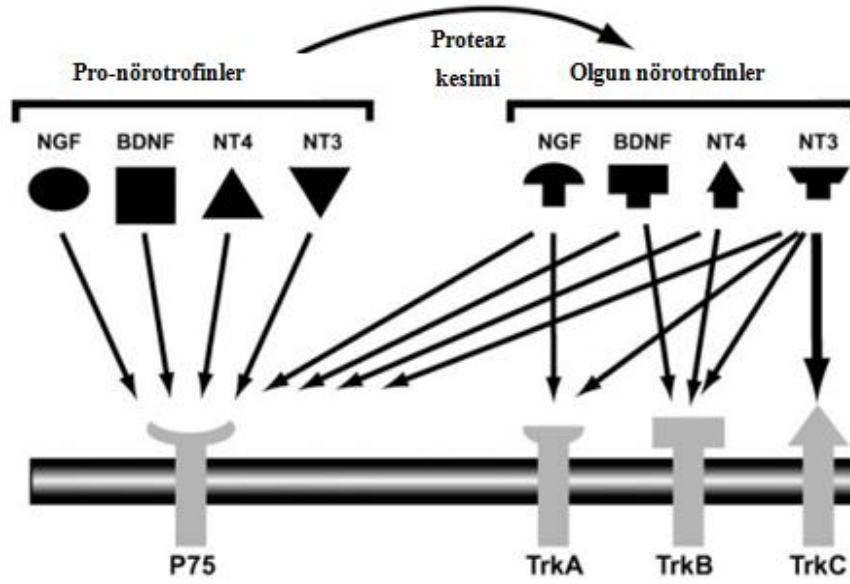
Geniş bir endokrin doku olan yağ dokusundan sentezlenen adipokinler birçok fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları için obezitenin ve obezite ile ilgili hastalıkların gelecekteki tedavisi için umut vericidirler (9). Çalışmalarda BDNF'nin de besin alımı, enerji metabolizmasında görev alan anahtar moleküllerden biri olduğu gösterilmiştir. Enerji metabolizmasındaki etkilerinden dolayı BDNF'nin obezite, diyabet gibi metabolik bozuklukların tedavisinde kullanılabilecek hedef moleküllerden biri olabileceği düşünülmektedir (10). Fakat merkezi etkileri dışında fazla etkisi bilinmeyen bu molekülün ilişkili olduğu metabolik durumlardan dolayı yağ dokusunun protein salgısını, sentezlemesini etkileyebilmesi ve diyet indüklü obezitede adipokinlerin sentezini değiştirerek patolojik durumlarda rolünün olması muhtemeldir. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda metabolik fonksiyonları olan ve obezite gelişiminde, patolojilerinin ortaya çıkmasında önemli yeri olan leptin, adiponektin, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), rezistin adipokinlerine BDNF'nin etkisiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, obezite ve obeziteye bağlı patolojilerin gelişiminde önemli rolleri olan adipokinlere, enerji metabolizmasının düzenlenmesinde ciddi rolleri olduğu öne sürülen BDNF'nin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, yüksek yağ içerikli ve standart diyetle beslenen wild tip ve BDNF (+/-) fareler kullanılarak yapılan çalışmada, bazı adipokinlerin serum seviyeleri ile farklı lokalizasyondaki yağ dokularında (subkutan, epididimal) bu adipokinlerin gen ekspresyonları araştırıldı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Nörotrofinler

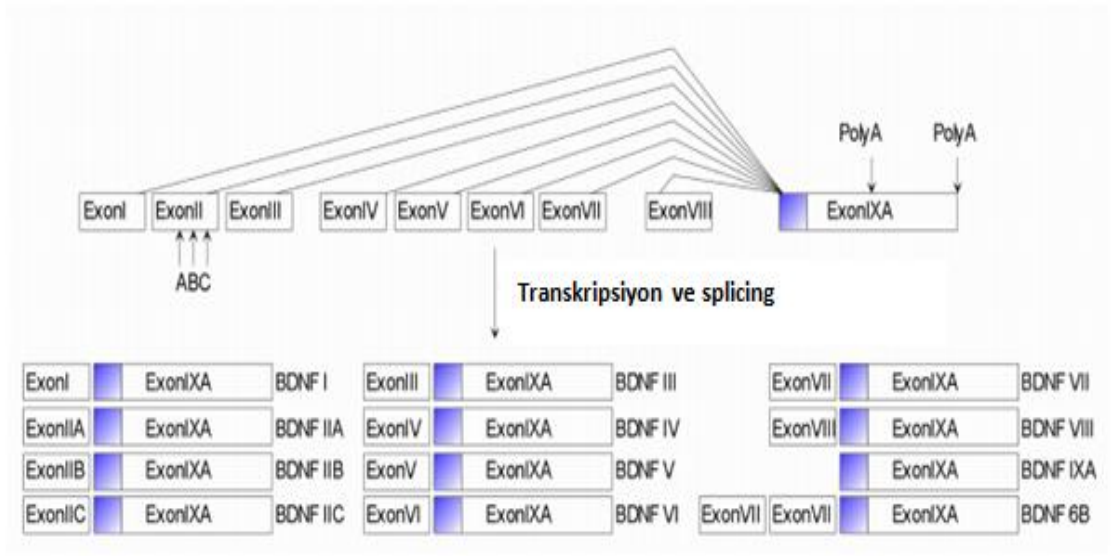
Nörotrofinler, özellikle merkezi ve periferik sinir sistemindeki nöronların gelişimi ve fonksiyonlarının kontrolünde rol oynayan büyüme faktör ailesidir. Nöronlardan salgılanan bu yaşamsal faktörlerin keşfi üzerine nörotrofin terimi ilk olarak 1988 yılında Purves ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (11). NGF (Sinir Büyüme Faktörü), BDNF, NT-3 (nörotrofin-3) NT-4/5, NT-6 ve NT-7 nörotrofin ailesinin şu zamana kadar keşfedilmiş üyeleridir. Nörotrofinler büyüme için gerekli desteği sağlayarak hücre hayatta kalımını artırmanın yanı sıra, hücre ölüm döngüleri üzerine inhibitör etkiler gösterirler. Nörotrofinler nöronların yaşamlarına devam edebilmelerinde, fonksiyonlarını yerine getirebilmelerinde, nörotransmitter salınımında, nöronların oksidatif strese ve apoptozdan korunmasında, nörogenезin uyarılmasında, ağrının ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde önemli role sahiptirler (12). Nörotrofinler prepronörotrofin olarak sentezlendikten sonra sinyal peptidinin kesilmesiyle pro-nörotrofin (Molekül ağırlığı, M.A. ~30 kDa) oluşturulur. Daha sonra prohormon konvertazlar tarafından olgun nörotrofinleri (M.A. ~14 kDa) oluşturmak için proteolitik kesime uğrarlar. Nörotrofinler iki reseptör üzerinden etkilerini gösterirler; bunlar yüksek ilgi gösterdikleri Trk (Tropomiyozin reseptör kinaz) reseptörleri ve daha düşük ilgi gösterdikleri $p75^{NTR}$ ($p75$, pannörotrofin reseptör)'dür. Bütün nörotrofinler $p75^{NTR}$ reseptörüne bağlanırken, olgun nörotrofinlerin spesifik olarak bağlandıkları farklı Trk (TrkA, TrkB, TrkC) reseptörleri vardır (Şekil 1). NGF TrkA'ya, BDNF ve NT4 TrkB'ye, NT-3 ise bütün Trk reseptörlerine bağlanabilmektedir (13).



Şekil 1. Nörotrofinler ve reseptörleri (Rosaild'den, 14).

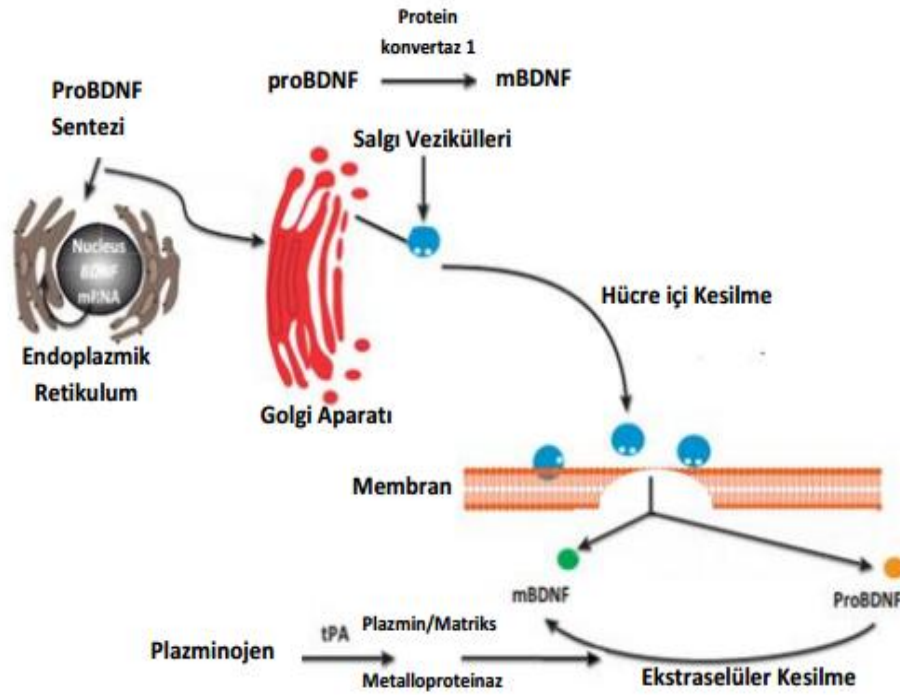
4.2. BDNF ve Genel Özellikleri

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, nörotrofin ailesinin 2. üyesi olarak 1982 yılında keşfedilmiştir (15). Amino asit dizisinin % 50'si NGF, NT-3 ve NT-4/5 ile benzerlik göstermektedir. Fare ve sıçan BDNF geninin farklı promotörler içeren sekiz kısa 5' eksonu (ekson I-VIII), olgun BDNF proteinini kodlayan bir 3' eksonu (ekson IX) ve pek çok düzenleyici elementi ile kompleks bir yapısı vardır. Promotörlerin alternatif kullanımları ve splicing mekanizmalarının kullanımı farklı BDNF mRNA'larının oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 2). BDNF gen ekspresyonu, aktivite bağımlı ve doku spesifik promotörlerle kontrol edilmektedir. Hepsi olgun BDNF'ye transle olan toplamda 9 promotör 24 farklı transkript üretmektedir. BDNF transkriptlerinden II, III, IV, V ve VII eksonlarını bulunduranlar beyine spesifikken, diğerleri beyine ek olarak nöron dışı dokularda da eksprese olmaktadır (5, 16). Özellikle nöronal aktiviteyle pozitif ilişki gösteren BDNF ekspresyonu depresyon, antidepresan tedavi (17), stres (18), zenginleştirilmiş çevre (19), egzersiz (20) gibi bazı fizyolojik ve patolojik durumlarda değişmektedir.



Şekil 2. Fare ve sıçan BDNF genlerinin yapıları ve alternatif transkriptleri (Carla'dan, 21).

BDNF, Şekil 3'de gösterildiği gibi sinyal dizisiyle birlikte pre-proBDNF olarak sentezlendikten sonra endoplazmik retikulumda öncül dizisinin kesimi sonucu 32 kDa'luk pro-BDNF (247 aminoasit) oluşturulur. Oluşan pro-BDNF inaktif bir öncül değildir, fonksiyonunu olgun BDNF'den bağımsız olarak gerçekleştirmektedir. Pro-BDNF intrasellüler alanda furin, prokonvertaz enzimleri tarafından kesilerek veya ekstrasellüler alana pro-BDNF olarak salgılanıp buradaki metaloproteinaz, plazmin gibi proteazlarla kesime uğrayarak 13,5 kDa'luk olgun BDNF (mBDNF, 118 amino asit) meydana getirmektedir (22).

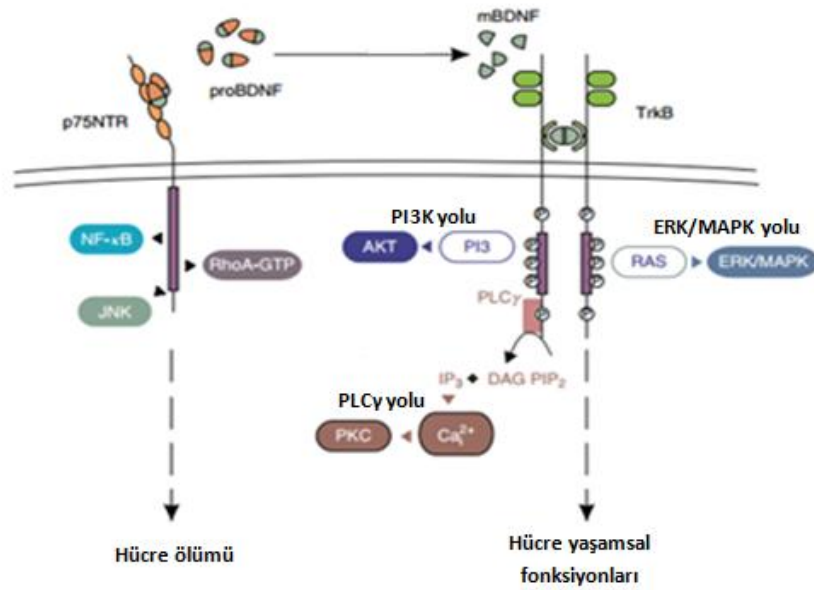


Şekil 3. BDNF'nin sentezi ve salgılanma mekanizması (Marosi'den, 23).

BDNF proteini, fonksiyonlarını $p75^{\text{NTR}}$ ve TrkB reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. Pro-BDNF yüksek ilgiyle $p75$ reseptörüne bağlanırken; olgun BDNF TrkB reseptörüne bağlanmaktadır. $p75$ reseptörü nöronal gelişimin ilk safhalarında sentezlenir ve erişkinlerde sentezi beyin bazı bölgeleriyle sınırlıdır. $p75$ ekspresyonu, bazal ön beyindeki kolinerjik nöronlarda ve striatumda yüksektir, ayrıca bazı beyin sapı çekirdeklerinde de sentezlenmektedir. $p75$ reseptörünün aktivasyonu özellikle proapoptotik cevabı indüklerken, TrkB reseptörlerinin aktivasyonu hücrenin yaşamsal fonksiyonlarına katkı sağlamaktadır. Olgun BDNF'nin TrkB reseptörüne bağlanmasıyla reseptör dimerizasyonu sonucu kinaz aktivasyonu gerçekleşir ve tirozin rezidülerinden otofosforilasyona uğrayarak $p85$ (PI-3 kinazın katalitik olmayan altbirimi), Shc (SH2-içeren dizi) gibi hücre içinde hedef proteinler için bağlanma bölgesi oluşturulur. Bu proteinlerin aktivasyonu PLC- γ (fosfolipaz C-gama), MAPK (mitojenlerle aktive edilen protein kinaz), PI3-K (fosfatidilinositol-3 kinaz) hücre içi sinyal yollarının aktifleşmesini sağlar. PI3K yolu, protein kinazı B'yi (Akt) aktive eder; Bad (Bcl-2 ilişkili ölüm promotörü)'i inhibe ederek hücre sağkalımını artırır ve sonuçta Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu sağlar. Akt'nin uygun bölgesinden

fosforilasyonu kaspaz-9 gibi pro-apoptotik proteinlerinin baskılanmasına neden olur. PLC- γ yolu, inositol trifosfatın (IP₃) aktivasyonu yoluyla hücre içi kalsiyum depolarının salınmasına yol açar ve kalmodulin kinaz (CamK) aktivitesini artırır. Böylelikle transkripsiyon faktörü CREB (siklikAMP cevap elemanı bağlama proteini) vasıtasıyla sinaptik plastisitenin artırılmasına yardımcı olur. Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolu olarak da adlandırılan MAPK yolu, hücre büyümesinde ve farklılaşmada yardımcı olur (14, 24, 25).

p75 reseptörünün glikozillenmiş ekstraselüler ligand bağlama domaini, transmembran domaini ve hücre içi katalitik aktivitesi olmayan kısa bir domaini vardır. Pro-nörotrofinlerin bu reseptöre bağlanması nükleer faktör- κ B (NF- κ B), Jun kinaz ve sfingomiyelin hidrolizi sinyal iletim yollarıyla ilişkilidir. (şekil 4) (26). p75^{NTR} reseptörünün apoptozu indüklemek dışında bir diğer görevi ise Trk reseptörleriyle birlikte koreseptör olarak bulunarak nörotrofinlerin reseptöre spesifik bağlanmasına yol açmaktır (14, 27, 28).



Şekil 4. BDNF reseptörleri ve sinyal yolları (Woo'dan, 29).

BDNF ve TrkB mRNA'sı merkezi sinir sisteminde geniş bir dağılıma sahiptir. BDNF başta hipokampus, korteks, serebellum olmak üzere beynin birçok bölgesinde sentezlenmektedir. Bu bölgelere ek olarak timus, karaciğer, dalak, adipoz doku, böbrek, prostat, mide, trake, iskelet kası, endotel hücreleri, fibroblastlar, ince bağırsak, retina, kalp, akciğer, gonadlar ve monosit, lenfosit, trombosit gibi birçok doku ve hücrede de

sentezi olmaktadır (30). Ayrıca insanlarda BDNF trombositler tarafından depolanırken farelerin trombositlerinde bu durum gösterilmemiştir (31). TrkB reseptörü ise yetişkin beyinde özellikle korteks, hipokampus, hipotalamusun birçok bölgesinde, olfaktor bulb, striatum, amigdala, septal çekirdekler, substantia nigra, serebellar purkinje hücreleri, beyin sapı ile birlikte iskelet kası, pankreas, adipoz doku gibi birçok periferik dokuda bulunmaktadır (12, 25, 32).

BDNF aksonal dallanmada, nöronal proliferasyonda, nörogenez olgunlaşmasında, sinaptik iletimde, plastisitede, sinaps oluşumunda, NMDA (N-Metil D-Aspartat) reseptörlerinin modülasyonunda, LTP (uzun süreli potansiyalizasyon) ve öğrenme gibi aktiviteye bağlı nöronal plastisitede, dendritik büyüme ve dallanmada, nörotransmitter ve nöropeptit sentezinin uyarılması, saliverilmesi gibi nöronal sistemlerin gelişim ve sağkalımını destekleyen olaylarda görev alarak nöronal fonksiyonu birçok yönden etkilemektedir. BDNF, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini ve kaspaz inhibitörlerinin ekspresyonunu indükleyeyip, Bax ve Bad gibi proapoptotik proteinlerin sentezini inhibe ederek nöronal apoptozu önlemektedir (33, 34). Sinir sistemindeki etkilerinden dolayı BDNF değerlerindeki veya aktivitesindeki değişiklikler ile depresyon, epilepsi, Alzheimer, Huntington ve Parkinson gibi birçok nörolojik hastalık arasında ilişki bulunmaktadır (35).

4.2.1. BDNF ve Enerji Metabolizmasının Düzenlenmesi

Obezite modellerinin oluşturulması ve karakterizasyonu ile periferik ve merkezi sistemdeki bazı faktörlerin metabolik fonksiyonları ve besin alımındaki etkileri belirlenmiştir. Enerji metabolizmasının merkezi düzenlenmesi, hipotalamusta bulunan nöropeptit Y (NPY), agouti ilişkili protein (AgRP), oreksin, melanin konsantrane edici hormon (MCH) gibi oreksigenik faktörlerle, kokain ve amfetamin ile ilgili transkript, serotonin, tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) ve α -Melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) gibi anoreksigenik faktörlerle ilişkilidir. Bu nöropeptitlerden biri olan BDNF proteini de çeşitli dokuları ve metabolizmada önemli molekülleri etkileyerek enerji metabolizmasının düzenlenmesinde görev almaktadır. Özellikle BDNF ve reseptörü TrkB beslenme davranışı ve metabolizmanın düzenlenmesiyle ilişkili çeşitli hipotalamik çekirdeklerde (VMN, DVC, PVN, ARC) eksprese edilmektedir (23, 36). Deney hayvanlarına intraserebroventriküler BDNF uygulanması yiyecek alımının

baskılanmasına ve kilo kaybına neden olmaktadır (37). VMN (ventromedial çekirdek) enerji metabolizmasının düzenlenmesi için önemlidir. VMN'nin elektriksel uyarımı, beslenmeyi baskılar ve lipolizi indükler. VMN'nin lezyonları ise hiperfaji ve obezite ile sonuçlanmaktadır. Farelerde yemek yoksunluğu VMN'da BDNF mRNA'sını azaltmaktadır. Leptin, kolesistokinin gibi periferik anoreksigenik hormonların enjeksiyonu VMN'daki nöronları aktive eder ve bu bölgede BDNF ekspresyonunu ve protein konsantrasyonunu artırır (38-40). BDNF hipotalamusta enerji dengesini düzenlemek için melanokortin sistemiyle de etkileşmektedir. Melanokortin ve glukozun VMN'da BDNF gen ekspresyonunun muhtemel anahtar düzenleyicileri olduğu belirtilmektedir. Aç farelere melanokortin agonistleri veya glukoz uygulaması VMN'da BDNF mRNA düzeylerini ve hipotalamik bölgelerden BDNF salınmasını uyarmaktadır (25, 41). Farelerde yüksek kan glukoz değerleri ise VMN'da BDNF ekspresyonunu inhibe eder ve insanlarda CNS (merkezi sinir sistemi)' den BDNF salgılanmasını azaltmaktadır (42). Melanokortin agonistlerinin, DVC (dorsal vagal kompleks)'de BDNF protein seviyelerini arttırmak ve hipotalamik dilimlerden BDNF salınımını uyarmak için VMN'de BDNF mRNA düzeylerini arttırdığı bulunmuştur (43-45). Besin alımını arttıran ve termogenezi azaltan önemli oreksigenik nöropeptit olan nöropeptit-Y' nin sıçanlara intraperitoneal enjeksiyonu (60 µg/kg) hipotalamusta BDNF değerlerini azaltmaktadır (46). Birçok çalışmada BDNF'nin termogenik etkilerinden de bahsedilmektedir. Uzun süreli periferik ve hipotalamik BDNF uygulaması vücut sıcaklığını, O₂ tüketimini, UCP1 (uncoupling protein-1) mRNA ve proteinini arttırarak, kahverengi yağ dokusunda termogenezi ve metabolik hızı arttırmaktadır (23). İntraserebroventriküler BDNF uygulaması, C57BL/KsJ-*db/db* farelerdeki soğuk indüklü vücut sıcaklığı düşüşlerini tersine çevirmektedir (47). Ek olarak zenginleştirilmiş çevrede yaşayan farelerdeki hipotalamik BDNF'nin aşırı ekspresyonu beyaz yağ dokusunun kahverengi yağ dokusu fenotipine dönüşümünü indükleyebildiği belirtilmektedir. Ayrıca zenginleştirilmiş çevrenin kahverengileşmeye olan etkisi ile diyetle indüklenen obeziteye direnmeyi başardığı da gösterilmiştir (48).

BDNF eksikliği olan farelerde obezite, hiperglisemi ve bozulmuş glukoz toleransı ortaya çıkmaktadır. BDNF pankreas β hücrelerinden insülin üretimini ve iskelet kasında insülin duyarlılığını arttırıp, hepatositlerde glukoz üretimini azaltarak vücutta glukoz metabolizmasını birçok hücre tipi üzerinden etkilemektedir. Ek olarak BDNF'nin sıçan

beynine infüzyonu portal vende glukagon değerlerini azaltmaktadır (49). İnsülin direnci olan hiperglisemik *db/db* farelere BDNF uygulaması, glukoz değerlerini ve insülin duyarlılığını normalleştirmektedir (50, 51). Kronik subkutan BDNF uygulaması *db/db* farelerde karaciğerde insülin reseptör aktivasyonunu ve karaciğerde, iskelet kasında insülinle uyarılan PI3K aktivitesini artırır (25). İnsülin salınımını arttıran, gıda alımını ve iştahı azaltan, gastrik boşalmayı geciktiren glukagon benzeri peptit-1'in (GLP-1) intraportal uygulaması pankreasta BDNF değerlerini artırır ve glukagon sekresyonunu azaltır. GLP-1 reseptörlerinin aktivasyonu cAMP üretimine ve BDNF ekspresyonunu da indüklediği bilinen CREB (cAMP cevap elementi bağlayıcı protein) aktivasyonuna yol açar. GLP-1'ye benzer şekilde BDNF sinyali karaciğer, iskelet ve kardiyak kas hücreleri tarafından glukoz alımını artırır (52).

BDNF ve reseptörü TrkB iskelet kas hücrelerinde de sentezlenmektedir ve kasta ekspresyonu egzersizle indüklenmektedir. BDNF asetil koenzim A karboksilaz β (ACCBeta), AMP ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) fosforilasyonunu artırarak *in vitro* ve *ex vivo* çalışmalarda kas hücrelerinde lipid oksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (53). Bu veriler, BDNF'nin iskelet kasında kasılmayla uyarılabilir protein olduğunu ve AMPK'nın aktivasyonu yoluyla lipid oksidasyonunu artırma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Egzersizin, akut beyin hasarları ve ilerleyen nörodejeneratif bozuklukları olan hayvan modellerinde iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir ve buradaki egzersizin faydalı etkilerinde BDNF sinyalinin muhtemelen rolü olduğu düşünülmektedir (10).

BDNF nöronal glukoz taşıyıcısı olan GLUT3 (Glukoz taşıyıcısı 3) ekspresyonunu ve monokarboksilik asit taşıyıcısının (MCT2) ekspresyonunu uyarır. Böylece hücre içine glukoz transportunu ve laktat alımını artırır. Na^+ bağımlı amino asit transportunu ve protein sentezini artırır. BDNF ayrıca, mitokondrial biyogenezin ana düzenleyicisi olan PGC1- α (peroksizom proliferatör reseptör γ koaktivatör-1 α)'yı ekspresyonunu artırır. Böylece artan mitokondri sayısı daha fazla ATP üretimi sağlanır (54).

BDNF homozigot (-/-) knockout fareler sinir sistemindeki bozukluklar nedeniyle doğumdan kısa süre sonra ölmektedirler. Bu farelerde koordinasyon ve dengede defektler, ataksi, hiperaktivite, solunum düzensizlikleri gözlenmektedir. BDNF'nin etkisini araştırmada önemli rol oynayan ekspresyonunun yarı yarıya azaltıldığı BDNF

heterozigot knockout (+/-) farelerde ise obezite dahil olmak üzere mekansal hafızada bozulma, kronik hiperfaji, diyabet, saldırganlık, nöbete yatkınlığın azalması gibi çeşitli fenotipler ortaya çıkmaktadır. Bu durumlar ICV BDNF enjeksiyonuyla düzeltilebilmektedir (38). BDNF (+/-) farelerde VMN, PVN (paraventriküler nükleus) veya DVC (dorsal vagal kompleks)'e BDNF infüzyonu erişkin sıçanlarda besin alımını ve toplam kilo alımını azaltmaktadır (55). Merkezi sinir sisteminde BDNF sentezi azaltılmış mutant veya BDNF (+/-) farelerde leptin ve insülin direnci, dislipidemi, hiperglisemi gelişmektedir ve dolaşımda glukoz, insülin, leptin değerleri artmaktadır (1, 56). İnsanlarda da kalıtsal BDNF eksikliği obeziteye sebep olmaktadır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda BDNF plazma düzeylerinin obeziteden bağımsız Tip 2 diyabette BDNF düzeyleri genelde düşük bulunmuştur (57). Beyin anatomisi ve hafızadaki değişikliklerle ilişkili Val66Met polimorfizmi, BDNF genindeki tek nükleotit polimorfizmidir. BDNF genindeki 66. kodondaki valin ile metiyoninin yer değiştirmesiyle oluşan Val66Met tek nükleotit polimorfizmi BDNF'nin hücre içi iletim ve salınımını etkilemektedir. Bu polimorfizmin ortak bir allel olduğu ve insan obezitesi ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir (58).

BDNF sinyalinin hedef alan uygulamalar birçok dizi metabolik ve nörolojik bozukluk için geliştirilmektedir. Günümüzde BDNF'nin obezite ve diyabetin tedavisinde kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. BDNF veya TrkB agonistleri periferik olarak uygulanabilir, ancak bu yaklaşım, TrkB ekspresyonunun yaygın dağılımından dolayı birçok yan etki yaratabilir. Belirli beyin alanlarının hedeflenen uyarımı ile endojen BDNF'nin artırılması obezite ve diyabet tedavisinde yeni ortaya çıkan bir terapötik stratejidir (23). Metabolik bozuklukların tedavisinde potansiyele sahip olan vagus sinir stimülasyonu, sıçanlarda test edilmiştir. 4 haftalık bir dönem boyunca vagus sinir uyarımı sıçanlarda vücut ağırlığı ve yağ dokusunda belirgin azalmalara neden olmuş ve bu etkilere hipotalamustaki artmış BDNF ifadesi eşlik etmiştir (59). BDNF üretimini uyaran veya TrkB'yi aktive eden doğal ürünlerin ve sentetik ilaçların, metabolik ve beyin bozukluklarının önlenmesi ve tedavisinde potansiyeli bulunmaktadır. Bir dizi bitkiden alınan ekstraktlar veya saflaştırılmış fitokimyasal maddeler, sıçan nöronlarında BDNF ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (60). Glukoz düzenlenmesinde yer alan bazı anti-diyabetik ilaçlar, kısmen BDNF ekspresyonunu indükleyerek etki gösterebilirler. BDNF üretimini arttıran GLP-1

analogları ekzenatid ve liraglutid, iştahı baskılar, nöroplastisiteyi ve bilişsel fonksiyonu geliştirir. GLP-1 analogları, diyabetik hastalarda glukoz düzenlenmesinin iyileştirilmesinde ve hayvan modellerindeki kullanımlarında oldukça etkilidir (61). BDNF'nin sağlık ve hastalıktaki rollerinin daha iyi anlaşılması ile örneklerde verildiği gibi çalışmalar geliştirilerek, bu endojen peptidin nörodejeneratif ve metabolik hastalıklar için yeni bir terapötik madde olarak kullanma yolunu açabilir.

4.3. Yağ Dokusu

Yağ dokusu lipitlerle yüklü yağ hücrelerinden oluşan gevşek bağ dokusudur. Yağ dokusu adipositlere ek olarak endotel hücreleri, fibroblastlar, monositler, makrofajlar, perisitler ve preadipositler gibi çeşitli hücreleri içeren stromal hücre fraksiyonundan oluşmaktadır. Esas olarak aşırı enerjinin depolanmasında rol alan yağ dokusu, metabolizmanın düzenlenmesinde görev alan birçok molekül sentezlediği için endokrin organ olarak fonksiyon göstermektedir (62, 63). Yağ dokusu metabolik olarak dinamik bir organdır. Sentezlediği adipokinlerle beyin, karaciğer, iskelet kası, kalp, damar, immün sistem, pankreas gibi hedef organları etkileyerek önemli biyolojik olayların düzenlenmesini sağlar. Adipoz doku trigliserit (TG) depolamada, depolamış olduğu trigliseritleri ihtiyaç halinde hidrolizlenerek yağ asitleri ve gliserole katabolize etme görevine ek olarak kemik metabolizmasında, inflamasyon, immünite, üreme, anjiyogenez, fibrinoliz, iştahın düzenlenmesi, koagülasyon, insülin duyarlılığı gibi birçok farklı biyolojik fonksiyonları olan adipokinlerin salgılanmasında görev almaktadır (64). Yağ dokusu ayrıca, gıda alımı, enerji tüketimi, metabolizma düzenlenmesi, bağışıklık ve kan basıncı homeostazı gibi birçok olayı düzenleyen faktörlerin çoğunun reseptörlerini de eksprese etmektedir (65).

Vücudumuzda beyaz ve kahverengi olmak üzere birbirinden çok farklı görevleri olan iki yağ dokusu çeşidi vardır. Bu yağ dokusu tipleri yerleşimi, hücre yapısı, damarlanma, renk, mitokondri içeriği, reseptörleri, fonksiyon ve adipokin salgılama kapasitesine göre beyaz ve kahverengi yağ dokusu olarak iki gruba ayrılmaktadır. Yeni doğanlarda, kış uykusuna yatan canlılarda bol bulunan kahverengi yağ dokusu ısı üretimi için özelleşmiş yağ dokusudur. UCP-1 proteininin varlığı ve mitokondri fazlalığı ile farklılık göstermektedir. Beyaz yağ dokusu ise memelilerdeki ana yağ deposudur. Beyaz yağ dokusu, insanların en büyük endokrin dokusunu temsil eder.

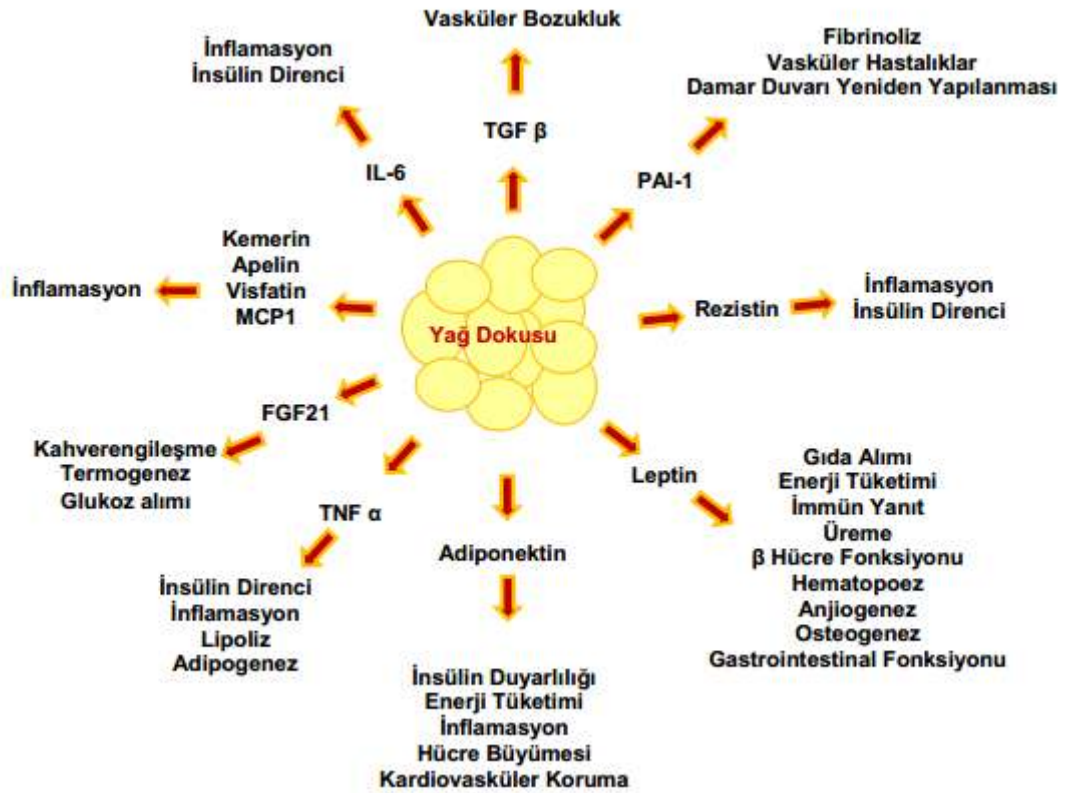
Pleiotropik yapısı, yağ hücrelerinin birçok hormon, büyüme faktörü, enzim, sitokin, kompleman faktörü ve matriks proteinini salgılama kabiliyetine dayanmaktadır. Vücudumuzdaki beyaz yağ dokusu farklı anatomik yerleşimine, hücresel, moleküler, fizyolojik, klinik ve prognostik farklılıklarına göre subkutan ve viseral olmak üzere iki ana depo yeri vardır. Her anatomik depo, metabolik ve hormonal profilleri, fizyolojik rolleri açısından farklılık gösterir. Subkutan yağ dokusu deri ile kas arasında bel, sırt, boyun bölgelerinde bulunurken, viseral yağ dokusu esas olarak abdominal boşlukta bulunmaktadır (66). Subkutan yağ dokusu, adiposit farklılaşması ve büyük miktarlarda trigliserit depolamak için hücre boyutunun genişlemesinde yüksek kapasiteye sahiptir. Bu depolama kapasitesi, viseral yağ dokusu kütlesini, karaciğer ve kas gibi dokularda ektopik yağ birikimini azaltmaya yarar. Viseral yağ dokusu metabolik olarak daha aktiftir ve lipolitik aktivitesi fazladır. Yağ dokularının glukokortikoid, androjen, östrojen, adrenerjik reseptör yoğunluğu, afinite ve sinyal iletiminde de bölgesel farklılıklar vardır (67). Subkutan ve viseral adipoz doku arasında insülin direnci ve inflamasyonla ilgili genlerin ekspresyonu ile adipokin salgılama kapasiteleri açısından farklılık bulunmaktadır. Bundan dolayı farklı depo yerlerinde yağ birikimi farklı klinik sonuçlar doğurmaktadır (68, 69). Örneğin, adipositlerin metabolizması ve endokrin işlevleri üzerindeki insülinin etkileri, subkutan yağ doku depolarında daha fazla iken, katekolaminlerin ve glukokortikoidlerin viseral yağ depolarındaki etkileri daha yüksektir (70). Viseral obezite insülin direnci ve kardiyovasküler hastalıklarla korele iken artan subkutan yağ ise plazma lipid profiliyle ilişkilidir. Adipoz doku fonksiyon bozukluğu baskın olarak; viseral yağ birikimi, yağ hücresinin hücresel kompozisyonundaki değişiklikler, immün hücrelerinin adipoz dokuya infiltrasyonun artması, adiposit hacminin genişlemesi, aterojenik, diyabetik ve proinflamatuvar adipokinlerin salınımı, adipoz doku mRNA ve protein ekspresyonlarının değişimi ile karakterizedir (6, 64, 71).

4.4. Adipokinler

Yağ dokusu ile ilgili yapılan çalışmalarda bu dokudan salgılanan ve önemli görevlere sahip birçok faktörün bulunduğu belirlenmiştir. Adipokin terimi adipoz dokudan salınan her protein için kullanılmaktadır. 1994 yılında leptinin beyaz yağ dokudan sentezlendiğinin keşfedilmesinin ardından yağ dokusu endokrin organ olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla adiponektin, rezistin, apelin,

visfatin, omentin, PAI-1, anjiyotensinojen, TNF- α (Tümör nekroz faktör- α), IL-6 (interlökin-6), MCP-1 (Monosit kemoatraktan protein -1), serum amiloid A, vaspın, serpin, haptoglobin, retinol bağlayıcı protein (RBP4), Zn α -2 glikoprotein, interferonlar gibi beyaz yağ dokusundan sentezlenen birçok molekül bulunmuştur. Bu proteinler yapısı ve fonksiyonu açısından birbirinden farklılık göstermektedirler (72, 73).

Adipokin sentezlenmesi ve üretimi bakımından beyaz yağ dokularında farklılıklar vardır. Subkutan yağ dokuda ağırlıklı olarak leptin ve açılasyon uyarıcı protein (ASP) üretilirken; visceral yağ dokuda daha çok adiponektin, yağ asidi bağlayıcı protein-4, interlökin-6, kolesterol ester transfer proteini (CETP) sentezi olmaktadır (74). Bu adipokinler iskelet kası, karaciğer, pankreas gibi periferik ve merkezi organlarla etkileşime girerek inflamasyon (IL-6, IL-8, IL-10, CRP, osteopontin, kemerin), immün cevap (adipsin, interlökinler, serum amiloid A3) beslenme davranışı (leptin, vaspın), insülin duyarlılığı (leptin, rezistin, adiponektin, kemerin), adipogenez ve kemik morfogenezi (BMP-7), kan basıncı (anjiyotensinojen), anjiyogenez, karbohidrat metabolizması (leptin, adiponektin, rezistin, vaspın, dipeptidil peptidaz-4, fibroblast büyüme faktörü 21) ve lipid metabolizması (CD36) gibi çeşitli metabolik süreçleri etkilemektedirler. (Şekil 5) (75, 76).



Şekil 5. Adipoz dokudan sentezlenen bazı faktörler ve fonksiyonları (Liping'den, 77).

Teorik olarak adipokinler adipoz dokunun fonksiyonel durumunun biyokimyasal belirteçleri olarak hizmet ederler. Sık sık obeziteye eşlik eden adipoz doku fonksiyon bozukluğunda adipokinlerin salgılanması bozulmaktadır. Değişmiş adipokin sekresyonu açlık, tokluk merkezlerinde, yağ birikiminde, insülin sekresyon ve duyarlılığında, enerji harcanmasında, inflamasyon, kan basıncı ve hemostazın düzenlenmesinde bozukluklara yol açar (71, 74, 78). Bu nedenle, pozitif enerji dengesinin neden olduğu obezite ve ilgili hastalıkların farmakoterapisi için adipokinlere dayalı mekanizmaları hedeflemek veya kullanmak, umut verici bir strateji olarak yeni fırsatlar sunmaktadırlar.

4.4.1. Leptin

Leptin, Friedman ve arkadaşları tarafından adipositlerden sentezlenen bir protein olarak 1994 yılında tanımlanmıştır (79). Leptin esas olarak olgun adipositlerden sentezlenen 16 kDa ağırlığında 167 amino asitten oluşan 7q31.3 kromozomunda lokalize bir peptittir. Yağ dokusuna ek olarak düşük miktarlarda beyin, mide, bağırsak, iskelet kası, plasenta, yumurtalık, karaciğerde de sentezi olmaktadır (80). Leptin

reseptörü sınıf I sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir ve Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re olmak üzere 5 ayrı tipi vardır. Leptin reseptörü yüksek konsantrasyonlarda yağ dokusu, karaciğer, hipotalamus, T-lenfositler, vasküler endotelial hücrelerde sentezlenirken, iskelet kası, pankreas beta hücrelerinde, kalp, akciğer, testis, overler, jejunum, adrenal medulla gibi çeşitli periferik dokularda daha düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (81). Leptin sentezi, glukokortikoidler, akut enfeksiyon ve proinflatuar sitokinler tarafından artırılırken; soğuğa maruz kalma, adrenerjik uyarım, büyüme hormonu, tiroid hormonu, melatonin, sigara ve tiazolidinedionlar leptin sentezini düşürmektedir (82).

Leptin kan beyin bariyerini geçerek çeşitli hipotalamik nöronların aktivitesini ve bazı oreksigenik (iştahı arttırıcı), anoreksigenik (iştahı azaltıcı) nöropeptitlerin ekspresyonunu etkiler. Oreksigenik hormonlardan nöropeptit Y, oreksin A, galanin, galanin benzeri peptit, aguti ilişkili peptit leptin tarafından inhibe edilirken, anoreksigenik peptitlerden olan melanokortin, nörotensin, BDNF, kortikotropin serbestleştirici hormon sentezi leptin tarafından indüklenmektedir. Merkezi sinir sisteminde leptin etkinliği termogenezi uyarır, iştahı baskılar, yağ asidi oksidasyonunu artırır, plazma glukozunu, vücut yağını ve ağırlığını azaltır. Özellikle hipotalamusun dorsal, ventral, medial çekirdeklerinde reseptörü olan leptinin hayvanlarda hipotalamik bölgelere uygulanması besin alımını ve vücut ağırlığını azaltmaktadır (83, 84).

Leptin, merkezi sinir sistemindeki rolünün yanı sıra yağ dokusu, kas ve karaciğer gibi periferik organları da etkileyerek enerji metabolizmasının kontrolünde rol alır (6, 72). Ek olarak üreme, immün cevap, anjiyogenez, insülin duyarlılığının düzenlenmesi, büyümenin kontrolü, kemik oluşumu, termogenez, yara iyileşmesi gibi çeşitli biyolojik mekanizmalarda da görev almaktadır (85). İskelet kasında leptin AMPK aktivasyonunu uyararak yağ asitlerinin beta oksidasyonu, glikoliz, mitokondriyal biyogenez gibi ATP üreten katabolik yolları artırır. Leptinin adipositlerden artmış ekspresyonu, AMPK aktivasyonu aracılığıyla *de novo* lipogenezin hız kısıtlayıcı enzimi olan asetil CoA karboksilazın gen ekspresyonunu azaltır. Böylelikle insülin duyarlılığını geliştirir. Sonuç olarak, hücre içinde malonil-CoA'daki bir azalma ve lipogenezdeki azalma artan yağ asidi beta oksidasyonu ile ilişkilidir. Leptin lipogenik transkripsiyon faktörü SREBP-1c'yi karaciğerde, pankreasta, adipoz dokuda inhibe ederek de bu dokularda

lipogenezi inhibe etmektedir. Leptin sinyali karaciğerde lipid-okside eden genlerin ekspresyonunu indükleyen PPAR α geninin düzenlenmesini sağlar (86).

Leptin reseptör eksikliği olan *db/db* fare modeline ek olarak çeşitli obezite modellerinde hipotalamik BDNF ekspresyonu azalmıştır. Leptin (*ob/ob*) ve leptin reseptör eksikliği (*db/db*) olan mutant farelere BDNF uygulaması aşırı yemeyi hafifletmeye, kilo kaybını indüklenmesine, glukoz dengesinin düzenlenmesine katkı sağlamaktadır (87). Leptin proteininde veya reseptöründe mutasyon olan farelerde obezite gözlenmektedir. Aynı şekilde doğuştan leptin eksikliği olan kişilerde hiperfaji, termogenezin bozulması, insülin direnci, hiperlipidemi, merkezi hipogonadizm ile birlikte ciddi obezite ortaya çıkmaktadır. Bu etkiler leptin tedavisiyle düzeltilmektedir. Daha çok subkutan yağ dokusundan sentezlenen leptinin obez bireylerde dolaşımdaki seviyesi ve yağ dokudan mRNA ekspresyonu artmaktadır. Artan leptin değerleri kilo kaybıyla birlikte azalmaktadır. Yağ kütlesi artışı leptin artışı ile ilişkili olduğu için leptin plazma konsantrasyonu ve adipoz dokuda mRNA ekspresyonu direkt olarak obezite şiddeti ile ilişkilendirilmiştir (79, 88-90).

İnsanlarda ve farelerde diyet ile uyarılmış obezitede leptin değerleri artmasına rağmen, diyet indüklü obezite leptin direnciyle ilişkili olduğu için bu değerler obeziteyi önlemez. Bu durum insanlarda dışarıdan leptin uygulamasına karşı terapötik etkinliği kısıtlar. Leptin direnci adipositlerin fonksiyon bozukluğuna ve adipoz doku dışındaki organlarda lipid birikimine sebep olur (91, 92). Böylelikle hiperleptinemiyle ilişkili leptin direnci hepatik yağlanma ve iskelet kası, kalp, pankreas dokularında ektopik yağ birikimine sebep olur. Leptin direnci adiposit disfonksiyonu ve adipoz dışı dokularda yağ birikiminin önemli sebebi olarak görülmektedir. Hiperleptinemide artmış proinflatuvar yanıtı ek olarak TNF- α ve IL-6'nın adipositlerde leptin üretimini uyarabilme yeteneğine sahip olduğu görülmektedir. Leptin, endotelin-1 ve nitrik oksit (NO)-sentaz sentezini, oksijen türevi moleküler türlerin üretimini, MCP-1 ekspresyonunu ve endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü tetikleyebilir (68).

4.4.2. Adiponektin

Adiposit kompleman-ilişkili protein 30 (ACRP30), adipoQ, jelatin bağlayıcı protein (GBP-28), adipoz en bol gen transkript 1 (apM1) olarak da bilinen adiponektin geni 3p27. kromozomda bulunmaktadır. Adiponektin 244 aminoasitten oluşan 30 kDa ağırlığında bir proteindir. Adipositlerden en çok sentezlenen adipokindir ve dolaşım değerleri ~10-30 µg/mL olan adiponektin total plazma proteinlerinin yaklaşık %0.01'ini oluşturmaktadır. Kan akışında trimer, hekzamer, yüksek moleküler ağırlıklı olmak üzere üç ana formda bulunur (93).

AdipoR1 ve AdipoR2 olmak üzere 2 tane adiponektin reseptörü vardır. AdipoR1 daha çok iskelet kasında eksprese olurken, AdipoR2 ise en bol karaciğer ve beyaz yağ dokuda bulunmaktadır. Obezite ile dolaşımdaki adiponektin düzeyleri ve reseptörlerinin ekspresyonları arasında negatif bir ilişki vardır. Yağ kütlesiyle ters orantılı tek adipokin olması yönünden diğerlerinden farklılık gösterir (94).

Adiponektin karaciğer, kalp, pankreas β hücreleri, böbrek, kas ve çeşitli dokularda birçok hücre tipini hedef alır. Bu protein esas olarak karaciğer ve kasta AMPK aktivasyonu vasıtasıyla insülin duyarlılığını artırır. Kasta ve karaciğerde yağ asidi oksidasyonunu ve glukoz alımını artırır. Adiponektinin birincil hedef dokusu olan karaciğerde ise glukoz-6 fosfataz, fosfoenol pirüvat karboksikinas (PEPCK) gibi enzimlerin ekspresyonunu azaltarak glukoneogenezin baskılanmasına yol açar (63, 95, 96). Adiponektin, insülin reseptörü ve insülin reseptör substrat fosforilasyonunda da görev alır. Bu fosforilasyon, karaciğer ve kasta GLUT4'ün translokasyonu için gereklidir. İskelet kasında CD36, açıl koenzim A oksidaz gibi yağ asidi transportunda görevli moleküllerin ekspresyonunu artırır. Ayrıca kasta UCP-2, açıl koenzim oksidaz ve adipoz dokuda PPAR γ ekspresyonunu artırır. Bu genlerin ekspresyonunun veya aktivitesinin artması karaciğerde ve kasta lipid katabolizmasını artırarak ve trigliserit depolanmasını azaltarak insülin direnci gelişimi riskini azaltır (97). Adiponektin enerji metabolizmasını adipoz dokuda PPAR- α aktivasyonu vasıtasıyla arttırmaktadır. Bu transkripsiyon faktörünün aktivasyonu mitokondriyal ve peroksizomal yağ asidi oksidasyonunda, glukoz homeostazında ve inflamasyonda içeren metabolik yollardaki bazı genlerin ekspresyonunu düzenler (98, 99). Diyabetik farelere adiponektin verilmesinin, insülin aktivitesini arttırarak hiperglisemiye azalttığı gösterilmiştir. Obez

farelere verildiğinde, kas dokusunda yağ asidi oksidasyonunu artırır ve plazma glukoz, serbest yağ asitleri, trigliserit düzeylerini düşürür (100).

İnsülin-duyarlılaştırıcı faktör olmanın yanı sıra, adiponektin anti-inflamatuar, anti-aterojenik, anti-diyabetik, anti-obezite, anti-fibrotik ve anti-kanser etkiler de ortaya koymaktadır. Adiponektin monositlerin endotele adezyonunu inhibe eder ve makrofajlar tarafından sitokinlerin üretimini azaltır. TNF- α ile indüklenen inflammatuar cevabı azaltır. Vasküler duvarda interselüler adezyon molekülü-1, vasküler hücresel adezyon molekülü-1, E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak ateroskleroz riski azaltır. Ayrıca insan adipositlerinde adiponektin ekspresyonu ROS, TNF- α ve IL-6 tarafından azaltılmaktadır. Genellikle dolaşımda yüksek adiponektin seviyeleri insülin duyarlılığını arttırdığından düşük plazma adiponektin seviyeleri tip 2 diyabet, hiperinsülinemi, glukoz intoleransı, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon ile ilişkilidir (101). Dolaşımdaki BDNF'nin metabolik indekslerle korelasyonu olup olmadığını belirlemek için yapılan bir çalışmada plazma adiponektinin erkeklerde plazma BDNF seviyeleri ile ters korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır (102).

Periferik dokulardaki güçlü etkilerinin yanı sıra, adiponektinin merkezi sinir sisteminde de etkileri bulunmaktadır. Adiponektinin intravenöz enjeksiyonu, proteinin kan-beyin bariyerini geçerek beyin omurilik sıvısında adiponektin seviyelerini yükseltmesine yol açar. Adiponektinin intraserebroventriküler enjeksiyonu, vücut ağırlığında azalmaya ve enerji harcamasında artışa neden olur (103). Klinik açıdan uygun koşullar altında beyindeki adiponektinin düzeylerini, kompleks dağılımını ve fizyolojik etkilerini incelemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

4.4.3. Rezistin

2001 yılında keşfedilen rezistin insanlarda 12.5 kDa ağırlığında 108 amino asit, farelerde ise 114 amino asit uzunluğunda olan bir peptittir. ADSF (adipocyte-secreted factor) veya FIZZ 3 (found in inflammatory zone 3) olarak da isimlendirilmektedir. Rezistin mononükleer hücrelerden, adipositlerden, pankreatik hücrelerden ve kastan sentezlenmektedir. Ekspresyonu visceral yağ dokuda subkutan dokuya göre daha fazla olduğu bazı çalışmalarda belirtilmektedir. Özellikle adipogenez boyunca serbest bırakılır (104). Rezistin glukoneogenik enzimlerin ekspresyonlarını artırarak, azalmış AMPK aktivitesi vasıtasıyla IRS-2 ekspresyonunu azaltarak farelerin karaciğer

dokusunda glukoz intoleransını ve insülin direncini indüklemektedir. Rezistin SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) aktivasyonu ile adipositlerde insülin aracılı sinyalin baskılanmasına yol açar (96). İnsan hepatositlerinde de rezistin IRS-2'nin ekspresyonunu azaltarak ve glikojen sentaz kinaz-3 β ekspresyonunu artırarak insülin direncini indüklemektedir. Tiazonolidionlar gibi PPAR γ ligantları rezistin ekspresyonunu ve sekresyonunu inhibe ederler (105). Rezistin mononükleer hücrelerden NF-kB sinyal yolu vasıtasıyla IL-6, TNF- α sentezini indükler. Ayrıca vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve MCP-1 ekspresyonunu ve sentezinin indüksiyonuyla endotel hasarına yol açabilir (96).

Obez fare modellerinde ve obez insanlarda yapılan çalışmalarda dolaşımdaki rezistin değerlerinin obeziteyle arttığı gösterilmiştir. Rezistin, diyabette ve komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rol oynar. Genetik obezite modellerinde (*od/ob* ve *db/db*) rezistin serum seviyeleri yüksektir. Kronik yağ tüketiminde (enerjinin % 45'i yağlardan) serum rezistin konsantrasyonu artar, insülin duyarlılığı bozulur, glukoz toleransı ise azalır (106). Rezistin keşfinden sonra yapılan çalışmalarda obeziteyle gen ekspresyonunun arttığı gösterilse de birçok çalışmada mRNA ve protein değerleri ters ilişkili bulunduğu fizyolojik rolü belirsizliğini korumaktadır (74).

4.4.4. Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1

Endotel plazminojen aktivatör inhibitör ya da serpin E1 olarak da bilinen plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) 48 kDa ağırlığında 379 aminoasit uzunluğunda bir glikoproteindir. Bir serin proteaz inhibitörü olan PAI-1 endotel hücreleri, düz kas hücreleri, karaciğer hücreleri, fibroblastlar, monositler/makrofajlara ek olarak viseral ve subkutan adipoz doku tarafından da yüksek miktarda eksprese olmakta ve salgılanmaktadır. Plazminojen aktivatörleri olan tPA (Doku plasminojen aktivatörü) ve uPA'nin (ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) ana inhibitörü olarak fonksiyonunu göstererek fibrinoliz sistemini inhibe eder. Kan dolaşımına bırakıldıktan sonra, PAI-1 aktif bir formda veya daha sıklıkla tPA veya vitronektin ile kompleks halde bulunur. PAI-1'in dolaşımdaki miktarının çoğu trombositlerde bulunurken %10 'luk bir kesimi plazmada bulunur. Son yirmi yılda, klinik çalışmalar, obezitenin bozulmuş fibrinoliz ile ilişkili olduğunu giderek daha açık bir şekilde ortaya koymuştur.

Yağ dokusunun fazla olması PAI-1 üretimini arttırır, bu da fibrinolitik sistemin bozulmasına neden olur (63, 107).

PAI-1 knockout fareler obezite ve insülin direnci gelişimine karşı korunmaktadır. Bu fareler yüksek yağlı diyetle beslendiklerinde kilo alımı azalmakta ve enerji harcanması artmaktadır. Santral obezitesi olanlarda arttığı ve kilo kaybı ile azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca tip 2 diyabeti olan hastalarda da PAI-1 seviyesi yüksektir. Bu nedenle obezite ile PAI-1 seviyesi artışı birlikteliğinin tip 2 diyabet gelişme riski için bir belirteç olduğu iddia edilmiştir. Dolaşımdaki PAI-1 artması sonucunda fibrinolitik kapasitenin azalması kardiyovasküler risk faktörü olarak belirtilmektedir. Yüksek PAI-1 ekspresyonu daha çok miyokardial infarktüs, derin ven trombozu gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (68, 108, 109). Bu yüzden, PAI-1 obezitedeki kardiyovasküler hastalıklar ile fibrinolitik sistem arasındaki ilişkinin açıklanması bakımından önemlidir.

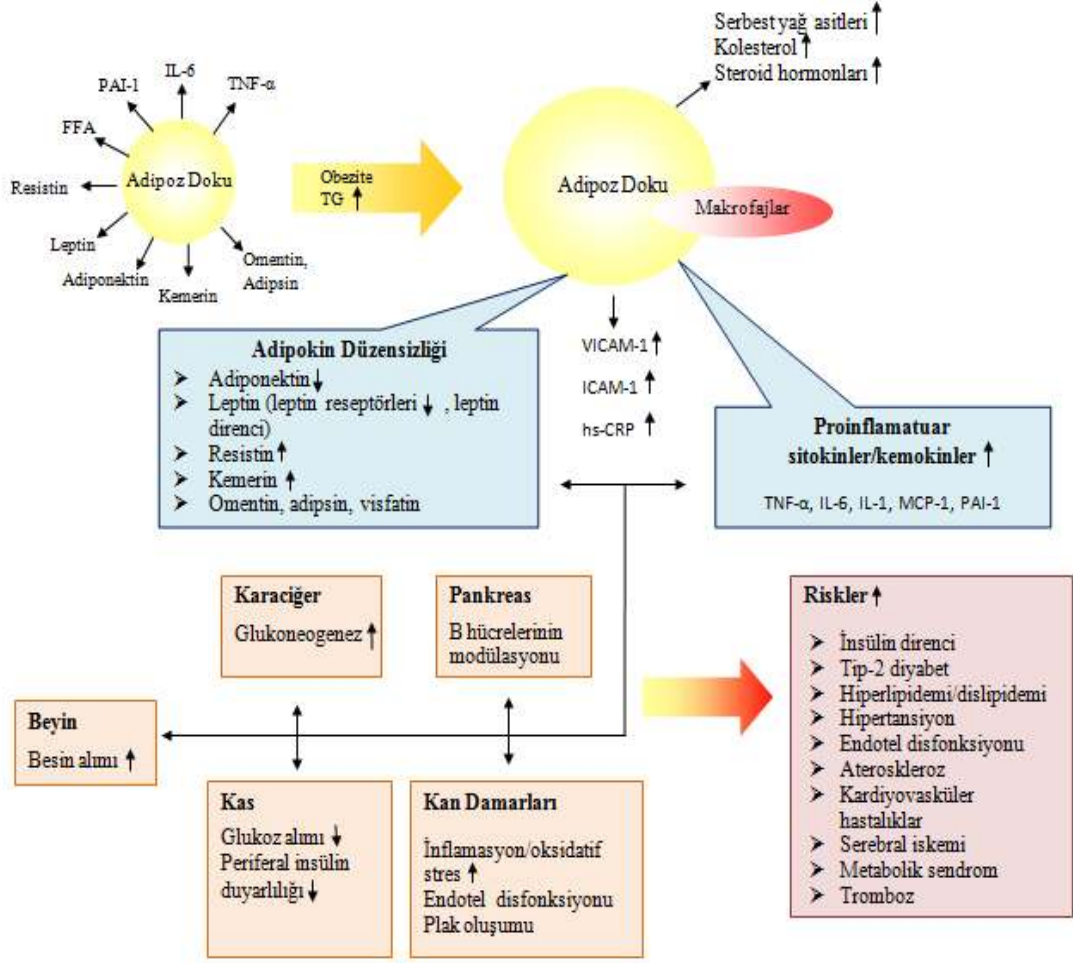
4.5. Obezite

Obezite, Dünya Sağlık Örgütü tarafından sağlığı bozacak ölçüde vücutta anormal veya aşırı yağ birikmesi olarak tanımlanmaktadır (110). Kalori alımı kalori harcanmasını aştığı zaman alınan fazla enerji yağ dokusunda trigliserit olarak depolanmakta ve obezite ortaya çıkmaktadır (111). Obezite, yağ hücresi sayısındaki artış (hiperplazi) ve/veya hacmindeki büyüme (hipertrofi) ile karakterizedir. Hücresel seviyede bakılacak olursa obezite; sadece yağ hücrelerinin patolojisi değildir, bu süreçte adipoz dokuda bulunan diğer hücre tipleri de katkıda bulunmaktadır. Yağ dokuya makrofajların infiltrasyonu, yağ hücresi ile immün sistem arasındaki bağlantıyı gerçekleştirerek obezitenin düşük dereceli kronik inflamasyon olarak da tanımlanmasına sebep olur (112).

Enerji depolarının devamlılığı, merkezi sinir sistemindeki beslenmeyi düzenleyici merkezlerle, depolama ve depoların mobilizasyonu arasındaki kompleks etkileşimler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Bu etkileşimler enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli yeri olan karaciğer, pankreas, adipoz doku, gastrointestinal sistem ve beyin ile sağlanmaktadır. Periferik dokular ve beyin beslenme durumundaki değişikliklere ve vücuttaki enerji deposunun boyutuna cevap olarak çeşitli hormon ve sinyalleri üretirler. Örneğin leptin beyaz yağ dokusundan, insülin pankreastan, ghrelin mideden, glukagon-like peptit-1 bağırsaktan, beyinden ise melanosit uyarıcı hormon,

BDNF gibi bazı moleküller üretilmektedir. Bu sinyaller, özellikle hipotalamus ve beyin sapındaki çeşitli nöronlarla birleşerek besin alımının ve enerji harcanmasının kontrol edilmesinde fonksiyon gösterirler. Bu sistemin moleküler bileşenlerini kodlayan genler obezite ve obezite ile ilgili hastalıkların temelini oluşturmaktadır (45, 112)

Obezite boyunca adipositlerin normal fonksiyonları bozulmaktadır. Obezitede, adiposit sayısında veya boyutundaki artışla yağ dokusu depoları anormal ve aşırı şekilde dolar. Yağ asitleri adipositler tarafından trigliserit olarak depolanır ve adiposit hipertrofisi obezite oluşumuna yol açar. İnflamasyon gerçekleşir ve dolaşımda monosit kemoatraktan protein-1, TNF- α , IL-6 ve adiposit yağ asidi bağlayıcı protein (A-FABP) gibi proinflamatuvar sitokinler artarken, adiponektin gibi antiinflamatuvar sitokinlerin sentezi azalır (113). Adipokinler, endotel disfonksiyonuna ve ateroskleroza katkıda bulunan hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), VCAM-1 ve C-reaktif protein (CRP) gibi endotelyal adezyon moleküllerinin üretimini artırır. Bu şekilde obezitede, adiposit hipertrofisi, lipogenez ve lipoliz arasındaki dengesizlik, adipogenez kontrol eden anahtar faktörlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde bozulma, dış sinyallere karşı duyarsızlık, sinyal iletiminde bozukluk ortaya çıkmaktadır. Böylelikle fonksiyonu bozulan adipositler; kalp, pankreas, damar duvarında, iskelet kası, karaciğer gibi organlarda birikerek ektopik yağ depoları oluşturabilir. Obezitede meydana gelen bu durumda organların fonksiyonu çevresindeki yağ tarafından değiştirilebilir ve mekanik sıkıştırma organların fonksiyonunu bozabilir (114). Bu sebeplerden dolayı obezite, birçok sistemi etkileyip insülin direnci, diyabet, ateroskleroz, dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek hastalığı, hipertansiyon, kanser, üreme bozuklukları, solunum rahatsızlıkları, inflamatuvar hastalıklar, eklem hastalıkları, metabolik sendrom, damar hastalıkları, osteoartrit gibi birçok hastalığın gelişme riskini arttırmaktadır (Şekil 6) (64, 115-117).



Şekil 6. Adipokinler, obezite ve risk faktörleri (Stupin'den, 118).

Obezitenin gelişiminde genetik ve çevresel birçok faktör etkilidir. Bazı endokrin bozuklukların ve psikiyatrik hastalıkların obeziteye neden olduğu bilinmekle beraber, en yaygın nedenleri diyetle fazla kalori alınması, yağ metabolizmasında bozukluk, fiziksel aktivitenin azalması ve genetik yatkınlıktır (63, 74).

4.6. Diyet ve Obezite

Obezitenin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde etkili bir yöntem bulunmadığından bu amaçla kullanılabilecek yeni ajanların geliştirilmesi, obezitenin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması, patolojik durumlarının araştırılması önem taşımaktadır. Bu tür çalışmaların etkili bir şekilde yapılabilmesi için deneysel obezite modellerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvan modelleri adipoz dokunun aşırı birikimiyle birlikte gerçekleşen metabolik değişiklikleri anlamak için önemlidir. Bu amaçla son zamanlarda adipoz doku çalışmalarında 500'den fazla hayvan modeli oluşturulmuştur

(119, 120). Bu modellerden deneysel çalışmalarda en çok kullanılanlar arasında indüklenmiş obezite modeli (fiziksel aktivitenin azaltılması veya kafeterya diyeti, yüksek yağlı diyet gibi diyetlerle kalori alımının artırılması), yüksek ekspresyon kaynaklı transgenik obezite modelleri (CRP, AgRP aşırı ekspresyonu), gen knockout obezite modelleri (melanokortin-4 reseptör, MC4-R, eksikliği, POMC knockout fareler), kimyasal ya da cerrahi manüplasyonlu obezite modelleri (VMH-lezyonu, ARC-lezyonu) gibi birçok model bulunmaktadır (121, 122). İnsanlardaki gözlemler, ağırlıklı olarak yüksek yağlı diyetle beslenmenin kolayca obezite oluşturabileceğini göstermiştir. Yüksek yağ ile oluşturulmuş obez hayvanlar, insanlarda yaygın ortaya çıkan obeziteyi genetik olarak oluşturulan obeziteye göre daha iyi taklit etmektedir (123, 124). İnsanlarda görülen obezite büyük oranda diyetle ilgili olduğundan hayvan çalışmalarında diyetle indüklenmiş obezite modelleri diğerlerine göre daha çok tercih edilmektedir. Kemirgenlerde farklı diyet modelleri ile obezite oluşturmak mümkündür. Hayvanlarda yapılan diyet indüklü obezite çalışmaları, alınan spesifik besinlerin obezite gelişimindeki etkilerini ve rollerini belirlemede oldukça faydalıdır.

Diyette yağ miktarının fazla olması kilo alımını artırır ve çeşitli sıçan, fare türlerinde diyabete neden olur. Diyet indüklü obezite modelleri kullanıldığında ortaya çıkan birçok etki hayvan ırkıyla yakından ilişkilidir. Çoğu kemirgen, yüksek yağlı diyetlerde obez olma eğilimindeyken; kilo artışı, glukoz toleransı, insülin direnci, trigliserit değerleri ve diğer parametreler türe bağlı değişiklik göstermektedir. Bazı hayvanlarda yüksek yağlı diyetle bağlı kilo alımı iyi bir şekilde gerçekleşirken, bazı türler ise kilo alımına karşı dirençlidir. Türler benzer kilo artışına rağmen diğer parametrelerde farklı cevaplar gösterebilirler. Örneğin Sprague-Dawley sıçanları yüksek yağlı diyetle beslendikleri zaman tür içinde obezite gelişimiyle ilgili farklı cevaplar oluştururlar. Farelerde ise A/J ve C57BL/KsJ ırkları C57BL/6J'e göre yüksek yağlı diyetle kilo alımına daha dirençlidir. B6 fareleri insanlarda obezitede gözlenen metabolik düzensizliklere benzeyen iyi bir modeldir. Bu fareler yüksek yağlı diyetle *ad libitum* beslendiklerinde obezite, hiperinsülinemi, hiperglisemi, hipertansiyon gözlenmektedir (122, 125, 126). Obezite oluşturmada sıklıkla kullanılan uzun süreli yüksek yağlı diyet tüketimi, dolaşımdaki insülin, leptin, glukoz, trigliserit değerlerini artırarak insülin direnci, hepatik yağlanma, visceral yağ birikimi, hiperglisemi gibi insan obezite mekanizmalarına benzer bozukluklar geliştirmektedir. Laboratuvar

araştırmalarında kullanılan yüksek yağ içerikli diyetlerde genellikle kalorinin % 30-60'ı yağlardan sağlanmaktadır. Daha hızlı kilo alımı sağladığı için kemirgenlerde obezitenin teşvik edilmesi için yaygın olarak kalorinin % 60'ının yağlardan sağlandığı diyetler kullanılmaktadır (127). Farelerde 16-20 hafta yüksek yağlı diyetle beslenmenin sonucunda kontrolle karşılaştırıldığında vücut ağırlığında % 20-30 artış gözlenmektedir. 16 haftanın sonunda obezite; adiposit hiperplazisi, mezenterik yağ birikimi, diyabet, hipertansiyon ile birlikte gelişmektedir. Hiperglisemi ise genelde 4 hafta içinde gelişmektedir. Açlık glukozunun yükselmesine genellikle artan açlık insülin seviyeleri artışlar eşlik etmektedir (122, 128). Farklı hayvan modellerinde obezite oluşturmak için yüksek yağlı diyetle kolesterol eklenmesi hiperkolesterolemi ve aterosklerozla birlikte çoğunlukla metabolik sendromla ilişkilidir (129). Diyetlerdeki doymuş yağlar, çoklu doymamış yağ tüketimine göre daha fazla kilo alımı sağladığından yüksek yağlı diyetin etkileri kullanılan yağın tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yüksek karbohidrat diyeti kullanımı ise vücut ağırlığını, dolaşımdaki TG değerlerini ve insülin direncini arttırır. Bu anormallikler karbohidrat kaynağı olarak sukroz veya fruktoz kullanıldığında ortaya çıkarılabilir. Fakat farelerde obezitenin derecesi yüksek yağlı diyetle beslenenlerde, yüksek karbohidrat diyetiyle beslenenlere göre daha fazladır (130).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 1’de listelenmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar, malzemeler ve üretici firmaları

Kullanılan Cihaz ve Malzeme	Marka/Model
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Çalkalayıcı inkübatör	Nüve ShelLab/Sheldon
Manyetik karıştırıcı	Termal
Mikropleyt okuyucu	Versa max, Molecular devices
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 171
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R centrifuge
Santrifüj	Eppendorf 5810
Mikropleyt yıkayıcısı	BioTek ELx 50
Real-Time PCR cihazı	Roche LightCycler 480 II
PCR cihazı	AppliedBiosystems GeneAmp9700
Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat ECX-20-M
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Elektroforez tankı	Bio-Rat Wide Mini-Sub.
Otomatik pipetler	Eppendorf
El homojenizatörü	Omni Tissue Master 125
İnkübatör	Shel Lab, Heraeus
Uv-Vis Spektrofotometre	ThermoScientific NanoDrop 2000
El homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Eppendorf ThermoMixer	Thermo Scientific
Vorteks	IKA vortex genius 3
Mikrodalga fırın	Altus ALMD 171
Derin Dondurucu (-80°C)	Thermo Electron Corporation
PCR sealing film	BIOplastics, 157300
PCR plate	BIOplastics, B17489
Kafes Sistemi	RAIR IsoSystem, Delawera, USA

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları hakkında bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma
Agaroz	Sigma
Dietil Pirokarbonat (DEPC)	Sigma
Etanol	J.T. Baker
Kloroform	Merck
Tris	Amresco
Asetik Asit	Sigma
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Merck
BDNF ve Neomisin primerleri	Integrated DNA Technologies
Etidyum Bromür	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür	Merck
Jelatin	Sigma
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich
Proteinaz K	Roche
Orange G	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck

5.1.3. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan ticari kitler ve üretici firmaları hakkında bilgiler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kitler, üretici firmaları ve kodları

Kullanılan kitler	Üretici firma, Kodu
Leptin ELISA kiti	R&D Systems, MOB00
Adiponektin ELISA kiti	R&D Systems, MRP300
Rezistin ELISA kiti	R&D Systems, MRSN00
PAI-1 ELISA kiti	Thermo FisherScientific
İnsülin ELISA kiti	Crystal Chem, 16MAUM1388
BDNF ELISA kiti	Abnova, 381238504
Mammalian Total RNA Miniprep Kit	Sigma, SLBM3520V
TriPure Isolation Reagent	Roche, 11 667 165 001
Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kit	Roche, 10842322
LightCycler 480 Probes Master	Roche, 04887301001
Real time ready Actb Assay	Roche, 307903
Real time ready Lep Assay	Roche, 310262
Real time ready Adipoq Assay	Roche, 310252
Real time ready Retn Assay	Roche, 317906
Real time ready serpine1 Assay	Roche, 310686
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, 79254

5.1.4. Kullanılan Fareler

Çalışmamızda Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen C57BL/6J ırkı wild tip ve BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) olmak üzere toplam 32 adet 4-5 haftalık 10-15 g ağırlığında erkek fareler kullanıldı.

5.2. Yöntemler

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2013/6 protokol no'lu (Bkz. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Belgesi) başvurusunun onaylanmasından sonra yapıldı. Çalışmamızda kullanılan fareler temin edildikten sonra yine aynı yerde deneyler için 12 saatlik karanlık-aydınlık ortam sağlanarak barındırılıp beslendi.

5.2.1. Farelerin Genotiplerinin Belirlenmesi

Tez çalışmamızda Korte ve meslektaşları tarafından üretilen BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) transgenik fare modeli kullanılmıştır (131). 4-5 haftalık C57BL/6J ırkı wild tip ve BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) erkek fareler temin edildikten sonra gruplandırılabilmek için kuyruktan alınan örneklerden PCR ile Korte ve arkadaşlarının belirlediği yöntemle göre genotipleme yapıldı (131). Bu heterozigot farelerde BDNF kodlama bölgesinin bir alleli yerine neomisin geni koyulmuştur. BDNF (+/-) fareler için neomisin geninin varlığı, alınan fareden kuyruk dokusundan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile doğrulanmıştır.

Genotipleme yapmak için ilk önce izolasyonda kullanılmak üzere farelerin kuyruk uçlarından çok küçük miktarlarda kesilen parça steril eppendorflara alındı. 20 mg/mL proteinaz K ve lizis tamponu (500 mM KCl, 100mM Tris, 0.1 mg/mL jelatin, 0.45 % Nonidet P-40, % 0.45 Tween 20) 1/9 oranında karıştırılıp kuyruk parçalarının bulunduğu eppendorflara bu çözeltiden ~200 µL koyularak 55 °C Thermomixer’de gece boyu bekletildi. İnkübasyondan sonra Proteinaz K inaktivasyonu için 95 °C’de 15 dk bekletildi. Daha sonra BDNF geni ve BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) farelerde bulunan neomisin geni için Tablo 4’de verilen primer dizileri kullanılarak BDNF ve neomisin primerleri için ayrı ayrı PCR karışımı hazırlandı.

Proteinaz K hazırlanışı: 0.05 M Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ seyreltme tamponu pH=8 olacak şekilde 100 mL deiyonize su ile hazırlandı. 121 °C’de 1 atm basınçta 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Bu hazırlanan tampon ile liyofilize haldeki proteinaz K’dan 20 mg/mL hazırlandı. Hazırlanan enzim eppendorflara koyulup -20 dondurucuda muhafaza edildi.

Tablo 4. Genotipleme için kullanılan BDNF ve Neomisin primerleri

Primer Adı	Primer Dizisi
BDNF	İleri Primer: 5'-ACCATAAGGACGCGGACTTGTAC-3'
Neomisin	İleri Primer: 5'-GATTCGCAGCGCATCGCCTT-3'
BDNF/Neomisin	Geri Primer: 5'-GAAGTGTCTATCCTTATGAATCGC-3'

Tablo 5. Genotipleme için hazırlanan PCR karışımı

Malzemeler	μL
Buffer (10x)	2
MgCl ₂ (25 mM)	1.2
dNTP (10 mM)	0.5
Primer F	0.5
Primer R	0.5
Taq DNA Polimeraz (5u/ μL)	0.25
DNA	1
dH ₂ O	14.05
Toplam hacim	20

Tablo 5’de verildiği gibi her bir örnek için hazırlanan karışımlar PCR tüplerine pipetlenerek (1 örnekten hem BDNF hem neomisin primeri için hazırlandı) kısa süreli santrifüj edildi ve 94 °C-5', (94 °C-30 ", 52 °C-45", 72 °C-1') x 40, 72 °C-7', 10 °C protokolüne göre PCR uygulandı.

PCR sonrası elektroforezde yürütülen örneklerde çıkan sonuçlara göre sadece BDNF genine sahip fareler wild tip, neomisin genine sahip fareler ise BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) olarak belirlenip gruplar oluşturuldu.

5.2.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi

1) 50x Tris-asetik asit-EDTA (TAE) tamponu hazırlanması: 242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O 700 mL saf suda çözüldü, üzerine 57.1 mL asetik asit ilave edildi ve hacim saf suyla 1 litreye tamamlandı. Bu tamponun pH’sı yaklaşık 8.5’dir. Hazırladığımız 50x TAE tamponu 1x olacak şekilde seyreltilerek sonra hem elektroforez tamponu olarak hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

2) Etidyum Bromür Çözeltisi: 100 mg etidyum bromür 10 mL deiyonize suda çözüldü (10 mg/mL). Buzdolabında (4 °C’de) saklandı. (Etidyum bromür karsinojen, mutojen olduğu için kullanılırken çift kat eldivenle çalışıldı ve solumamaya dikkat edildi).

3) % 2’lik agaroz jel hazırlanması: Erlen içerisine 2 g agaroz tartılarak 100 mL 1x TAE tamponuna ilave edildi. Karışım mikrodalga fırında 2 dk bekletilerek agarozun çözünmesi sağlandı. Elde edilen jel biraz soğutulduktan sonra 4 μL etidyum bromür

eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan agaroz, TAE ve etidyum bromür karışımı, jel taraklarını eritmeyecek ısıya düşmesini sağlamak için jelin biraz soğuması beklendi. Jel taraklarının yerleştirildiği jel kalıbına yavaşça döküldü. Dökme işlemi sırasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 1 saat kadar oda ısısında soğumaya bırakıldı. Jel tamamen katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı içerisine yerleştirilen jelin üst kısmını tamamen örtecek şekilde yürütme tamponu ile dolduruldu.

Ürünlerin Jele Yüklenmesi: PCR sonrası oluşan ürünler üzerine 4 µL yükleme boyası (loading dye, Orange G) koyularak karıştırıldı ve 15 µL alınarak jel kuyucuklarına yüklendikten sonra 100 volt, 300 mA'de 30 dk ürünlerin göçü sağlandı. Jel sonucuna göre neomisin bandı çıkanlar BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) sadece BDNF bandı çıkanlar wild tip olarak tanımlanmıştır (Resim 3).

5.2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Temin edilen erkek C57BL/6J ırkı fareler genotiplenmesi (BDNF(+/-) ve BDNF (+/+) ayrımı) yapıldıktan sonra aşağıda verildiği gibi gruplandırıldı ve özel havalandırılan kafes sistemine (RAIR IsoSystem, Delawera, USA) tek tek yerleştirildi. Fareler Research Diyet'ten (Research Diets Inc, New Brunswick, ABD) satın alınan toplam kalorisinin % 60'ının yağlardan sağlandığı yüksek yağ içerikli diyetle (D12492 kodlu) ve kontrol grupları standart diyetle (D12550J kodlu, toplam kalorisinin %10'unun yağlardan sağlandığı) beslendi. Farelere yemler ve su *ad libitum* olarak verildi.

- 1. Grup:** Standart fare diyeti ile beslenen grup, n=8, Wild Tip (kontrol grubu)
- 2. Grup:** Standart fare diyeti ile beslenen grup, n=8, BDNF (+/-)
- 3. Grup:** Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen grup, n=8, Wild Tip
- 4. Grup:** Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen grup n=8, BDNF (+/-)

Deneye alınan tüm fareler standardizasyon için 15 gün süre ile standart fare diyeti ile beslenmiştir. Deneye başlangıçta tartıldıktan sonra her grup ilgili yemlerle dört ay boyunca beslendi ve her 15 günde bir ağırlıkları kaydedildi. Çalışmamızda kullandığımız standart ve yüksek yağlı diyetlerin içerikleri Ek1 ve Ek2'de verilmiştir. Dört aylık beslenme periyodunun ardından 1 gün önce aç bırakılan fareler mRNA ekspresyonlarındaki sirkadiyen değişimi en aza indirmek için 09:00-10:00 saatleri

arasında dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Kanların santrifüjlenmesiyle elde edilen serumlar ependorflara alınarak analiz sürelerine kadar -80 °C dondurucuda saklandı. Farelerin subkutan ve epididimal yağ dokuları alınıp hemen ependorflara koyularak sıvı azotta donduruldu. Ekspresyon çalışmaları için alınan subkutan ve epididimal yağ dokularında aynı gün RNA izolasyonu yapıp, cDNA dönüşümü gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar gen ekspresyonu analizlerinin yapılacağı zamana kadar -80°C dondurucuda saklandı.

5.2.3. Serumda Yapılan Ölçümler

5.2.3.1. Glukoz ve Triglicerit Ölçümü

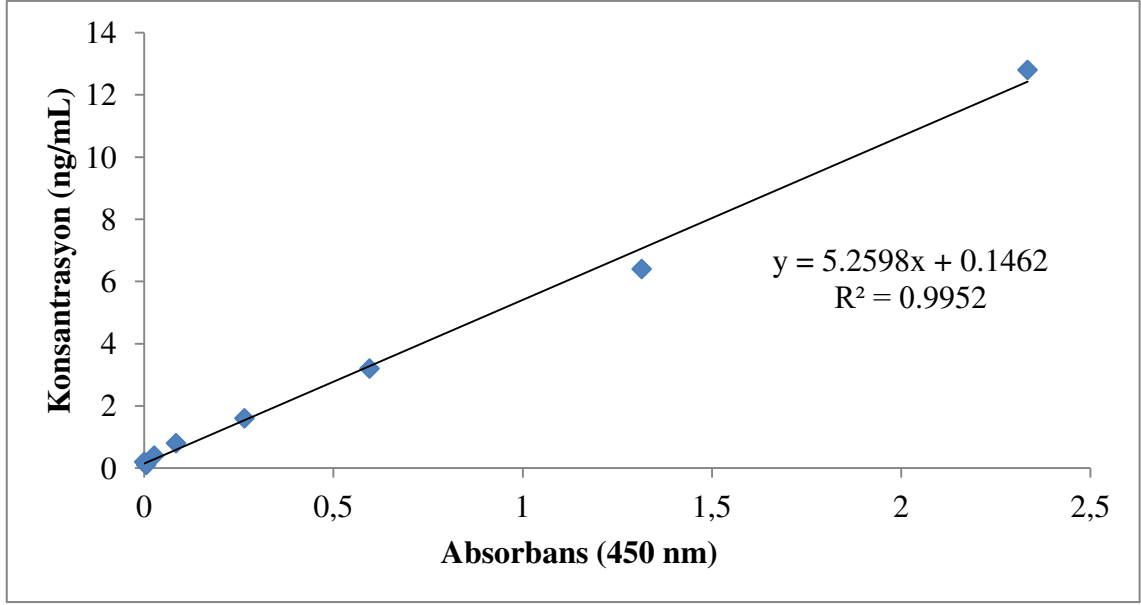
Serumda açlık glukoz ve trigliserit (TG) parametleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarında bulunan AU 5800 Beckman Coulter otoanalizöründe orjinal kitler kullanılarak ölçüldü. Trigliserit ölçümü enzimatik kolorimetrik, glukoz ölçümü enzimatik UV testi (heksokinaz yöntemi) ile yapıldı. Serum glukoz ve TG miktarları oto analizör tarafından mg/dL olarak verildi.

5.2.3.2. İnsülin Ölçümü

Serumda insülin ölçümünde Crystal Chem firmasının 16MAUM1388 Lot numaralı Ultra Sensitive Mouse Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kiti kullanılmıştır. Seyreltmeler yapıldıktan sonra serumlar pleyte ikili yüklenmiştir ve ölçümler kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

İnsülin Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 25.6 ng/mL olan insülin stok standart çözeltisi kullanılarak konsantrasyonları 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0 ng/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan insülin standart grafiği şekil 7'de gösterildiği gibidir. Verilen standart grafiğine göre serum numunelerinin insülin konsantrasyonları ng/mL cinsinden hesaplanmıştır.



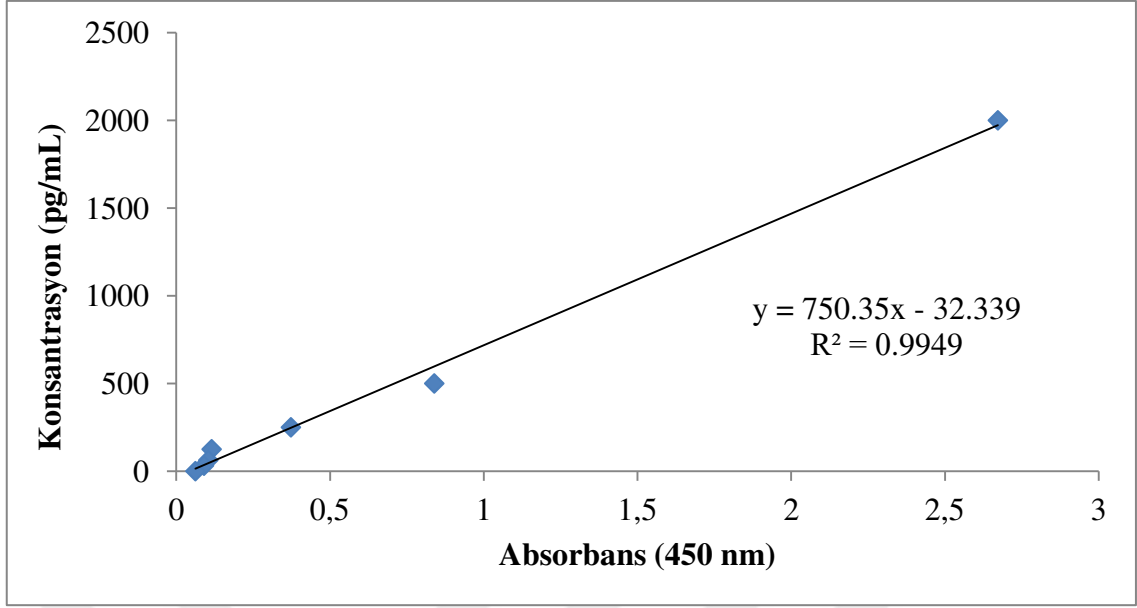
Şekil 7. İnsülin standart grafiği

5.2.3.3. BDNF ölçümü

Serum BDNF ölçümünde Abnova firmasının ürettiği KA0331 katalog numaralı ve 381238504 ürün kodlu fare BDNF ELISA kiti kullanıldı. Seyreltmeler yapıldıktan sonra serumlar pleyte ikili yüklenmiştir ve ölçümler kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

BDNF Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 10 ng/mL olan BDNF stok standart çözeltisi kullanılarak konsantrasyonları 2 000, 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 0 pg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan BDNF standart grafiği Şekil 8'de gösterildi. Verilen standart grafiğine göre serum numunelerinin BDNF konsantrasyonları pg/mL cinsinden hesaplanmıştır.



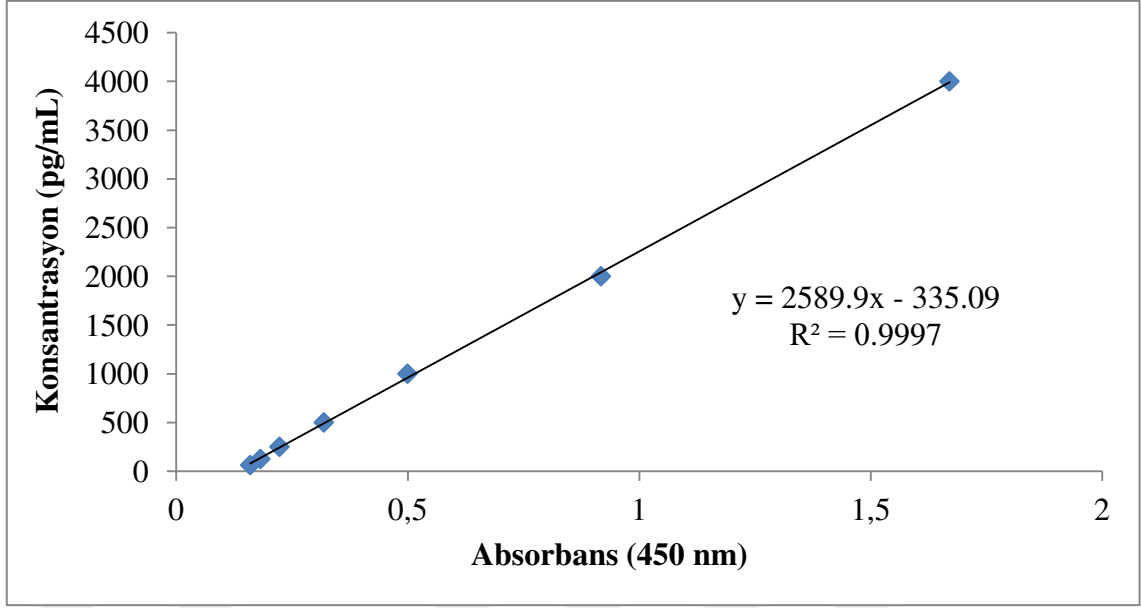
Şekil 8. BDNF standart grafiği

5.2.3.4. Leptin Ölçümü

Serumda leptin ölçümünde R&D Systems firmasının MOB00 katalog ve 338346 Lot numaralı fare/sıçan ELISA kiti kullanılmıştır. Seyreltmeler yapıldıktan sonra serumlar pleyte ikili yüklenmiştir ve ölçümler kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

Leptin Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 8 ng/mL olan leptin stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 4 000, 2 000, 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 0 pg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan leptin standart grafiği Şekil 9'da gösterildi. Verilen standart grafiğine göre serum numunelerinin leptin konsantrasyonları ng/mL cinsinden hesaplanmıştır.



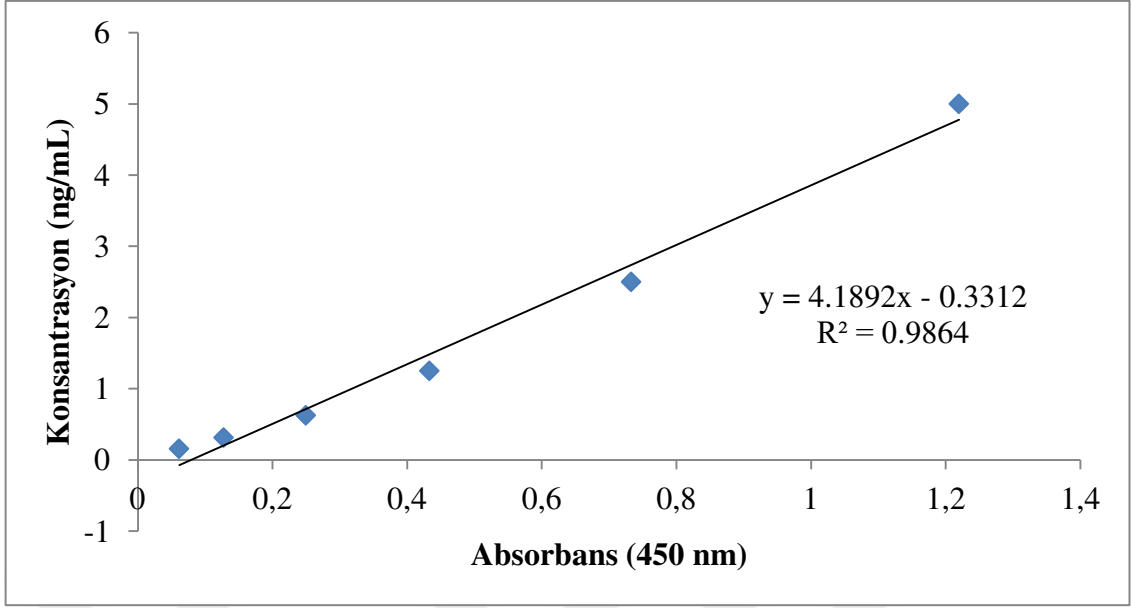
Şekil 9. Leptin standart grafiği

5.2.3.4. Adiponektin Ölçümü

Serumda adiponektin ölçümünde R&D firmasının MRP300 katalog ve 340850 Lot numaralı fare ELISA kiti kullanılmıştır. Seyreltmeler yapıldıktan sonra serumlar pleyte ikili yüklenmiştir ve ölçümler kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

Adiponektin Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 10 ng/mL olan adiponektin stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0 ng/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan adiponektin standart grafiği Şekil 10'da gösterildi. Verilen standart grafiğine göre serum numunelerinin adiponektin konsantrasyonları $\mu\text{g/mL}$ cinsinden hesaplanmıştır.



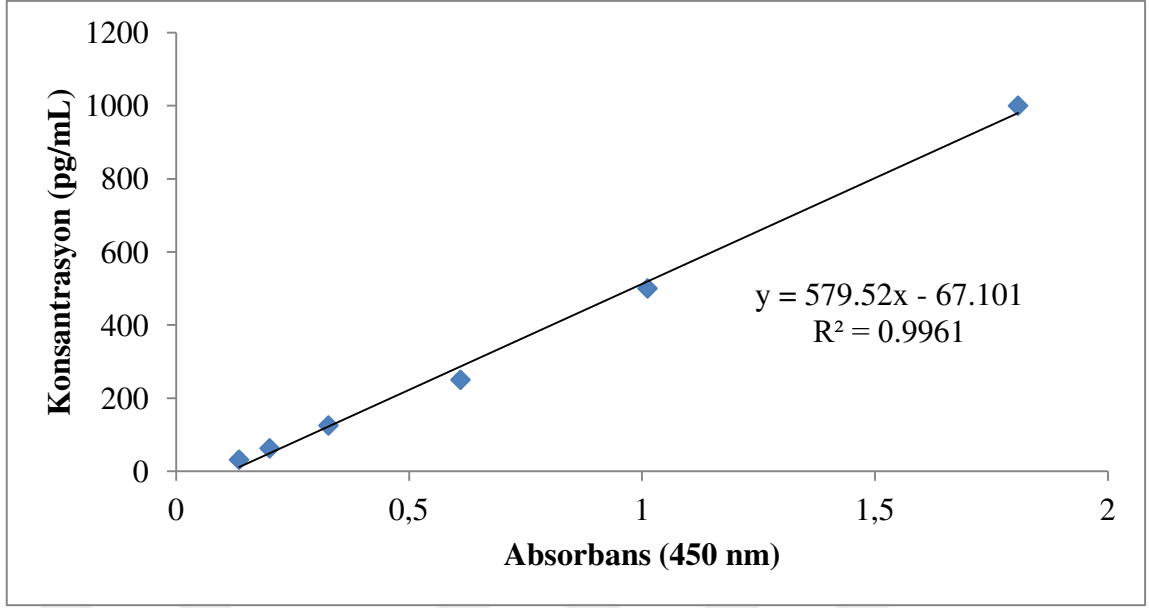
Şekil 10. Adiponektin standart grafiği

5.2.3.5. Rezistin Ölçümü

Serumda rezistin ölçümünde R&D firmasının MRSN00 katalog ve 336359 Lot numaralı fare ELISA kiti kullanılmıştır. Serumlar pleyte ikili yüklenmiştir ve ölçümler kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Bu assay kantitatif sandwich enzim immunoassay tekniğine göre geliştirilmiştir.

Rezistin Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 10 ng/mL olan rezistin stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 0 pg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan rezistin standart grafiği Şekil 11’de gösterildi. Verilen standart grafiğine göre serum numunelerinin rezistin konsantrasyonları ng/mL cinsinden hesaplanmıştır.



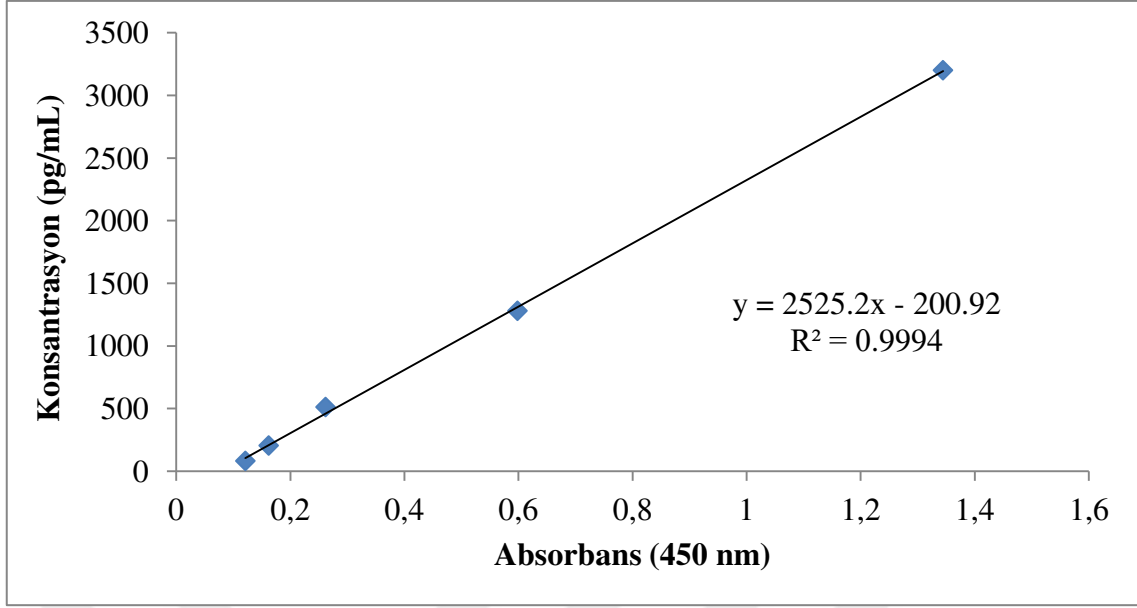
Şekil 11. Rezistin standart grafiği

5.2.3.5. PAI-1 Ölçümü

Serumda PAI-1 ölçümünde Thermo Fisher Scientific firmasının 0553050916 Lot numaralı fare ELISA kiti kullanılmıştır. Seyreltmeler yapıldıktan sonra serumlar pleyte ikili yüklenmiştir ve ölçümler kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

PAI-1 Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 100 ng/mL olan PAI-1 stok standart çözeltisi kullanılarak konsantrasyonları 3 200, 1 280, 512, 204.8, 81.92, 0 pg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan PAI-1 standart grafiği Şekil 12'de gösterildi. Verilen standart grafiğine göre serum numunelerinin PAI-1 konsantrasyonları ng/mL cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 12. PAI-1 standart grafiği

5.2.4. Yağ Dokularında Gen Ekspresyonu Analizi

Subkutan ve epididmal yağ dokularında RAN izolasyonu ve cDNA analizleri fareler sakrifiye edildikten sonra aynı gün içerisinde yapılmıştır.

5.2.4.1. Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu

Subkutan ve epididmal yağ dokularında RNA izolasyonu SIGMA Mammalian Total RNA Miniprep Kit (lot:SLBM3520V) ve Roche Tripure Isolation Reagent (Cat. No.:11 667 165 001) birleştirilerek yapıldı (132). Bu yeni oluşturulan protokol aşağıda verildiği şekliyle uygulanmıştır.

- Yaklaşık 300 mg olacak şekilde epididmal ve subkutan yağ dokuları tartılarak dibi yuvarlak eppendorfa koyuldu ve üzerine 1 mL Tripure reagent eklendi. 30 sn boyunca el homojenizatörüyle homojenize edildi. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12 000 g 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi.
- Üstteki yağ tabakası atıldıktan sonra hafif pembe renkli ortadaki tabakadan alınabildiği kadar yeni eppendorfa alındı. 200 µl kloroform ekledikten sonra 15sn kadar çalkalandı, oda sıcaklığında 2-15 dk bekletildi. Bekletildikten sonra 12 000 g 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üstteki renksiz su fazı alındı. Hacmi kadar %70'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Bu karışımdan 700 µl alınarak izolasyon kitindeki spin

kolona aktarıldı. 12 000 g'de 18 sn santrifüj edildi. Geri kalan karışımda eklenerek tekrar 12 000 g'de 18 sn santrifüj edildi.

- Mammalian Total RNA miniprep kitte bulunan wash I solüsyonundan 250 µl eklenip 12 000 g'de 18 sn santrifüj edildi. 80 µl DNase I working solition kolona eklendi ve 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kolona 250 µl wash solition I eklenip 12 000 g'de 18sn santrifüj edildi.
- Kolon yeni toplama tüpüne alındı ve 500 µl wash solution II ile 2 kez yıkandı. Aralarda 12 000 g'de 18 sn santrifüj edildi. Boş kolon etanolün kuruması için 12 000 g'de 2 dk santrifüj edildi. 60 °C'de etüvde ısıtılmış 80-100 µl elüsyon solüsyonundan kolonun merkezine ilave edilip vorteksledikten sonra eppendorflar 60 °C'de 3 dk bekletildi ve kolon 12 000 g'de 2 dk santrifüj edildi.

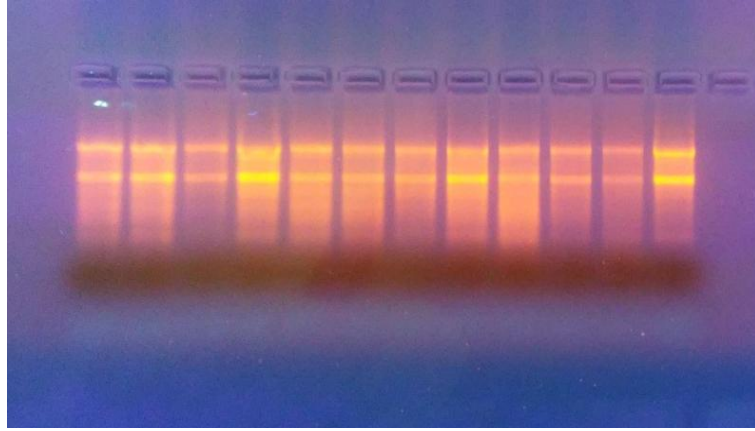
Kullanılan Dietilpirokarbonat (DEPC)'li Suyun Hazırlanışı: 100 mL'lik dietilpirokarbonattan % 0.1 (v/v)'lik olacak şekilde 500 mL su ile hazırlandı ve 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 20 dk boyunca otoklavlandı. Işıktan etkilenmesini önlemek için koyu renkli şişelere koyularak ve kontaminasyon olmaması için kapağı sarılarak muhafaza edildi. Çalışmada kullanılan DEPC'li su ortamda bulunan ve ürün kaybına yol açacak DNAaz ve RNAaz enzimlerinin disülfid bağlarını kopararak bu enzimleri inaktive etmektedir. Çalışmada kullanılan tüm malzemeler (örn. tartı, makas, bistüri, homojenizatör) izolasyona başlamadan önce hazırlanan DEPC'li su ile temizlendi.

DNase I working solition hazırlanışı: DNase I 550 µL RNaz içermeyen su ile çözüldü. DNaz stok çözelti ile kit içerisinde bulunan RDD tamponu 1:7 oranında karıştırılarak DNase I working solution elde edildi. DNase I, fiziksel denatürasyona duyarlı olduğu için vortekslenmez, tüp hafifçe ters çevirerek karıştırılır.

5.2.4.1.1. Elde edilen RNA'ların Kalite Kontrolü ve Miktarının Belirlenmesi

Yukarıda verilen protokolü kullanarak izole edilen RNA'ların kalite kontrolü ve kantitasyonu açısından değerlendirilmek üzere konsantrasyonları ve saflıkları Nanodrop ND-2000 cihazı kullanılarak ölçüldü. RNA konsantrasyonları 100-300 ng/µL arasında bulunurken örneklerin kalitesi ile ilgili tahmini bir karşılaştırma olanağı sunan 260/280 oranları ise ~2 civarında bulundu. Daha sonra % 0.8'lik agaroz hazırlayarak oluşan

ürünler jel elektroforezinde yürütölüp elde ettiğimiz RNA'ların görüntülerine bakıldı. Elektroforez sonucunda bazı RNA ürünlerinin jel görüntüsü Resim 1'de verilmiştir.



Resim 1. RNA izolasyonu sonrası bazı örneklerin jel görüntüsü

5.2.4.2. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Elde Edilmesi

Epididimal ve subkutan yağ dokularından izole edilen total RNA'lar aynı gün komplementer DNA (cDNA) sentezi için kullanıldı. Bu amaçla Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (Cat No: 04 896 866 001, lot: 10842322) kullanıldı. Deney kit prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Kit protokolü uygulanmadan önce total RNA'ların konsantrasyonları kit içerisindeki nükleaz free su ile 100 ng/μL'ye eşitlendi. Kite belirtilen şekilde 1.5 mL hacimli steril tüp içerisinde reaksiyon ortamı Tablo 6'da verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 6. Total RNA'lardan cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	μL
Random hexamer primer	2
Reverse Transkriptaz Reaksiyon Tamponu	4
RNaz İnhibitörü	0.5
dNTP Karışımı	2
Reverse Transkriptaz (20U/μL)	0.5
Su	1

Her bir örnek için yukarıda verilen şekilde hazırlanan karışımdan PCR tüplerine 10'ar µL koyuldu. Bu tüplerin üzerine konsantrasyonu eşitlenen RNA örneklerinden 10'ar µL ilave edildikten sonra PCR cihazında 25 °C'de 10 dk, 50 °C'de 60 dk, 85 °C'de 5 dakika olacak şekilde prosedür uygulanarak cDNA sentez işlemi başlatıldı. PCR işlemi bittikten sonra cDNA konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik olarak nanodrop cihazı ile ölçüldü. Nanodrop ile ölçüm sonucu konsantrasyonlar 1 500-1 600 ng/µL arasında 260/280 oranını ise 1.8 civarında bulundu. Elde edilen cDNA örnekleri RT-PCR ölçümleri yapılabilecek kadar -80 dondurucuda saklandı.

5.2.4.3. Real Time PCR Aşaması

qRT-PCR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde sıklıkla kullanılan bir metottur. Gen ekspresyonunda daha hassas, verimli ve daha hızlı olması tercih edilmesinin sebebidir. Real-time PCR'da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probın verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır. Çalışmamızdaki gen ekspresyon analizleri Roche tarafından "LightCycler" PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilen her bir assay, gen spesifik primer ve kilitli nükleik asit (LNA) içeren LAM-işaretli hidroliz probu olan Universal Probelibrary (ULP) probu kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda Roche Light Cycler 480 II marka cihazı ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullandığımız primerler ve dizilişleri aşağıdaki tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. RT-PCR'da kullanılan primer dizileri. (Actb: Beta Aktin, Retn: Rezistin, Adipoq: Adiponektin, Serpine1: PAI-1, Lep: Leptin)

Primer Adı	Primer Dizisi
Roche Real Time Ready Actb Assay ID: 307903	İleri Primer Dizisi: 5'- CCAACCGTGAAAAGATGACC-3' Geri Primer Dizisi: 5'- ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
Roche Real Time Ready Retn Assay ID: 317906	İleri Primer Dizisi: 5'- TGCCAGTGTGCAAGGATAGA-3' Geri Primer Dizisi: 5'- TGGAAACCACGCTCACTTC-3'
Roche Real Time Ready Adipoq Assay ID: 310252	İleri Primer Dizisi: 5'- GGAGAGAAAGGAGATGCAGGT-3' Geri Primer Dizisi: 5'- CTTTCCTGCCAGGGGTTC-3'
Roche Real Time Ready Serpine1 Assay ID: 310686	İleri Primer Dizisi: 5'- CAAAAGGTCAGGATCGAGGT-3' Geri Primer Dizisi: 5'- GCGGGCTGAGATGACAAA-3'
Roche Real Time Ready Lep Assay ID: 310262	İleri Primer Dizisi: 5'- GTGGTGGCTGGTGTGAT-3' Geri Primer Dizisi: 5'- TTGATGAGGTGACCAAGGTG-3'

- RT-PCR analizi için nükleaz free 1.5 mL hacimli tüpler içerisinde hedef genler (Retn, Lep, Serpine1, Adipoq) ve referans gen (Actb) için ayrı ayrı olmak üzere gerekli reaksiyon ortamı Tablo 8’da verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 8. Real Time PCR analizi için kullanılan reaksiyon bileşenleri

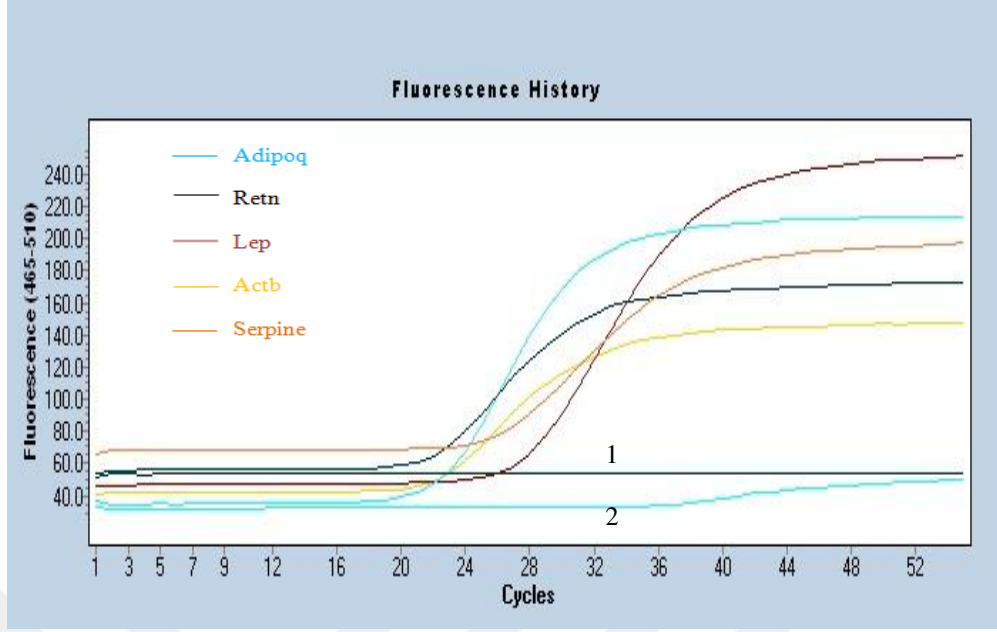
Reaktifler	µL
LightCycler 480 Probes master	10
Real Time Ready Assay (Actb, Lep, Adipoq, Retn, Serpine1)	1
PCR saflığında su	4
Toplam Hacim	15

- Hazırlanan karışım her bir örnek için üç kuyucuk olacak şekilde RT-PCR için dizayn edilmiş 96 kuyucuklu pleyte her bir kuyucukta 15’er µL olacak şekilde yüklendi. Karışımların üzerine her bir deney grubu için 5’er µL seyreltilmiş cDNA örneklerinden ilave edildi. Bu işlemlerin hepsi buz üzerinde yapıldı.
- Pleytin üzeri sealing film ile hava almayacak şekilde iyice kapatıldı. Hazırlanan pleyt 1 500 g’de 2 dakika santrifüj edilip cihaza verildi. Cihaz Tablo 9’da verilen protokole göre düzenlendikten sonra RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 9. RT-PCR Protokolü

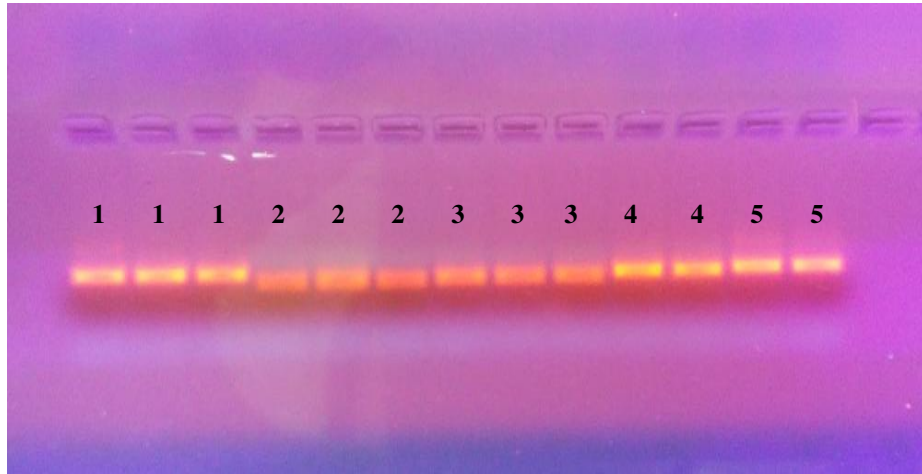
Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön inkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	45	Kantitasyon	
Soğutma	1	-	
Hedef Sıcaklık °C	Elde etme Modu	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	10 dakika	4.4
Amplifikasyon			
95	-	10 saniye	4.4
60	-	30 saniye	2.2
72	Tek	1 saniye	4.4
Soğutma			
40	-	30 saniye	2.2

Verilen protokole uygun yapılan RT-PCR sonucunda Actb, Retn, Lep, Serpine1, Adipoq genlerine ait elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 13’de verilmiştir. RT-PCR kısmında kalite kontrol amacıyla 2 tane negatif kontrol çalışılmıştır. 1 numaralı gösterilen RT-PCR aşamasında cDNA koyulmayan kontroldür ve bu kuyularda sinyal amplifikasyonu gözlenmemelidir, gözlemlendiğinde ise Cp değerleri, örneklerinkinden en az beş ve tercihen ondan fazla döngü olmalıdır. 2 numaralı gösterilen, cDNA sentezi aşamasında reverse transkriptaz koyulmayan kontrolün pikidir ve genomik DNA kontaminasyonunun bir göstergesi olarak kullanılır, Cp değeri örneklerinkinden en az beş döngü fazla olmalıdır.



Şekil 13. Actb, Retn, Lep, Serpine1, Adipoq genlerine ait elde edilen amplifikasyon eğrileri

RT-PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforezinde Yürütülmesi: RT-PCR sonrası saflıklarını kontrol etmek amacıyla RT-PCR ürünleri %1.5'lik agaroZ jel hazırlanarak yürütülmüştür. Ürünlerin jel görüntüsü Resim 2'de gösterilmiştir.



Resim 2. RT-PCR'dan sonra bazı ürünlerin agaroZ jel görüntüsü. Jele yüklenen ürünler sırasıyla 1: beta aktin, 2: leptin, 3: adiponektin, 4: rezistin, 5: PAI-1'dir.

RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: mRNA ekspresyon çalışmalarında RT-PCR ile verilerin değerlendirilmesine yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan sıklıkla kullanılanı göreceli (rölatif, karşılaştırmalı) kantitasyon yöntemidir. Gen ekspresyonu analizlerinde göreceli kantitasyon birçok numunedeki genin veya genlerin

mRNA ekspresyonlarındaki değişimini nicelleştirir. RT-PCR ile elde edilen sonuçların kantite edilmesinde karşılaştırmalı Cp metodu ($2^{-\Delta\Delta C_p}$ metodu) rölatif kantitasyonu analiz etmede kullanılan normalize edilmiş gen ekspresyonunun matematiksel modelidir (133). Her bir örneğin PCR amplifikasyonu sırasında eksponensiyal faza geçtiği devir (C_p , crossing point) tespit edilerek $2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülde yerine koyuldu. Her örnekten üçlü çalışıldığı için C_p değeri olarak bu değerlerin ortalamaları alındı. Kontrol olarak aldığımız gruba (standart diyetle beslenen wild tip) göre diğer grupların nasıl değişim gösterdiği Kat değişimi $= 2^{-\Delta\Delta C_p} = 2^{-(\Delta C_p \text{ hedef} - \Delta C_p \text{ kontrol})}$ eşitliği kullanılarak hesaplandı. Bu eşitliğe göre ΔC_p hedef: C_p hedef gen- C_p referans gen (housekeeping gen), ΔC_p kontrol: C_p Hedef gen- C_p Referans gen.

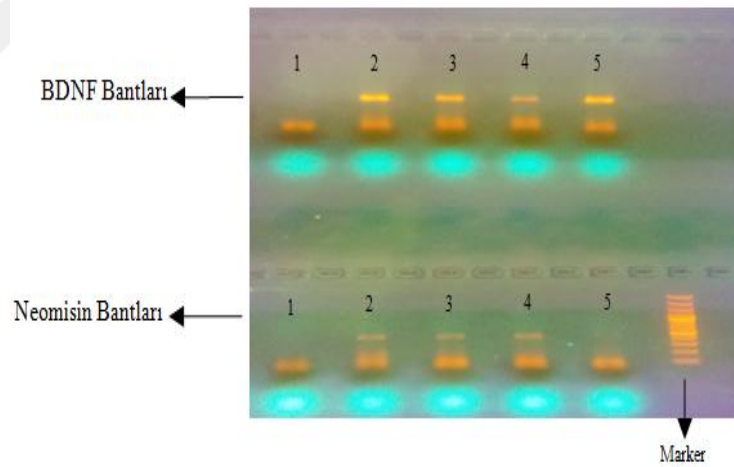
5.3. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonrasında serum örneklerinin çalışılması sonucu elde edilen veriler istatistik programına girilerek normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov Testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan; bağımsız parametrelerin ikili karşılaştırmaları için Mann Whitney-U testi kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Subkutan ve epididimal yağ dokularında gen ekspresyonu analiz sonuçları üçten fazla bağımsız gruplar tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler için Tukey ve Tamhane T2 testleri kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda, ikişerli post-hoc karşılaştırmalar Tukey testi kullanılarak yapıldı. Varyanslar homojen değilse Tamhane T2 testi kullanıldı. Analiz sonuçları aritmetik ortalama ve standart hata ($X \pm SE$) olarak ifade edildi. İstatistiksel testlerdeki sonuçların $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Genotipleme ile İlgili Bulgular

Tez çalışmasında kullandığımız fareleri gruplandırabilmek için kuyruklardan alınan örneklerden DNA izolasyonu yaptıktan sonra BDNF ve Neomisin primerleri kullanılarak PCR yapıldı. PCR sonrası ürünler %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Yürütme işlemi sonunda elde edilen jel görüntüsü Resim 3'de gösterilmiştir. PCR işlemi yaparken her zaman pozitif kontrol olarak genotipi bilinen bir numune (2 numaralı bantlar), negatif kontrol olarak ise DNA yerine su koyularak (1 numaralı bantlar) çalışılmıştır. Aşağıda verilen jelin üst sırasına BDNF primeri ile hazırlanan karışımdan, alt sırasına ise neomisin primeri ile hazırlanan karışımdan oluşan PCR ürünleri yüklenmiştir. Tüm örneklerde (negatif kontrol hariç) BDNF bantları çıkması beklenirken, neomisin bandı çıkanlar heterozigot (+/-) olarak sınıflandırılmaktadır. Çalıştığımız ve genotipini bilmediğimiz 3 fare (3, 4, 5 numaralı) jel görüntüsündeki sonuçlara göre 3. ve 4. BDNF (+/-), 5. BDNF (+/+) olarak sınıflandırılmıştır.

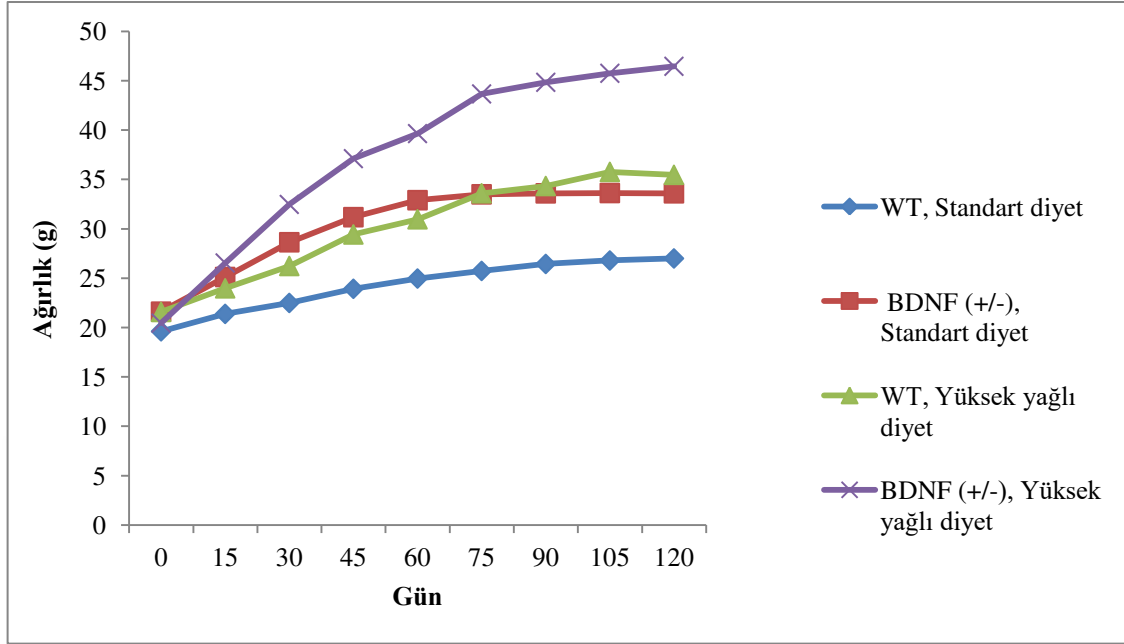


Resim 3. BDNF ve neomisin bantlarının gösterildiği örnek bir agaroz jel görüntüsü
1: negatif kontrol, 2: pozitif kontrolü; 3, 4, 5: çalıştığımız örnekler

6.2. Morfolojik Bulgular

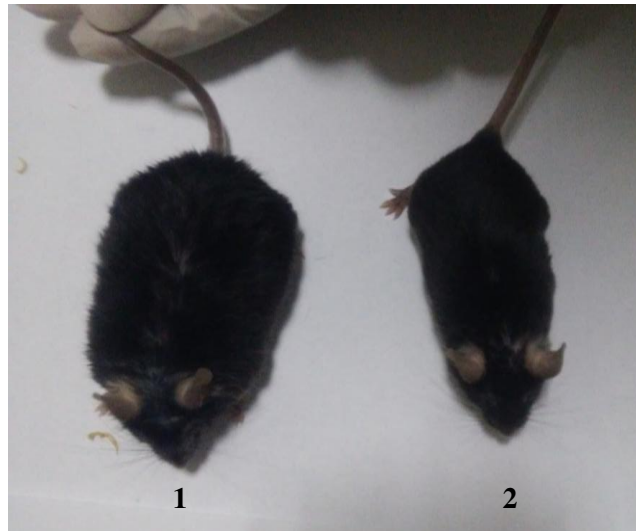
Fareler deney için alındıktan sonra adaptasyon için 15 gün boyunca standart fare diyet ile beslendi. 15 gün sonunda fareler gruplarına göre standart ve yüksek yağ içerikli diyetlerle 4 ay süresince beslendi. Bu sürede 15 gün aralıklarla ağırlıklarındaki

değişimler kaydedildi. 4 aylık beslenme periyodu boyunca grupların ağırlıklarının ortalamalarındaki değişim Şekil 14’de gösterilmiştir.



Şekil 14. Standart ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen wild tip, BDNF (+/-) gruplardaki farelerin 4 ay boyunca ortalama ağırlık artışı

4 aylık beslenme süresi sonunda yüksek yağ içerikli ve standart diyetle beslenen farelerin görüntüleri arasındaki fark Resim 4’de gösterilmektedir.

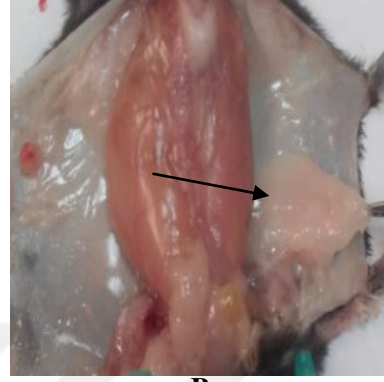


Resim 4. Beslenme periyodu sonunda yüksek yağ içerikli ve standart diyet ile beslenen farelerin görüntüleri. **1:** Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen fare. **2:** Standart diyetle beslenen fare

Dört ay sonrasında 1 gün aç bırakılan fareler dekapitasyon ile sakrifiye edildikten sonra aşağıdaki resimlerde gösterilen kısımlardan subkutan ve epididimal beyaz yağ dokuları alındı. Resim 5 ve Resim 6’da yüksek yağlı ve standart diyet ile beslenen farelerin yağ dokuları arasındaki farkı gösteren görüntüler verilmiştir.

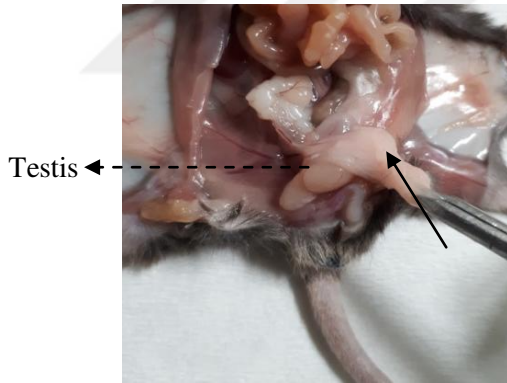


A

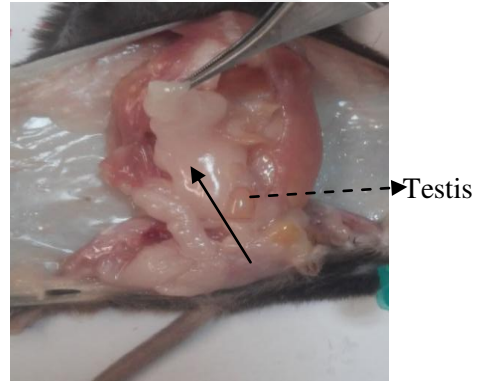


B

Resim 5. Deney sonunda standart ve yüksek yağlı diyetle beslenen farelerden alınan subkutan yağ dokuları. **A:** Standart diyetle beslenen bir farenin subkutan yağ dokusu. **B:** Yüksek yağlı diyetle beslenen bir farenin subkutan yağ dokusu



A



B

Resim 6. Deney sonunda standart ve yüksek yağlı diyetle beslenen farelerden alınan epididimal yağ dokuları. **A:** Standart diyetle beslenen farenin epididimal yağ dokusu. **B:** Yüksek yağlı diyetle beslenen farenin epididimal yağ dokusu

Çalışmamızda uyguladığımız beslenme periyodu öncesi ve sonrası grupların ağırlıklarıyla serumlarda ölçtüğümüz açlık glukoz, trigliserit, insülin değerleri ve hesaplanan HOMA-IR sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Grupların başlangıç ve deney sonu ağırlıkları ile serum glukoz, trigliserit, insülin değerleri ve HOMA-IR skorları

Diyet Türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Başlangıç Ağırlığı (g)	16.2±1.7	16.7±1.9	17.3±1.1	16±1.3
Deney Sonu Ağırlık (g)	26.3±1.1	33.6±5.5 ^a	35.4±6.4 ^{a,b}	47.2±5.6 ^a
Ağırlık Değişimi (%)	62.3	101.2	104.6	195
Açlık Glukoz (mg/dL)	134.6±41.5	186±26.7 ^a	164.2±27.4 ^b	220.8±47.3 ^a
Trigliserit (mg/dL)	86.2±17.1	101.8±21.8	108.3±15.8 ^a	113.8±24.6 ^a
İnsülin (ng/mL)	4.1±1.9	8.6±3.1 ^{a,b}	9.4±6 ^{a,b}	34.5±14.1 ^a
HOMA-IR	49.9±21.3	96.8±47.5 ^a	192.0±92.4 ^a	309.2±207.5 ^a

* HOMA-IR = [insülin (μU/mL) X açlık glukoz (mmol/L)]/22.5 formülüne göre hesaplandı (134).

a: Standart wild tip (kontrol) grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

b: Yüksek yağlı diyet BDNF(+/-) grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

p değeri 'Mann Whitney U' testine göre belirlendi. Değerler ortalama±standart sapma şeklinde verildi.

Deneye alındıktan sonra 15 gün beslenen fareler gruplara alınmadan önce tartıldı ve grupların deneye başlangıç ortalama ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05). Besleme periyodu sonunda, çalışma gruplarından standart diyetle beslenen BDNF (+/-), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ve BDNF (+/-) gruplarının son ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (p=0.001). Açlık glukoz değerleri kontrol grubuna göre standart diyetle beslenen BDNF (+/-) grubunda (p=0.005) ve yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF (+/-) grubunda (p=0.001) anlamlı yüksek bulundu. Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen BDNF (+/-) farelerin açlık glukoz değerleri de yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin açlık glukoz değerlerine göre anlamlı yüksek bulundu (p=0.002). Kontrol farelerin serum trigliserit değerleriyle yüksek yağ içerikli diyetle beslenen wild tip (p=0.004) ve BDNF (+/-) farelerin (p=0.004) trigliserit değerleri karşılaştırıldığında bu gruplarda anlamlı bir artışın olduğu belirlendi. Kontrol grubuna göre serum insülin düzeyleri karşılaştırıldığında standart diyetle beslenen BDNF (+/-) grubu (p=0.001), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip (p=0.009) ve BDNF (+/-) gruplarının (p=0.001) değerleri daha yüksek bulundu. Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen BDNF (+/-) farelerin insülin düzeyleri yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip farelerin insülin düzeylerine göre daha yüksek bulunmuştur (p=0.001). Kontrol grubuna göre HOMA-IR değerleri karşılaştırıldığında standart diyetle beslenen BDNF (+/-) grubu (p=0.011), yüksek yağlı

diyetle beslenen wild tip ($p=0.001$) ve BDNF(+/-) gruplarının ($p=0.001$) HOMA-IR değeri daha yüksek bulundu.

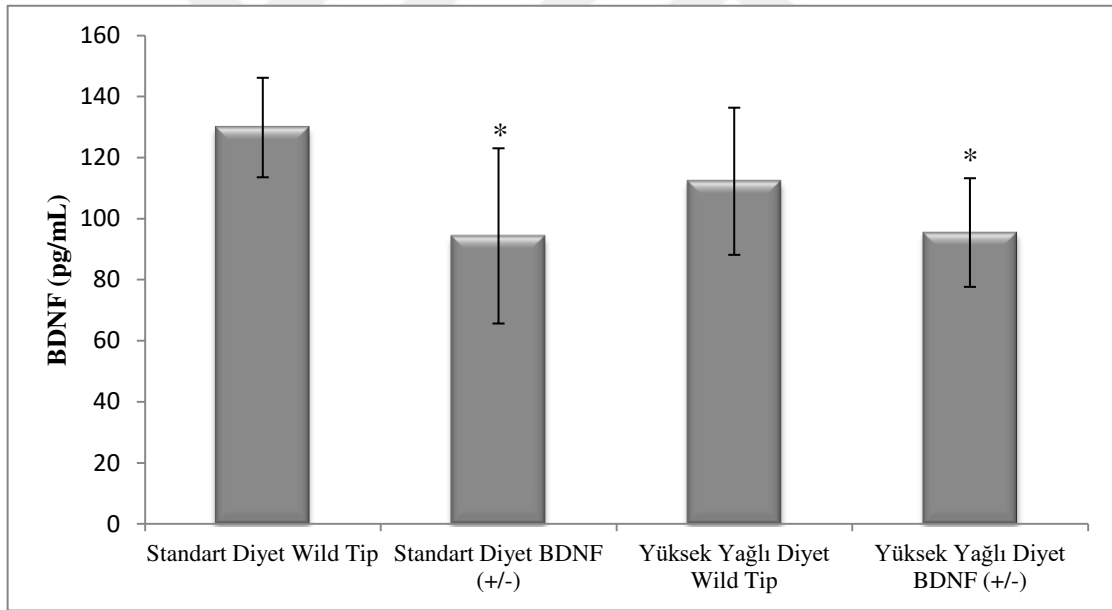
6.3. BDNF Değerleri ile İlgili Bulgular

Serum örneklerinin BDNF düzeyleri ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Çalışma gruplarına ait BDNF konsantrasyonları ve karşılaştırılması Tablo 11 ve Şekil 15’de verildi.

Tablo 11. Grupların serum BDNF konsantrasyonları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
BDNF (pg/mL)	129.8±16.3	93.4±28.7	112.2±24.1	95.4±16.8

Değerler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.



Şekil 15. Grupların serum BDNF konsantrasyonlarının karşılaştırılması. *Kontrol grubunun BDNF değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma vardır ($p<0.05$). p değeri “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

Kontrol grubun BDNF değerleriyle karşılaştırıldığında standart diyetle beslenen BDNF (+/-) grubun ($p=0.002$) ve yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF (+/-) farelerin BDNF değerleri daha düşük ($p=0.001$) bulunmuştur.

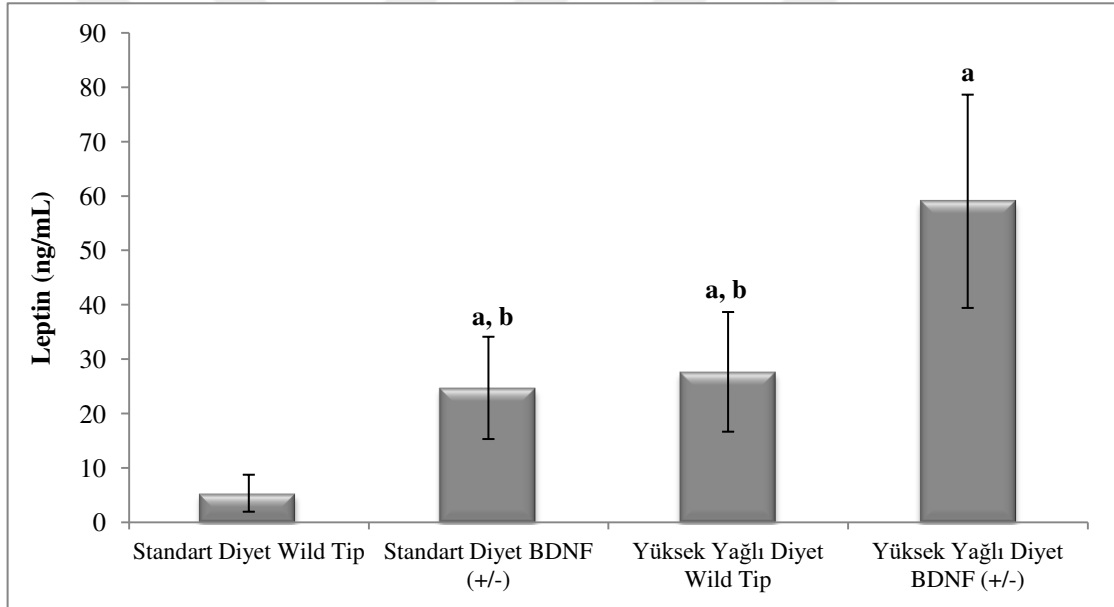
6.4. Leptin Değerleri ile İlgili Bulgular

Serum örneklerinin leptin düzeyleri ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Çalışma gruplarına ait leptin konsantrasyonları ve karşılaştırılması Tablo 12 ve Şekil 16’da verildi.

Tablo 12. Grupların serum leptin konsantrasyonları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Leptin (ng/mL)	5.3±3.4	24.7±9.4	27.7±11	59.1±19

Değerler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.



Şekil 16. Grupların serum leptin konsantrasyonlarının karşılaştırılması. **a:** Standart diyet wild tipe göre serum leptin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$). **b:** Yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF (+/-) farelerin serum leptin değerlerine göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). p değeri ‘Mann Whitney U’ testine göre belirlendi.

Serum leptin düzeyleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında standart diyetle beslenen BDNF (+/-) grupta ($p=0.001$), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip grupta ($p=0.001$) ve yüksek yağlı diyetle beslenen grupta ($p=0.001$) anlamlı yüksek bulunmuştur. Yüksek yağlı diyetle beslenen heterozigot farelerin leptin değerleri

standart diyetle beslenen BDNF (+/-) grubun ($p=0.001$) ve yüksek yağlı diyetle beslenen grubun değerlerine göre ($p=0.001$) anlamlı artış gözlenmiştir.

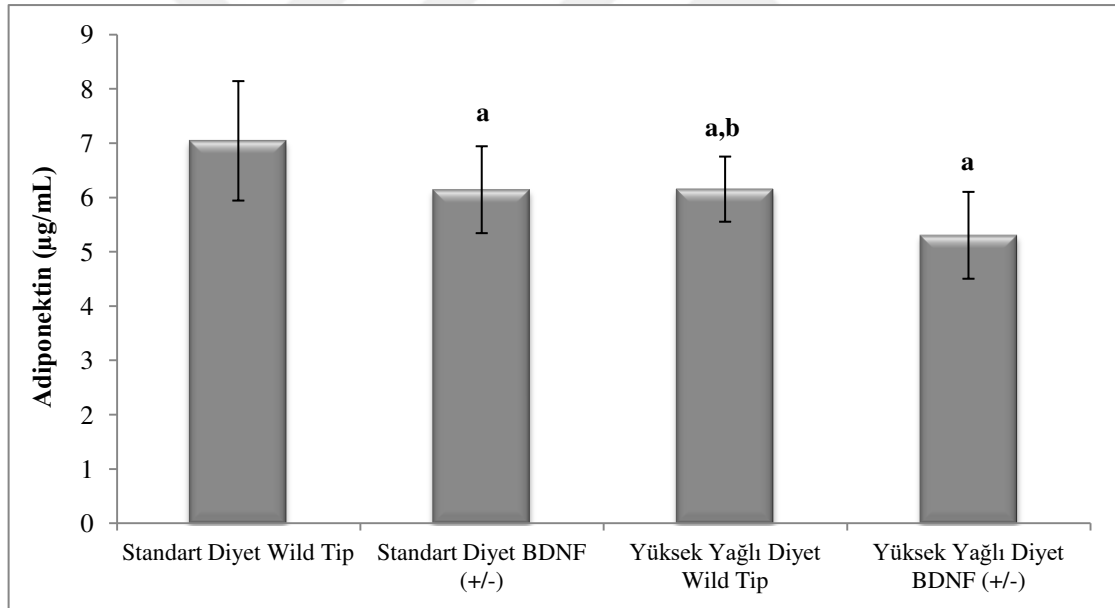
6.5. Adiponektin Değerleri ile İlgili Bulgular

Serum örneklerinin adiponektin düzeyleri ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Çalışma gruplarına ait adiponektin konsantrasyonları ve karşılaştırılması Tablo 13 ve Şekil 17’de verildi.

Tablo 13. Grupların serum adiponektin konsantrasyonları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Adiponektin ($\mu\text{g/mL}$)	7.04 ± 1.1	6.14 ± 0.8	6.15 ± 0.6	5.3 ± 0.9

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.



Şekil 17. Grupların serum adiponektin konsantrasyonlarının karşılaştırılması. **a:** Kontrol grubuna göre serum adiponektin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0.05$). **b:** Yüksek yağlı diyetle beslenen heterozigot farelerle karşılaştırıldığında anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). p değeri “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında standart diyetle beslenen BDNF (+/-) grubunun ($p=0.042$), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip (0.04) ve BDNF (+/-) grubunun ($p=0.001$) serum adiponektin değerleri daha düşük bulunmuştur. Yüksek yağlı

diyetle beslenen wild tip farelerin adiponektin değerleri yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF (+/-) grubun değerlerine göre daha anlamlı yüksektir (p=0.045).

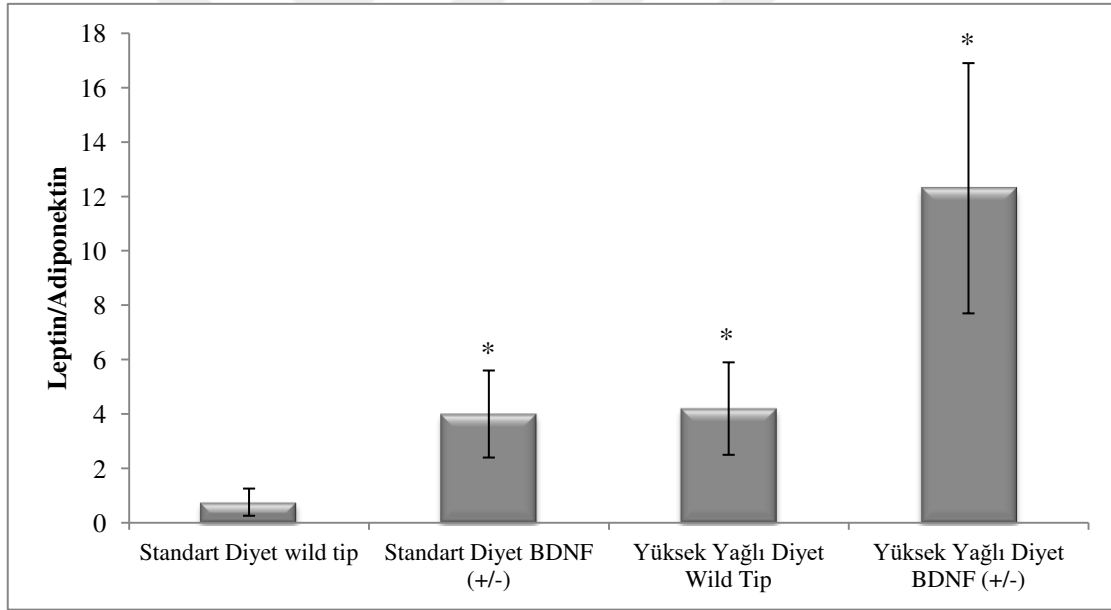
Leptin/Adiponektin Oranı:

Serum örnekleri sonuçlarından leptin/adiponektin oranı hesaplanarak grupların ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 14 ve Şekil 18’de verilmiştir.

Tablo 14. Grupların leptin/adiponektin oranları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Leptin/Adiponektin	0.76±0.5	4.03±1.6	4.2±1.7	12.3±4.6

Değerler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.



Şekil 18. Grupların leptin/adiponektin oranlarının karşılaştırılması. *Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış bulunmuştur (p<0.05). p değeri “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

İstatistiksel analizler sonucuna bakıldığında kontrol grubuna göre diğer grupların leptin/adiponektin oranları p=0.001 derecesinde anlamlı yüksek bulunmuştur.

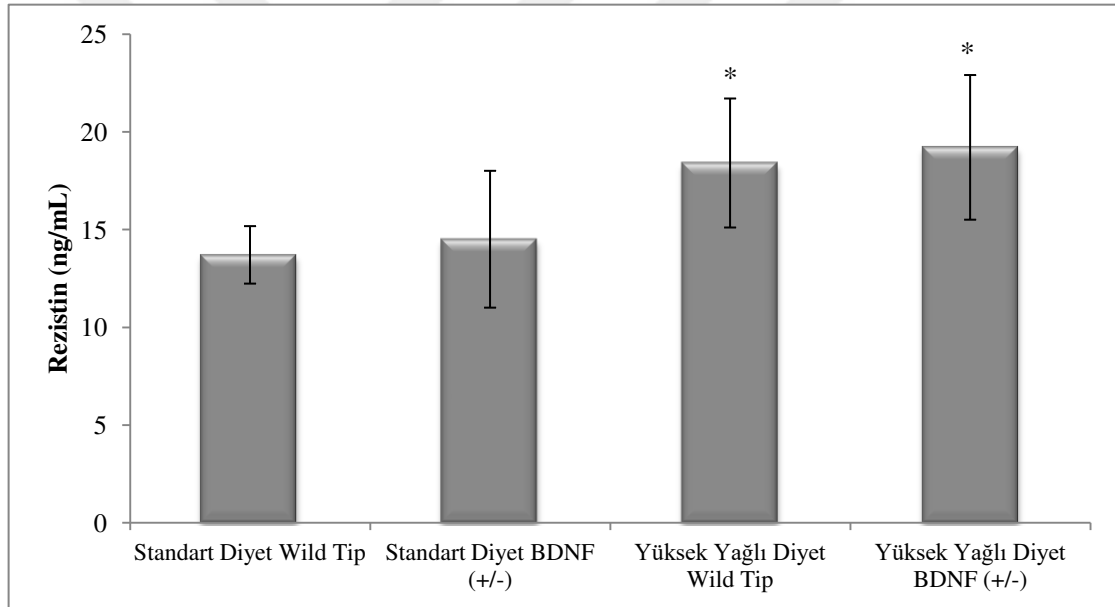
6.6. Rezistin Değerleri ile İlgili Bulgular

Serum örneklerinin rezistin düzeyleri ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Çalışma gruplarına ait rezistin konsantrasyonları ve karşılaştırılması Tablo 15 ve Şekil 19’da verildi.

Tablo 15. Grupların serum rezistin konsantrasyonları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Rezistin (ng/mL)	13.72±1.47	14.49±3.5	18.39±3.4	19.2±3.7

Değerler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.



Şekil 19. Grupların serum rezistin konsantrasyonlarının karşılaştırılması. *Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış bulunmuştur ($p<0.05$). p değeri “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

Standart diyetle beslenen farelerin serum rezistin seviyelerine göre yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ($p=0.042$) ve BDNF (+/-) farelerin rezistin değerleri ($p=0.023$) daha yüksektir.

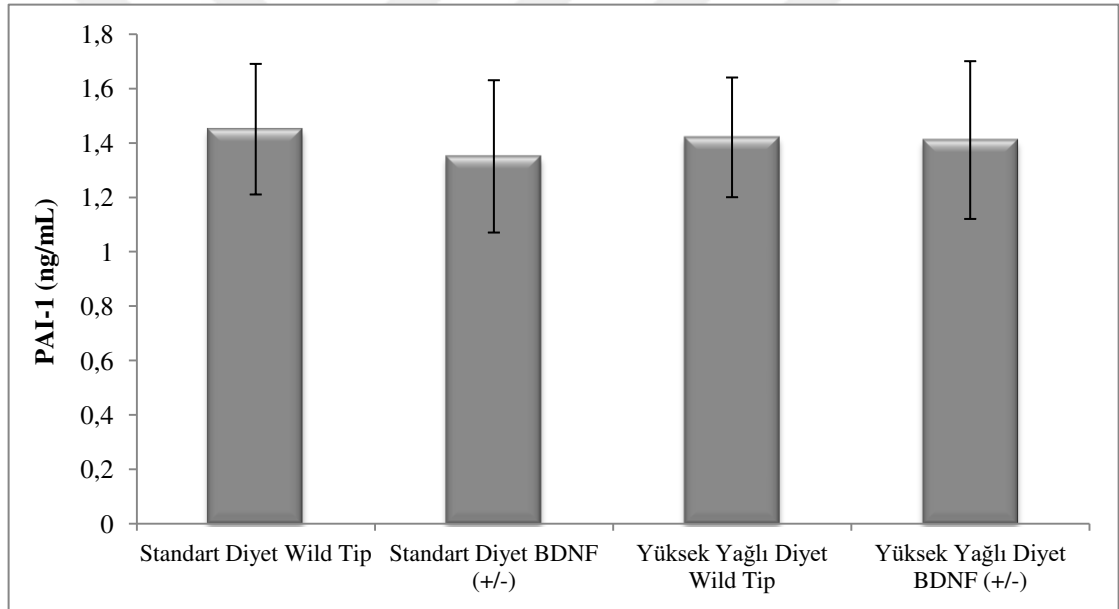
6.7. PAI-1 Değerleri ile İlgili Bulgular

Serum örneklerinin PAI-1 düzeyleri ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Çalışma gruplarına ait PAI-1 konsantrasyonları ve karşılaştırılması Tablo 16 ve Şekil 20’de verildi.

Tablo 16. Grupların serum PAI-1 konsantrasyonları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
PAI-1 (ng/mL)	1.45±0.24	1.35±0.28	1.41±0.22	1.41±0.29

Değerler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.



Şekil 20. Grupların serum PAI-1 konsantrasyonlarının karşılaştırılması. Gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Serum PAI-1 ölçümü sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların PAI-1 seviyeleri karşılaştırıldığında, bu dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

6.8. Yağ Dokularında Ölçülen Genlerin Ekspresyonları ile İlgili Bulgular

Dört gruba ait epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen cDNA’lardan her bir gen için pleyte üçlü yükleme yapıldı. RT-PCR ile bu dokularda leptin, adiponektin, rezistin, PAI-1 ekspresyonlarına bakıldı ve her numune için kesişim

noktası (Cp, crossing point) değerleri elde edildi. Üçlü çalışmadan elde edilen Cp değerlerinin ortalamaları alındı ve bu Cp değerlerinden yararlanılarak kontrol grubuna (standart diyet, wild tip) göre her grup için kat değişimleri hesaplandı.

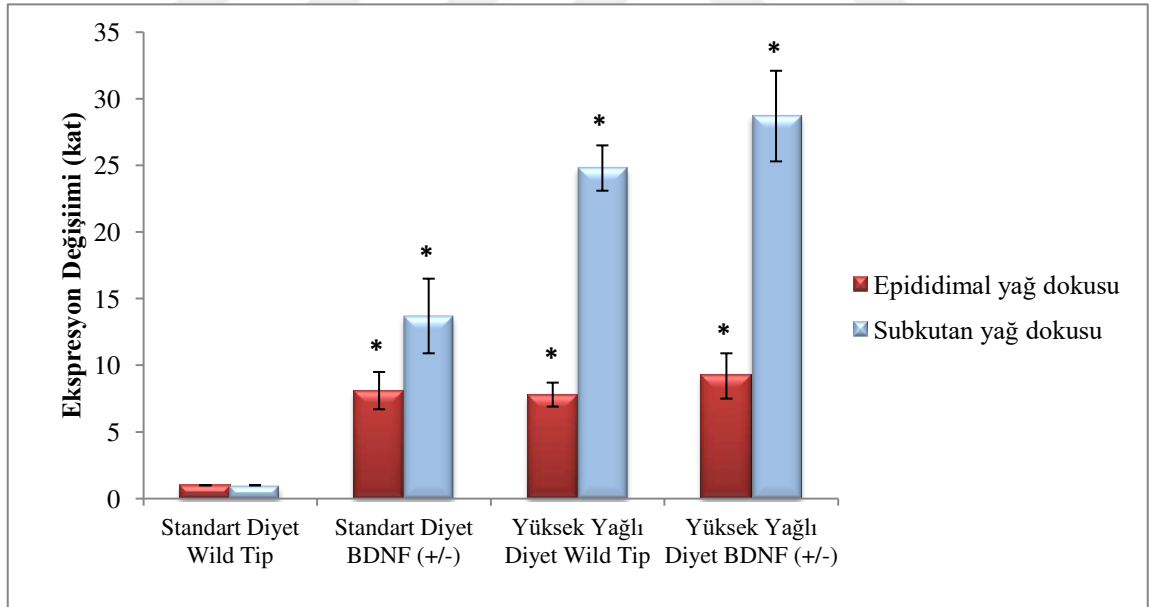
6.9.1. Leptin Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Leptin gen ekspresyonuna ait sonuçlar Tablo 17 ve Şekil 21’de verildi.

Tablo 17. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait leptin ekspresyon sonuçları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Epididimal yağ dokusu				
Leptin	1.0	8.1±1.4	7.8±0.9	9.2±1.7
Subkutan yağ dokusu				
Leptin	1.0	13.7±2.8	24.8±1.7	28.7±3.4

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.



Şekil 21. Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının leptin ekspresyonu karşılaştırılması. *Kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0.05$). p değeri “One way ANOVA” testine göre verilmiştir. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler “Tukey” ve “Tamhane’s T2” testleri ile yapılmıştır.

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların epididimal leptin ekspresyonları kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik Şekil 20’de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre kontrol grubuna göre standart diyetle beslenen BDNF heterozigot grubu ($p=0.001$), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ($p=0.001$) ve heterozigot grubu ($p=0.003$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların subkutan leptin ekspresyonlarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik Şekil 20’de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre leptin ekspresyonu kontrol grubuna göre standart diyetle beslenen BDNF heterozigot grubu ($p=0.005$), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ($p=0.001$) ve heterozigot grubu ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

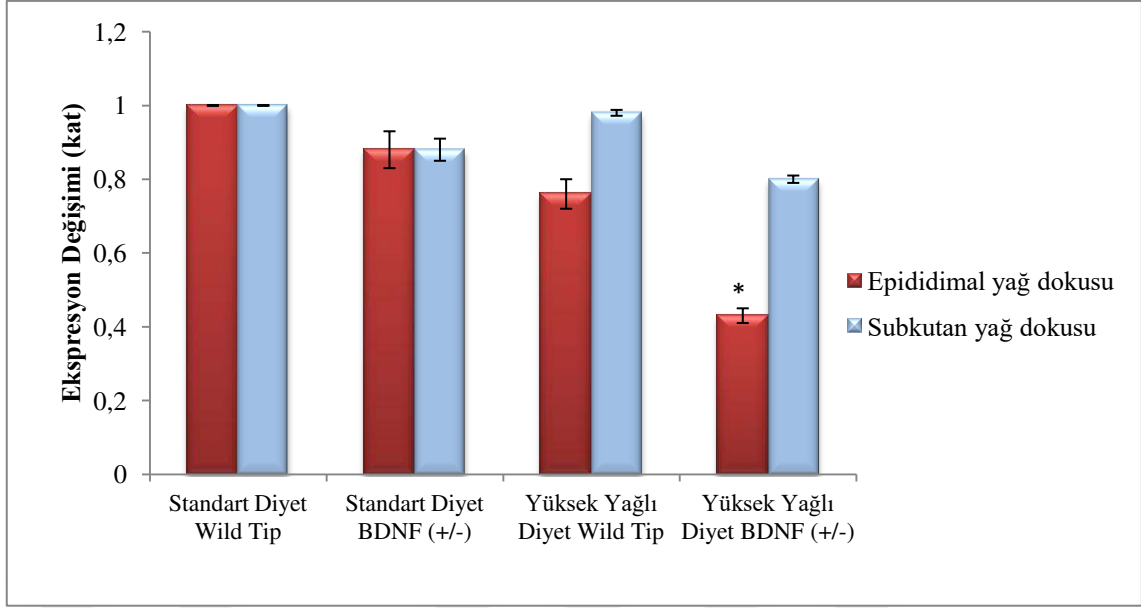
6.8.2. Adiponektin Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Adiponektin gen ekspresyonuna ait sonuçlar Tablo 18 ve Şekil 22’de verildi.

Tablo 18. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait adiponektin ekspresyon sonuçları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Epididimal yağ dokusu				
Adiponektin	1.0	0.88±0.05	0.76±0.04	0.43±0.02
Subkutan yağ dokusu				
Adiponektin	1.0	0.88±0.03	0.98±0.008	0.80±0.01

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.



Şekil 22. Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının adiponektin ekspresyonu karşılaştırılması. *Kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0.05$). p değeri 'One way ANOVA testi'ne göre verilmiştir. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların epididimal adiponektin ekspresyon sonuçlarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik Şekil 21'de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre kontrol grubuna göre adiponektin ekspresyonunda standart diyetle beslenen BDNF heterozigot grubu ($p = 0.676$) ve yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ($p = 0.157$) arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı. Adiponektin ekspresyonu yüksek yağlı diyetle beslenen heterozigot grubunda ($p = 0.003$) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur.

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların subkutan adiponektin ekspresyonları kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik şekil 21'de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre kontrol grubuna göre diğer üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

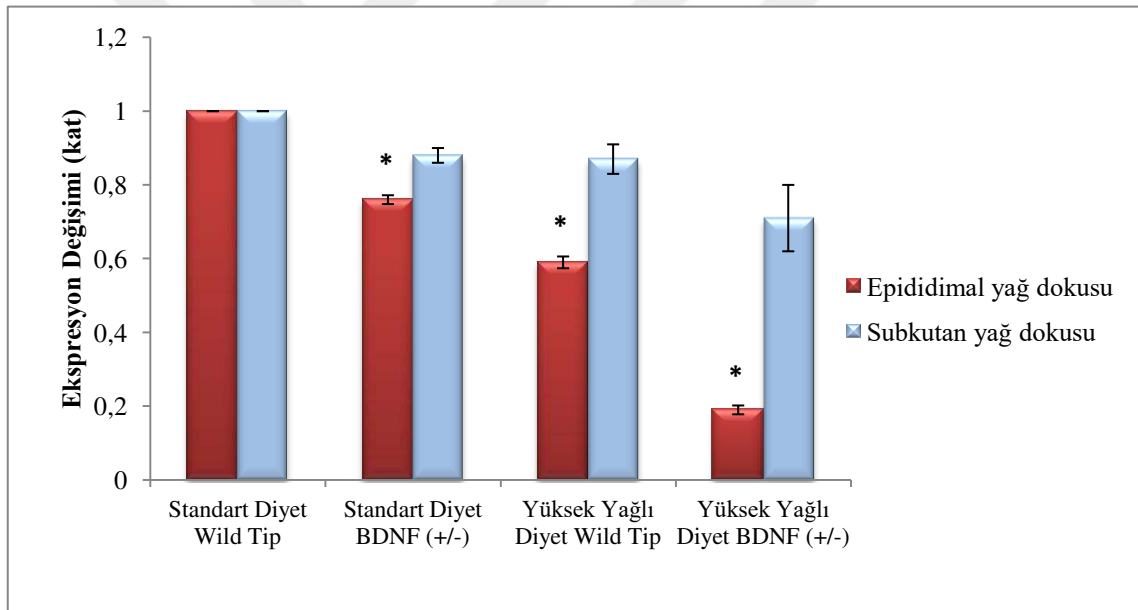
6.8.3. Rezistin Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Rezistin gen ekspresyonuna ait sonuçlar Tablo 19 ve Şekil 23’de verildi.

Tablo 19. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait rezistin ekspresyon sonuçları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Epididimal yağ dokusu				
Rezistin	1.0	0.76±0.012	0.59±0.016	0.19±0.012
Subkutan yağ dokusu				
Rezistin	1.0	0.88±0.02	0.87±0.04	0.71±0.09

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.



Şekil 23. Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının rezistin ekspresyonu karşılaştırılması. *Standart diyetle beslenen wild tip grubuna göre diğer gruplarda anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0.05$). p değeri "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane"s T2" testleri ile yapılmıştır.

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların epididimal rezistin ekspresyon sonuçlarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik Şekil 22’de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre kontrol grubuna göre rezistin ekspresyonunda standart diyetle beslenen BDNF heterozigot grubu ile yüksek yağlı

diyetle beslenen wild tip ve heterozigot grubu istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0.001$).

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların subkutan rezistin ekspresyonları kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik Şekil 22’de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre kontrol grubuna göre diğer üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

6.8.4. PAI-1 Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

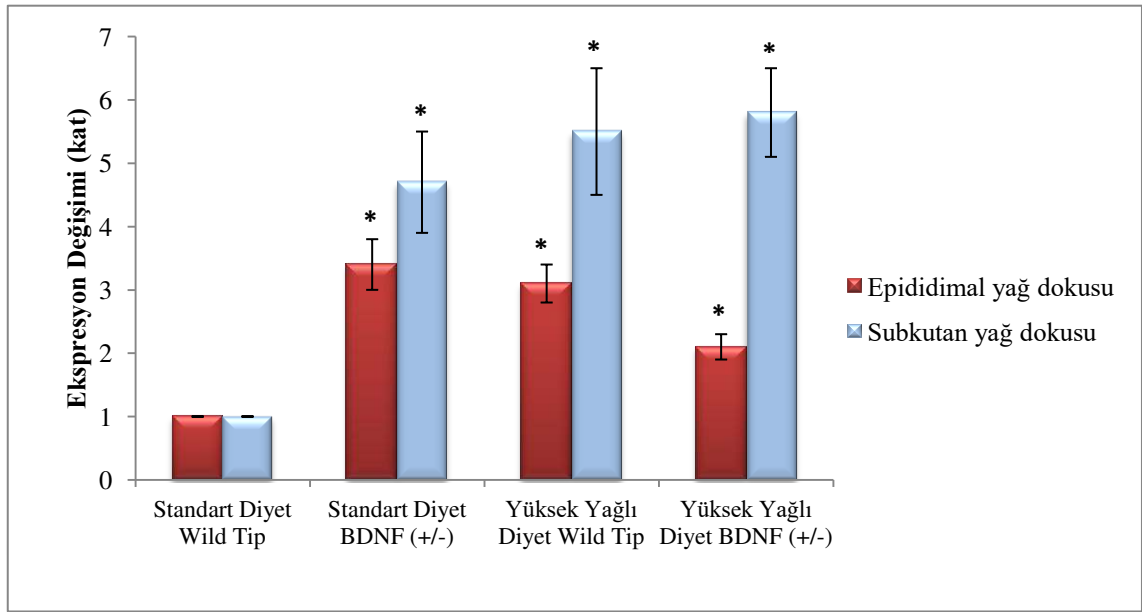
PAI-1 gen ekspresyonuna ait sonuçlar Tablo 20 ve Şekil 24’de verildi.

Tablo 20. Epididimal ve subkutan yağ dokularına ait PAI-1 ekspresyon sonuçları

Diyet türü	Standart diyet		Yüksek yağlı diyet	
Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	Wild tip	BDNF (+/-)
Epididimal yağ dokusu				
PAI-1	1.0	3.4±0.4	3.1±0.3	2.1±0.2
Subkutan yağ dokusu				
PAI-1	1.0	4.7±0.8	5.5±1.0	5.8±0.7

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların epididimal PAI-1 ekspresyonlarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik Şekil 23’de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre PAI-1 ekspresyonları kontrol grubuna göre standart diyetle beslenen BDNF heterozigot grubu ($p=0.001$), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ($p=0.001$) ve heterozigot grubu ($p=0.013$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.



Şekil 24. Grupların epididimal ve subkutan yağ dokularının PAI-1 ekspresyonu karşılaştırılması. *standart diyetle beslenen wild tip grubuna göre diğer gruplarda anlamlı bir artış bulundu ($p < 0.05$). p değeri "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane"s T2" testleri ile yapılmıştır.

RT-PCR sonrası hesaplanan sonuçlara göre grupların subkutan PAI-1 ekspresyonu kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen grafik şekil 23'de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre kontrol grubuna göre standart diyetle beslenen BDNF heterozigot grubu ($p=0.01$), yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ($p=0.005$) ve heterozigot grubu ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışmamızda besin alımında ve birçok metabolik yolun düzenlenmesinde güçlü merkezi etkileri olduğu ortaya koyulan BDNF'nin, yağ dokusundan sentezlenen fizyolojik ve patolojik roller üstlenen bazı adipokinlere (leptin, adiponektin, rezistin, PAI-1) etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bu amaçla BDNF heterozigot fareler kullanılarak ilk kez bu proteinin yağ dokusundaki adipokinlere etkisi incelendi ve yüksek yağ indüklü obezite modeli oluşturularak farklı yağ depolarının adipokin sentezleme profiline etkisi incelendi. Bu şekilde, BDNF'nin adipokinler üzerinden obezite patolojisindeki yeri araştırıldı.

Nörotrofinler özellikle nöronal ve glial hücrelerden salgılanan endojen peptitlerdir ve nöronal ağların fonksiyonu, devamlılığını sürdürebilmesi, gelişiminin düzenlenmesiyle ilişkilidirler. Nörotrofinler arasında BDNF, sinapslardaki güçlü etkileri ve beyindeki geniş ekspresyonundan dolayı en çok çalışılanıdır. BDNF, yüksek ilgiyle bağlandığı TrkB reseptörü vasıtasıyla nörogenez, nöronal sağkalım, plastisite, nöronal farklılaşma, nörit büyümesi ve sinaptogenezi düzenlerken düşük ilgiyle p75 reseptörüne bağlanması daha çok apoptozu indüklemesi ile ilişkilidir (27). Nöronal etkilerine ek olarak, BDNF'nin glukoz metabolizmasını, enerji harcamasını ve gıda alımını düzenlemede merkezi ve periferik etkileri de bulunmaktadır (23, 135).

Merkezi sinir sistemi, özellikle hipotalamus, enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan birçok çekirdeği barındırmaktadır. Bunlardan bazıları, aguti-ilişkili proteini veya proopiomelanokortini eksprese eden arkuat çekirdekteki nöronlarla; PVN'da melanokortin-4 reseptörünü ve oksitosini eksprese eden nöronları içermektedir. Tanımlanan birçok nöropeptide rağmen enerji dengesini kontrol eden sinirsel sistemin tamamı henüz aydınlatılamamıştır ve beyin iştahı nasıl kontrol ettiği büyük ölçüde bilinmemektedir (136). Hipotalamusun birçok yerinde sentezlenen BDNF ile ilgili çalışmalar BDNF'yi besin alımının, enerji metabolizmasının kontrolünde görev alan anahtar bir molekül olarak ortaya koymaktadır. Etkisinin tam olarak bilinmediği periferde enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rolü olan adipoz doku, karaciğer, pankreas, kas gibi dokulardan da sentezlenmesi ve reseptörünün bulunması, BDNF'nin bu konudaki önemini daha da arttırmaktadır. Çalışmamızda bazı periferik etkilerini ortaya koymak adına özellikle vücudun en büyük endokrin organı olan,

BDNF’de dahil olmak üzere birçok sinyal proteini üreten, obezite, tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıkların patolojisinde yer alan yağ dokusu çalışmamızın merkezinde yer almaktadır.

Yağ dokusu son yirmi yılda fazla lipidler için durağan bir depodan, sentezlediği proteinlerle enerji dengesi (açlık-tokluk sinyali, lipid ve karbonhidrat metabolizması), adiposit çoğalması ve farklılaşması, inflamatuvar cevap, anjiyogenez, üreme, insülin duyarlılığı, termojenez, vasküler endotel fonksiyonu, kan pıhtılaşması ve kan basıncının regülasyonu gibi önemli biyolojik olayların düzenlenmesinde yer alan metabolik olarak oldukça aktif bir endokrin organ haline dönüşmüştür. Yağ dokusunun fazlası, buradan sentezlenen proteinlerde (adipokinler) değişikliklere sebep olmakta ve kilo alımına bağlı patolojileri ortaya çıkarmaktadır (77). Adipoz dokunun sadece enerji kaynağı olmaması, birçok sitokin ve yağ dokusu kaynaklı peptitleri salgılama yeteneği olan aktif bir organ olmasından dolayı yeni metabolik belirteçlerin varlığını ve bunların etkisini araştırmak için çalışmalara kaynak oluşturmaktadır. Adipokinler, birçok metabolik yolun düzenlenmesinde önemli roller üstlendikleri için yağ kütlesinin artmasıyla ortaya çıkan obezite ve obezite ile ilgili hastalıkların gelecekteki tedavisi için umut verici hedef moleküllerdir.

Yağ dokusu renk, yerleşim, damarlanma, fonksiyon, metabolizma, salgıladığı protein farklılığı açısından beyaz ve kahverengi yağ dokusu olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Beyaz yağ dokusu depoları ise anatomik yerleşim, hücresel içerik, moleküler bileşim, fizyolojik etki, fonksiyonel farklılık açısından subkutan ve viseral olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır. (67). Farklı depolardaki yağ birikimleri farklı klinik sonuçlar doğuracağından, subkutan ve epididimal (viseral yağ deposu) yağ dokusunun her ikisinde de çalışmamızda belirlediğimiz adipokinlerin ekspresyonlarındaki değişimi araştırdık.

Çalışmamızda subkutan ve epididimal yağ dokularında leptin, adiponektin, rezistin, PAI-1 genlerinin ekspresyonlarına RT-PCR cihazı ile bakıldı. Bunun için alınan dokulardan aynı gün RNA izolasyonu ve cDNA dönüşümü yapıldı. Başarılı bir RNA izolasyonu, dokulara izolasyondan önce hızlı işlem gerektirir. Endojen RNazlar, dokunun parçalanmasından sonra, hemen hücresel bölmelerden salınır. RNA yıkılmasını önlemek için bu RNazları mümkün olduğunca çabuk inaktive etmek

gerekmektedir. Bu nedenle, kesimden hemen sonra steril ependorflara alınan dokulara sıvı azotta ani-dondurma işlemi yapıldı. RNA yıkılmasının önlenmesi, dokunun hızlı ve tam dondurulmasını sağlamak için küçük parçalara kesilmesi önemlidir. Alınan dokulardan kaybı önlemek için aynı gün RNA izolasyonu yapıldı. Çalışma steril ortamda, steril pipet uçları kullanılarak yapılmalı ve kullandığımız dokular buz üzerinde olmalıdır. Çalışma yapılacak yüzeyler yabancı DNA ve/veya RNA'ları uzaklaştıracak bir solüsyon ile fiziksel olarak temizlenmelidir. RNaz'lar RNA'ların parçalanmasına neden olan tüm dokularda ve deride bulunan çevresel etkilere karşı dayanıklı enzimlerdir. Bu yüzden çalışmada kullanılacak olan her türlü plastik ve diğer sarf malzemeler kullanılmadan önce RNazın aktivitesini inhibe eden dietilpirokarbonat (DEPC) ile temizlendi. Çalışmamızda RNA izolasyonu yapılırken DNase I genomik DNA'yı yok etmek için kullanıldı. Elde edilen total RNA'lar bekletilmeden reverse transkriptaz ile cDNA üretimi gerçekleştirildi. cDNA sentez reaksiyonlarında random-hegzamer primerler, oligo (dT) primerler veya gen spesifik primerler (GSP) kullanılabilir. cDNA sentezinde dikkate alınması gereken bir faktör, cDNA'yı sentezlemek için primerin seçilmesidir. Oligo (dT) primerler mRNA'nın poly(A) kuyruğuna hibridize olur. RNA yüksek kalitede ise tercih edilirler. Çünkü polimerizasyonun, 3'ucundan istenilen transkriptin sonuna dek devamlılık göstermesi gerekir. Random primerler tek zincirli küçük DNA fragmanlarıdır (oligonükleotidler). Bazların mümkün olan tüm kombinasyonundan oluşurlar. Random primerin kullanımı daha kısa cDNA parçalarının üretilmesinde ve reverse transkriptaz genellikle uzun mRNA'ların 5'ucuna ulaşamadığından mRNA'nın 5'uçlarının cDNA'ya dönüştürülme ihtimalinin arttırılmasında faydalı olabilir. Çalışmamızda bu aşamada random primer tercih edildi ve elde edilen cDNA'lar ekspresyon analizleri için kullanıldı. mRNA ekspresyonunun kantitasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Northern blotting, in situ hibridizasyon, RPA (RNase protection assays), cDNA assays, RT-PCR bunlar arasında sayılabilir. RT-PCR bu amaçla kullanılan kolay, hassas ve çok sayıda ürüne uygulanabilen bir yöntem olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. RT-PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve eş zamanlı monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan ürün ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (137). Boya temelli yöntemler özellikle çoklu mRNA'larla çalışıldığında birden fazla analiz için oldukça düşük maliyet bakımından avantajlı

olmasına rağmen; sahte-pozitif sinyaller üretebilmesinden dolayı dezavantajlıdır. Çünkü boya, hem hedef hem de spesifik olmayan dizilere, yani herhangi bir çift sarmallı DNA'ya bağlanabilmektedir. Prob yönteminin birincil avantajı, floresan sinyali üretmek için prob ve hedef arasındaki spesifik hibridizasyona ihtiyaç duyulduğu için PCR özgüllüğünün garanti altına alınmasıdır (spesifik olmayan PCR ürünlerinin olmadığını doğrulamak için PCR sonrası analiz yapmaya gerek yok). En büyük dezavantaj, farklı hedef sekanslar için farklı problemlerin sentezlenmesi gereğidir. Avantajlı olacağını düşündüğümüz için çalışmamızda ekspresyon analizleri problemler kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda her örnek üçlü çalışıldı ve her pleytte her gruptan örnek olmasına dikkat edildi. Sonuçta, her örnek için elde edilen Cp değerleri hesaplama için kullanıldı. Ekspresyon deneylerinin sonuçlarını hesaplarken, mutlak (absolute) veya göreceli (relative) kantifikasyon kullanılabilir. Mutlak kantifikasyon analizi, hedef mRNA'nın mutlak miktarı standart bir eğri kullanılarak belirlenir. Bir referans numuneye (örn., muamele edilmemiş bir kontrol örneği) göre verilen bir örnekte gen ekspresyonundaki değişiklikleri analiz etmek için göreceli bir kantifikasyon analizi kullanılmaktadır. Göreceli kantifikasyon için kullanılan iki hesaplama yöntemi vardır: standart eğri ve karşılaştırmalı Cp (eşik döngü sayısı). Bu iki yöntem eşdeğer sonuçlar vermektedir. Bu çalışmada, karşılaştırmalı $2^{-\Delta\Delta C_p}$ yöntemine göre göreceli kantifikasyon gerçekleştirildi. Bu yöntem, bilinmeyen numunelerdeki gen kopya sayısının tahmin edilmesini sağlar ve nicel verilerin normalleştirilmesine izin veren tüm numunelerde sabit kopya sayısına sahip bir housekeeping (referans gen) geni gerektirir (138). Kantitatif RT-PCR uygulamalarında normalizasyon amacıyla çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen (veya en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır. Ekspresyon çalışmalarında en yaygın kullanılan referans genler; beta aktin (ACTB), Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), 18S ribozomal RNA (18S), fosfoglisarat kinaz 1 (PGK1), Peptidilprolil izomeraz A (PPIA) ve TATA box bağlayıcı protein (TBP)'dir (139). Referans genler endojen kontrol olarak da adlandırılırlar ve örnekten örneğe ortaya çıkan farklılıkları normalize etmek için kullanılırlar. Bu yüzden yapılan çalışmalarda uygun housekeeping geni seçmek önem taşımaktadır. Çalışmamızda literatür taramalarımız sonucu adipoz dokuda gen ekspresyonu çalışmalarında sıklıkla kullanılan, uygun olacağını düşündüğümüz β -Aktin housekeeping geni referans gen olarak seçilmiş ve kullanılmıştır.

Obezite birçok metabolik bozukluğu beraberinde getiren dünya çapında sıklığı hızla artan metabolik bir hastalıktır. Obez olan insanlarda ve hayvanlarda dolaşımda kilo kaybı ile azalan CRP, IL-1, IL-6 ve TNF- α proinflatuvar sitokinleri, akut faz proteinleri, endotel hücresi disfonksiyonu ve aktivasyonu belirteçleri ortaya çıktığı için düşük dereceli kronik proinflatuvar durum olarak da tanımlanmaktadır (140). Genetik ve çevresel faktörler obezitenin gelişiminde rol oynar ve diyet, bu hastalığın gelişmesine katkıda bulunan başlıca çevresel faktörlerden biridir. İnsanlarda diyetle artan yağ alımının obezite ve diğer ilgili metabolik hastalıklara neden olabilecek vücut ağırlığı artışı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (141). Yağdan zengin diyetler sadece insanlarda obeziteyi teşvik etmez, aynı zamanda hayvanlarda obezite oluşumunu indüklemektedir. İnsan obezitesi çoğunlukla fazla kalori alımı sonucu geliştiği için hayvan çalışmalarında da diyet indüklü obezite modelleri ön plana çıkmaktadır. Günümüzde çeşitli hastalıklara tanı koyulması, patogenezinin aydınlatılması, hastalıklardan korunma, tedavi olanaklarının ve madde etkinliklerinin incelenmesi için deneysel hayvan modellerinin kullanımı oldukça yaygındır. Diyet indüklü obezite hayvan modelleri, genetik olarak özdeş olan obez ve kontrol fareleri arasında karşılaştırmalar yapılmasını sağlar, böylece deneysel değişkenliğin büyük kaynağını ortadan kaldırılır. Ayrıca bu modeller anti-obezite bileşiklerinin ve obezitede gelişen durumlar için tedavilerin değerlendirilmesinde faydalıdır (122). Farelerde yüksek yağlı diyet ile oluşturulmuş obezite modeli diğerlerine göre daha geç şekillenmesine rağmen diyetle bağlı gelişen insan obezitesini temsil edebilecek en uygun model olarak görülmektedir. Obezite ile ilgili çalışmalarda uygun hayvan modelini kullanmak ilgili fizyopatolojik mekanizmaların açıklanabilmesi açısından önem taşımaktadır. Inbreed (yakın akrabalı) yetiştirilen C57BL/6J, AKR/J ve DBA/2J gibi fare ırkları ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalar yüksek yağlı diyet ile obezite modeli oluşturmada en uygun ırkın C57BL/6J olduğunu göstermektedir. Çünkü bu fare ırkı yüksek yağ içerikli diyet ile beslendikleri zaman insanlarda görülen metabolik sendroma benzer anormallikleri göstermektedirler (8). Çalışmalarda kullanılan farklı yağ asidi kompozisyonlarına sahip birçok diyet, 'yüksek yağlı diyet' terimi altında yer alır ve bu nedenle ortaya çıkan fenotipler de büyük ölçüde değişkenlik gösterir. Bunlardan dolayı çalışılan deney hayvanlarının türü ve ırkının yanı sıra diyetteki yağ oranı ve beslenme süresi obezite modeli oluşturmada gerekli vücut artışının sağlanabilmesi açısından önem taşımaktadır.

Sıçanlarda ve farelerde diyetteki yağ seviyesi ile vücut ağırlığı veya yağ kazancı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Bununla birlikte, tam olarak obezite tablosu adiposit hiperplazisi, mezenterde yağ depolanması, artan yağ kitlesi, diyabet ve hipertansiyon ile birlikte obezite tablosu yüksek yağlı diyetle beslendikten 16 hafta sonra ortaya çıkmaktadır (128). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda obezite modeli oluşturmada uygun bir ırk olduğu birçok literatürde belirtilen, obeziteye dirençli olmayan, insan obezite semptomlarını en iyi sergileyen C57BL/6J fare ırkı kullanılmıştır ve obezite oluşumunu sağlamak için 16 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenmişlerdir. Literatür incelendiğinde çalışmalarda %30-60 arasında enerjinin yağlardan sağlandığı diyetlerin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Genel olarak, toplam enerjinin % 30'dan fazlasının yağlardan sağlandığı diyetlerin kullanılması obezitenin gelişmesine yol açar (8). Bizim de çalışmamızda tercih ettiğimiz enerjinin %60'ının yağlardan sağlandığı diyet, kısa sürede obezite oluşturmada daha avantajlı olduğu için çoğunlukla tercih edilmektedir.

Çalışmada kullandığımız C57BL/6J ırkı erkek fareler, özellikle standardizasyon ve beslenme süresi de göz önüne alındığında 4-5 haftalık olanlar tercih edilmiştir. Deneye başlangıç kiloları ve başlangıç yaşları kilo alımını etkileyeceği için her grup içinde ortalama ağırlıkların aynı olmasına dikkat edilmiştir. Sonuçlarımızda görüldüğü gibi çalışma gruplarımızın başlangıç ağırlıkları arasında fark bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Bkz. Tablo 10). Obez fareler strese karşı oldukça hassastır ve stres; enerji harcamaları, besin alımı, lokomotor aktivite ve vücut kompozisyonunu değiştirerek enerji homeostazını birçok yönden etkilemektedir. Bu yüzden kafes yerleşimi, farelerin yoğunluğu, gıda kalitesi, farelerin taşınması, barınakları, fare kontrol sıklığı farelerde obezite gelişimini etkileyecek durumlar oluşturacaktır. BDNF heterozigot fareler wild tiplere göre daha agresif, hiperaktif ve saldırgan bir fenotipte oldukları için farelerin tek tek yerleştirilmesine imkan sağlayan özel havalandırılan kafes sistemi (RAIR IsoSystem) kullanıldı ve fareler bu kafeslere tek tek yerleştirildi. Bu şekilde fazla sayıda farenin oluşturacağı su veya yem yemedeki farklılıklar, saldırgan davranışlarda bulunma gibi deneysel sonuçlarımızı etkileyecek faktörler en aza indirgenerek tüm fareler için standart barınma koşulları oluşturuldu. Ayrıca bu durum çalışma için alınan fareler deneye aynı anda alınamadığı için az sayıda farenin ortam koşullarından etkilenmeden çalışmaya katılması için imkan sağladı.

PCR işlemi sonrasında yapılan elektroforez sonucuna göre deney farelerinin genotipi belirlenmiştir (Bkz. Resim 3). Kuyruklardan elde edilen örnekler, sonuçlar çıkmadığında veya daha sonradan çalışılan parametrelerin sonuçlarına göre grup bütünlüğünü bozan bir durum ile karşılaşıldığında genotipleme işleminin tekrarlanması için -80 dondurucuda saklandı. Genotipleme sonrasında gruplara alınmadan fareler standardizasyon için 15 gün standart diyet ile beslendi. Bu, farelerin ortam koşullarına adaptasyonu ve fareleri gözlemleyip deneye alınamayacak bir problemi olanların ekarte edilmesine olanak sağladığı için önem taşımaktadır. Fareleri kilo artışını takip etmek ve obezitenin gelişimini incelemek için deneye başlangıçta ve 4 ay boyunca 15 gün aralıklarla ağırlıklarındaki artış kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 14).

Standart (Ek 1) ve yüksek yağlı diyetlerle (Ek 2) 16 haftalık beslenme süresinin ardından, standart diyetle beslenen wild tip (kontrol) grubuna göre diğer gruplarda anlamlı derecede kilo alımı gözlemlendi ($p < 0.05$, Bkz. Tablo 10). Dekapitasyon ile kurban edilen farelerin epididimal ve subkutan yağ dokuları alınırken yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarla arasındaki bu fark gözlemlendi (Bkz. Resim 5, Resim 6). Boger ve arkadaşlarının standart diyetle besledikleri BDNF (+/-) ve WT farelerin 3, 12 ve 21. aylarda takip edilen vücut ağırlıkları arasındaki farkın özellikle yaş ilerlerikçe belirgin olarak arttığını göstermişlerdir (142). BDNF (+/-) heterozigot farelerde ve BDNF geninde veya onun reseptörü TrkB geninde mutasyon olan farelerde, hipotalamusta azalan BDNF gen ekspresyonlarıyla birlikte hiperfaji ve obezite gözlenmektedir. Ekzojen BDNF uygulaması ise besin alımını ve vücut ağırlığını azaltarak bu hayvan fenotiplerini tersine çevirmektedir (39). İnsanlarda da BDNF veya TrkB genlerinin mutasyonları ile bazı obezite türleri veya diğer yeme bozuklukları arasında ilişkili bulunmaktadır (135). Kilo artışı sonuçlarına bakıldığında normal diyetle beslenen heterozigot farelerde ortalama yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip gruptaki kadar kilo alımı gerçekleştiği görülmektedir. Bu sonuçlardan BDNF'nin hiperfajik etkisini görmekteyiz. BDNF'nin enerji dengesinin düzenlenmesindeki rolüne ilaveten, ödül/bağımlılık sistemi aracılığıyla lezzetli yiyeceklerin hedonik (hazcı) beslenmesini bastırmaktadır. BDNF-TrkB sinyal eksikliği olan fareler yüksek yağlı diyetle beslendikleri zaman aşırı hiperfajik durum ortaya çıkar, bu da yemek büyüklüğünün daha da artmasına yol açmaktadır (45, 143). Böylece, bu sistemde mutasyon oluşumu bireylerde aşırı yeme ve kilo artışına katkıda bulunabilir. Bu çalışmada, diyet yağının ve

BDNF eksikliğinin farelerde obezite gelişiminde bir etkisi olduğu yüksek yağlı diyetle beslenen heterozigot farelerde açıkça görölmektedir. Yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF heterozigot farelerde diğer gruplara göre artan kilo hedonik beslenme durumunu desteklemektedir. Bu yüzden BDNF sinyali bozulduğu zaman ödöl merkezinin yapısındaki ve işlevindeki değişiklikleri anlamak da kritik önem taşımakta ve yüksek yağlı diyetin aşırı alımı insan obezitesinin önemli bir nedeni olduğu için BDNF eksikliği yüksek yağlı diyetle bağlı artan hiperfajiye yol açabilmektedir. Ayrıca obezitede de artan stresin hipokampustaki sinir hücrelerinin oluşumunu önemli ölçüde bozarak BDNF ekspresyon seviyesini düşüreceğini belirtilmektedir. Kemirgenlerde strese cevap olarak artan plazma kortikosteron yüksek yağlı diyet uygulamasında artmaktadır. Zheng ve arkadaşları, BDNF ve kortikosteron arasındaki negatif ilişkiyi ortaya koymuşlardır (144). Yüksek yağlı diyetle ortaya çıkabilen stres durumu da BDNF sentezini azaltabileceğinden yüksek yağlı diyetle bağlı kilo artışı ve BDNF ilişkisini destekleyen faktörlerden birinin ortaya çıkan strese bağlı olması muhtemel görölmektedir. BDNF'nin beslenme davranışını düzenleyen moleküller üzerine etkilerinin bakılması kilo alımının ayrıntılı incelenmesi bakımından faydalı olacaktır.

Dekapitasyon ile sakrifiye edilen farelerden alınan serum örneklerinde glukoz, trigliserit rutin biyokimya laboratuvarında ölçüldü. Serumdaki leptin, adiponektin, rezistin, PAI-1, BDNF ve insülin parametrelerinin tayininde ise proteinlerin kantitatif analizinde sıklıkla kullanılan ticari olarak satın alınan immünolojik ölçüm yöntemi olan ELISA tekniği kullanılmıştır.

Çalışmamızda heterozigot kaynaklı BDNF azalmasını teyit etmek ve diyet etkisine bakmak için ölçtüğümüz serum BDNF değerleri heterozigot gruplarda, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$) (Bkz. Şekil 11). Grupların ortalamalarına baktığımızda genotipte yapılan %50 azalmanın beklediğimiz şekilde serum değerlerine yansımadığını görmekteyiz. BDNF proteinini kodlayan iki allelden birinden yoksun olan transgenik fare modelinde pek çok beyin bölgesinde BDNF ekspresyonu %50 oranında azalmıştır. BDNF heterozigot transgenik (+/-) farelerde BDNF ekspresyonu düşük olduğundan dolayı bu hayvanlarda dolaşım BDNF düzeylerinin de düşük olması beklenmektedir. BDNF düzeylerinin deneysel manipölasyonları, beslenme ve metabolizmayı etkiler ve gıda yoksunluğu, stres gibi çevresel faktörler beyindeki BDNF ekspresyonunda değişikliklere neden olur (10). Yamada ve arkadaşları yaptıkları bir

çalışmada 16 hafta kaloringin %60'ının yağlardan sağlandığı diyetle beslenen erkek C57BL/6J farelerin korteks ve hipokampusünde BDNF protein miktarlarının kontrole göre azaldığını bulmuşlardır (145). Yaptığımız ölçümlerde yüksek yağlı diyetle beslenmenin dolaşım BDNF düzeyleri üzerine etkisini bulamadık. mRNA ekspresyonu sonrası modifikasyonlar nedeniyle sentezlenen protein ekspresyon oranını yansıtmamaktadır. Çünkü serum BDNF seviyeleri için eğer proBDNF ve olgun BDNF dönüşümünü yapan proteazlar fazla eksprese oluyorsa kanda daha fazla olgun-BDNF seviyeleri elde edilir. BDNF'yi parçalayan proteazların artması ise kanda BDNF seviyelerini düşürür. Farklı bir kesilme vasıtasıyla, pro-BDNF ayrıca 28 kDa'lık (kesilmiş-BDNF) başka bir proteolitik BDNF izoformu üretebilmektedir. Bu yüzden toplam BDNF miktarını daha doğru yansıtması açısından BDNF izoformlarını da ölçmek aradığımız oranları hem daha iyi yansıtacak hemde şizofreni, depresyon, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patolojik durumla ilişkilendirilen (146) proBDNF düzeylerinin dolaşımdaki miktarına bakılarak diyet etkisinin bu patolojiler üzerine etkisi incelenebilecekti. Ek olarak, sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada plazma BDNF değerleri aralığı 8.0–927.0 pg/mL olarak bulunmuştur (147). Farelerde de böyle bir durum söz konusu ise, BDNF miktarlarındaki bu geniş aralık, heterozigot gruplarda beklenen %50'lik azalmanın serum seviyelerine yansımamasının sebebi olarak gösterilebilir.

Obezite, vücut ağırlığı, yağ dokusu, glukoz metabolizması, kolesterol seviyesi ve inflamatuvar belirteçlerin bozulmalarını içeren çoklu organ sistemi hastalığıdır (62). Bu nedenle, çalışmalarda obezite gelişimi boyunca veya sonrasında çok çeşitli parametreler incelenmekte ve ölçülebilmektedir. Bununla birlikte kullandığımız diyet içeriği ve hayvan modeli, farklı fizyolojik parametreleri etkileyebileceğinden yapılacak ölçümleri ve deneysel yöntemleri iyi belirlemek gerekmektedir. Bizim çalışmamızda da hayvan modelini karakterize etmek ve metabolik durumu daha iyi yansıtacağını düşündüğümüz için bazı obezite patolojilerinin oluşumunu da desteklemesi açısından serum açlık glukoz, trigliserit ve insülin değerleri ölçülmüştür.

Çalışma gruplarımız serum trigliserit yönünden karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre yüksek yağlı diyetle beslenen grupların her ikisinde de anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Bkz. Tablo 10). Julio ve arkadaşları C57BL/6J farelerini 16 hafta boyunca kaloringin %60 ve %10'unun yağlardan sağlandığı diyetlerle besledikleri

farelerin serum trigliserit değerlerinde artış bulmuşlardır (148). Sonuçlarımıza bakıldığında heterozigot standart diyetle beslenen grupta serum trigliserit düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tip 2 diyabetli insanlarda yapılan bir çalışmada plazma BDNF seviyeleriyle trigliserit seviyeleri arasında pozitif ilişki bulunduğunu belirtmişlerdir (102, 149). Hepatik BDNF mutasyonu oluşturulmuş farelerde yapılan bir çalışmada ise serum trigliserit seviyelerinde wild tip farelere göre değişiklik bulamamışlardır (150). Literatür incelendiğinde insan ve fareler arasında BDNF ile dolaşımdaki trigliserit değerleri arasındaki ilişkinin farklı bulunduğu grlmektedir. İnsanlarda BDNF trombositlerde depolandığı için özellikle inflamatuvar durumlarda dolaşımda seviyesinin değişmesi muhtemeldir. Ayrıca insanlarda trombin, kollajen, Ca^{+2} ve shear stres trombositlerden BDNF'nin hızlı bir şekilde serbestleşmesine neden olabilir (151). Farelerde böyle bir durum olmadığından patolojik durumların seruma yansımada insan-fare arasında uyumazlıklar olması beklenebilir. Deney sonuçları serum açlık glukoz değerleri yönünden incelendiğinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında BDNF heterozigot grupların ikisinde de anlamlı artış bulunmuştur ($p<0.05$) (Bkz. Tablo 10). BDNF'nin iştah değişikliğinden bağımsız hipoglisemik bir etkisi bulunmaktadır. Sistemik olarak uygulanması, diyet indüklü obez ve insülin eksikliği bulunan diyabetik modellerde glukoz metabolizmasını geliştirip, kalori alımını ve hiperglisemiye azaltmaktadır (152). Meek ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada BDNF'nin merkezi enjeksiyonunun kan glukoz seviyelerini düşürdüğünü ve bu etkinin, insülinden bağımsız olduğunu, ciddi insülin eksikliği olan streptozotosinli diyabetik wistar sıçanlarda göstermişlerdir. Bunu da esas olarak glukagon seviyelerini azaltarak hepatik glukoz üretimini azaltması yoluyla yaptığını belirtmişlerdir. Ek olarak bu hayvanlarda glukoz-6-fosfataz ve fosfoenolpiruvat karboksi kinazı da içeren anahtar glukoneogenik enzimlerin inhibisyonu yoluyla da hepatik glukoz üretimini azalttığını gstermişleridir (153). Kernie ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, haftada bir veya iki kez (70 mg/kg/hafta) *db/db* farelere 3 hafta boyunca BDNF uygulaması, kan glukozunu ve hemoglobınA1c'yi ($HbA1c$ = glikolize olmuş hemoglobın) nemli lde azalttığını göstermişlerdir (154). Yukarıda verildiği gibi BDNF'nin kan glukoz düzeyini düşürdüğü ve sistemik glukoz dengesini düzeltmek insülin direncini önleyebileceği birçok çalışmada grlmektedir. Çalışmamızda yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip grubunda serum açlık glukoz seviyeleri standart diyetle

beslenen wild tip grubu ile karşılaştırıldığında artış olsada bu artış anlamlı bulunamamıştır. Benzer şekilde Joanne ve arkadaşlarının erkek C57BL/6 fareler kullanarak yaptıkları bir çalışmada kaloringin %60'ının yağlardan sağlandığı diyetle 6 ay beslendiklerinde açlık glukoz değerlerinde değişiklik bulamamışlardır. İnsülin direnciyle ve glukoz toleransı ile ilişkili visceral yağ birikiminin yani bölgesel yağ dağılımının değerlendirilmesinin faydalı olacağını belirtmişlerdir (155). C57BL/6 farelerini 10 hafta boyunca farklı yağ kaynaklarından oluşan (domuz yağı, zeytinyağı, ayçiçeği yağı, kanola yağı), enerjisinin %60'ının yağlardan sağlandığı diyetle beslenen gruplarla, kontrol grubunun (kaloringin %10'u yağlardan) kan glukoz değerlerinde değişiklik olsa da bu değişikliği istatistiksel anlamlı bulamamışlardır. (156). Yetişkin C57BL/6 farelerine, 16 haftalık bir periyot boyunca yüksek yağlı (kaloringin % 60'ı yağlardan) ve standart diyet (kaloringin % 10'u yağlardan) verildiğinde yüksek yağlı diyetin hiperglisemi geliştirdiği gösterilmiştir (148). Çeşitli fare, sıçan türleri ve farklı diyet içerikleri kullanılarak yapılan çalışmaların karşılaştırmalı incelendiği bir derlemede ölçülen parametrelerin (glukoz, insülin, leptin, adiponektin, rezistin, trigliserit) değişkenlik gösterdiği görülmektedir (141). Teorik olarak aynı yağ türlerinden oluşan diyetler, birincil yağ kaynakları ile diyet hazırlanması arasındaki kontrol edilemeyen farklılıklar nedeniyle aynı deneysel işleyişe rağmen farklı sonuçlara neden olabilir. Bu farkın kesin nedeni açık değilken, genetik geçmişteki farklılıklar, hayvan cinsiyeti ve yüksek yağlı gıda formülü farklı sonuçlar doğurabilir. Literatürde kullandığımız yağlı diyet yüzdesi ve fare türünde bazı çalışmalarda hiperglisemi ortaya çıksa da bizim sonuçlarımızda yüksek yağlı diyetle beslenen grupların açlık glukoz değerlerinin kontrole göre anlamlı fark bulunamaması, diyet kaynaklı sebeplerden ve 4 aylık sürenin yeterli olmamasından dolayı olabilir. Çalışmamız BDNF'nin ve yüksek yağlı diyet kullanımının açlık glukoz seviyelerine etkisinin karşılaştırmalı incelenmesi bakımından önem taşır. Bakıldığında BDNF heterozigot farelerde açlık glukoz değerlerinin yüksek yağlı diyetle beslenen gruptan daha yüksek olduğunu görülmektedir. Bizim sonuçlarımıza göre BDNF eksikliğinin kan glukoz değerleri üzerine etkisinin obezite modeli oluşturmada sıklıkla kullanılan yüksek yağlı diyetle göre daha etkili olduğunu görmekteyiz. Yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF (+/-) farelerdeki yüksek glukoz seviyeleriyle bu proteinin, obezite durumunda veya obeziteden bağımsız etkili diyabetik faktörlerden biri olabileceğini söyleyebiliriz.

İnsülin, glukoz metabolizmasının ana düzenleyici hormonudur ve merkezi sinir sisteminde anorektik etkilere sahiptir. Yağ dokusunda, lipolizi azaltır, böylece adipositlerden serbest yağ asidi akışını azaltılır; karaciğerde, insülin anahtar enzim aktivitelerini azaltarak glukoneogenezi inhibe eder ve iskelet kasında insülin çoğunlukla GLUT4 glukoz taşıyıcısının plazma zarına translokasyonunu uyararak glukoz alımını indükler (157).

Grupların serum insülin değerleri karşılaştırıldığında kontrol olarak aldığımız gruba göre diğer tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0.05$) (Bkz. Tablo 10). Obezite, artmış bazal plazma insülin seviyeleri ve insülinin metabolik etkilerine karşı direnç ile ilişkilidir. Obeziteden bağımsız olarak da, yüksek yağlı diyetle beslenme kendiliğinden glukoz toleransında bozulmaya ve insülinin kan şekeri düşürücü etkisine duyarsızlığa katkıda bulunur (158). Hayvan çalışmaları da, aynı şekilde yüksek yağlı beslemeyle hiperinsülinemi ve insülin direncinin indüklendiğini göstermiştir. Niloofar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 15 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle (toplam kalorisinin %10-20-30-40-50-60'ı yağlardan) beslenen dişi C57BL/6J farelerde, yüksek insülin seviyeleriyle birlikte diyet yağının yüzdesi ile glukoz intoleransı arasında pozitif ilişki bulunmuştur (8). Bu doz bağımlı etki erkek Sprague–Dawley sıçanlarda enerjinin farklı yağ oranlarından (kalorisinin %10-32-45'i yağlardan) sağlandığında da gözlenmiştir (159). Literatürdeki hayvan çalışmalarında BDNF eksikliğinin dolaşımdaki insülin değerlerini arttırdığı görülmektedir (4). Nakagawa ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada BDNF'nin ICV infüzyonunun C57BL/KsJ *db/db* kemirgenlerde periferik insülin duyarlılığını arttırdığını göstermişlerdir (50). Yine aynı şekilde Tsuchida ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 14 gün boyunca *db/db* farelere BDNF'nin subkutan enjekte edilmesi, insülin ile uyarılan PI3K aktivitesini karaciğerde, iskelet kasında, kahverengi yağ dokusunda arttırmıştır (160). Çalışmamızda literatüre paralel olarak BDNF eksikliğinin ve yüksek yağlı diyetle beslenmenin serum insülin değerlerini arttırdığını görmekteyiz.

Deney sonuçlarımızdaki açlık glukoz ve insülin seviyeleri kullanılarak hesapladığımız insülin direnci (HOMA-IR), kan insülin seviyelerine paralel şekilde çıkmış ve kontrol grubuna göre diğer üç grupta da anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Bkz. Tablo 10). Çeşitli durumlarda ortaya çıkan insülin direnci; insülin reseptörlerinde, glukoz taşınmasında ve metabolizmasında azalmalara ek olarak karaciğer ve kasta

glukozun glikojen olarak depolanmasında azalmalara sebep olmaktadır. İnsülin direnci, dolaşımdaki serbest yağ asitleri konsantrasyonlarının artmasına ve ektopik yağ birikimine neden olarak iskelet kasında insülin aracılı glukoz alımını engeller ve karaciğerde glukoz üretimini artırır (161). Böylelikle artan insülin miktarına rağmen oluşan insülin direncinden dolayı kan glukoz değerleri artmaktadır. Obezitede aşırı miktarda yağ dokusu, hipoksi, oksidatif stres, endoplazmik retikulumu stres altına sokar, bu da sitokinlerin salgılanmasına ve hücrelerin insüline duyarlılığında azalmaya neden olur. Özellikle yüksek yağlı diyetle gelen veya kilo alımı kaynaklı diyet yağ asitleri hücre membranlarının kompozisyonunu etkiler. Sonuçta reseptörlerin insülin için afinitesi ve hücre üzerindeki davranışı değişir. Diğer organlar da insülin metabolizması değişiminden etkilenmeye başlar ve istenmeyen metabolik değişimler görülür. Bu anormallikler toplam enerjinin % 40'ından fazlası yağlardan alındığında ortaya çıkmaktadır (162). Obezitenin sebep olduğu bu durumlar insülin direncini indükleyebildiği gibi HOMA-IR sonuçlarımızdaki gibi literatürde BDNF'nin insülin duyarlılığını arttırabileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (160). Ayrıca C-reaktif protein, IL-6, TNF- α ve hücrel adezyon molekülleri gibi plazmadaki inflamatuvar belirteçler obez kişilerde yükselmekte ve kilo artışı, insülin direnci parametreleri ile korelasyon göstermektedir. Obez fare modellerinde, yağ rezervlerindeki makrofaj infiltrasyonu ve artmış immün aktivite, sistemik insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir (163).

Serumda ölçtüğümüz parametrelerden leptin çoğunlukla yağ dokusu tarafından üretilen bir adipokindir ve besin alımı, enerji harcamaları, büyümenin düzenlenmesinde önemli fonksiyonlar göstermektedir. Enerji metabolizması üzerine esas etkisini hipotalamusta ortaya koyan leptin, burada anoreksigenik proteinlerin sentezini arttırıp oreksigenik peptitlerin sentezini azaltarak iştahı baskılamaktadır. Açlıkta dolaşım leptin seviyeleri azalırken, beslenme veya obezite leptin düzeylerini artırır. Dolaşımdaki leptin seviyeleri, organizmada beyaz yağ dokusunun toplam miktarı ile doğrudan ilişkilidir (164).

Deney sonuçlarımızdaki grupların serum leptin seviyeleri karşılaştırıldığında standart diyetle beslenen wild tip grubuna göre diğer gruplarda anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Bkz. Şekil 16). Yağ kütlelerinin artmasıyla dolaşımdaki seviyeleri artan leptinin yüksek yağlı diyetle birlikte arttığını gösteren birçok çalışma

bulunmaktadır. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 7 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle (kalorinin % 58'i yağlardan) besledikleri C57BL/6J ırkı erkek farelerde yüksek serum leptin seviyeleri bulmuşlardır (165). Aynı şekilde erkek C57BL/6J farelerle yapılan başka bir çalışmada, kalorinin %40'ının yağlardan sağlandığı diyetle 5, 14 ve 19 haftalık sürelerde beslendiklerinde serum leptin düzeylerindeki artışı, beslenme süresindeki artışla orantılı olarak göstermişlerdir (166). Yapılan çalışmalarda BDNF eksikliği olan hayvan modellerinde zayıf veya wild tip farelerle karşılaştırıldığında dolaşım leptin seviyeleri önemli derecede arttığı görülmektedir. Kernie ve arkadaşları BDNF heterozigot farelerde yaptıkları çalışmada serum leptin seviyesini wild tip farelere göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (4). Bu çalışmaya paralel olarak doğum sonrası beyinde BDNF'nin silinmesiyle oluşturulan mutant farelerde serum leptin seviyelerinde 15 katlık bir artış bulmuşlardır (36). Çeşitli çalışmalarda yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanların uygulanan leptine karşı direnç gösterirdikleri belirtilmiştir. 8, 20 ve 32 hafta yüksek yağlı diyetle (kalorinin %45'i yağlardan) beslenen C57BL/6J erkek farelere leptin uygulaması sonucu hepatik trigliserit birikiminden dolayı bozulan leptin reseptör sinyali sonucu leptin direnci oluştuğunu göstermişlerdir (167). Yüksek yağlı diyet tüketilmesinin indüklediği leptin direncinden dolayı leptinin enerji dengesinin düzenlenmesindeki etkisini sınırladığı görülmektedir. Hiperleptinemiyle oluşan leptin direnci sadece periferik dokularda değil beyinde de ortaya çıkmaktadır. Diyet indüklü farelerde hipotalamusta leptin reseptör ekspresyonunun azaldığını gösteren çalışmalar vardır (136). Leptin, gıda alımı azalması ile ilgili VMN dahil olmak üzere bazı beyin bölgelerinde BDNF sentezini artırıp, besin alımını azalttığını söylemiştik (38). Bu şekilde artan leptin seviyeleriyle hipotalamik nöronlarda bozulan postreseptör sinyali, besin alımının baskılanmasındaki azalma vasıtasıyla patolojik kilo alımına sebep olabilir.

Subkutan ve epididimal yağ dokularında çalışma gruplarının leptin ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Bkz. Şekil 21). Esas olarak yağ dokusu kaynaklı olan dolaşımdaki leptin düzeyleri, artan ekspresyon düzeyleriyle uyumludur. Leptin plazma konsantrasyonu ve yağ dokusunda mRNA ekspresyonu ile vücut kitle indeksi pozitif korelasyona sahiptir ve doğrudan obezite şiddeti ile ilişkilidir (168). Literatürde subkutan yağ dokusunun leptin sentezleme kapasitesinin daha çok olduğu belirtilmektedir (169). Çalışmamızda epididimal ve subkutan yağ dokularının

ekspresyon sonuçlarına bakıldığında subkutan yağ dokusunda daha fazla sentezlendiğini görmekteyiz (Bkz. Şekil 21). Gollish ve arkadaşlarının standart diyet (kalorinin %13'ü yağlardan) ve yüksek yağ içerikli diyetle (kalorinin % 60'ı yağlardan) 4 hafta besledikleri Sprague-Dawley ırkı sıçanlarda özellikle subkutan yağ dokusunda artan leptin ekspresyonu ile serum seviyelerini yüksek bulmuşlardır (170). C57BL/6J ırkı fareleri standart (kalorinin %18'i yağlardan) ve yüksek yağlı diyetle (kalorinin %42'si yağlardan) 16 hafta besledikleri farelerin epididimal yağ dokusunda leptin ekspresyonu artışını görmüşlerdir (171). Yüksek yağlı diyet indüklü obezitede ortaya çıkan tümör nekroz faktör- α ve interlökinler, leptin gen ekspresyonunu ve dolaşımdaki leptin düzeylerini arttırmaktadır. Özellikle TNF- α , adipositlerden leptin salınmasını düzenleyerek obezite ile ilişkili hiperleptinemiye katkıda bulunur. Obezitede esas olarak subkutan yağ dokusunda arttığı gösterilen TNF- α sentezinin bu ekspresyona katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (172). Leptinin hipotalamusun bazı bölgelerinde BDNF sentezini indüklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (51). Leptin hipotalamik BDNF'yi artırırken, BDNF'nin sempatik-beta adrenerjik sinyal ve hipotalamik-pitüiter-adrenal aks (HPA) vasıtasıyla adipositlerde leptin üretimini azalttığı belirtilmektedir (173). Bu konuyla ilgili Lei ve arkadaşlarının tümör büyümesine zenginleştirilmiş çevrenin etkisine bakmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, hipotalamik BDNF ekspresyonunu arttırdığı bilinen zenginleştirilmiş çevrenin beyaz yağ dokusunun sempatik inervasyonunun aktifleşmesine yol açarak β -adrenerjik reseptörler vasıtasıyla leptin ekspresyonunun ve salınımının baskılanmasına yol açtığını göstermişlerdir. Serumda gözlenen leptin değişiklikleriyle uyumlu olarak, zenginleştirilmiş çevrede yaşayan farelerin leptin ekspresyonunun beyaz yağ dokusunda yaklaşık % 50 azaldığını göstermişlerdir (174). Bu şekilde BDNF heterozigot farelerde azalan BDNF değerlerinin adipoz dokularda leptin sentezinin artmasına yol açması olasıdır. BDNF eksikliğiyle birlikte obezitede daha da artmış leptin ekspresyonu sonucu oluşan hiperleptinemi; hiperfaji, insülin direnci, hiperglisemi ve merkezi hipoleptinemi beraberce getirebilmektedir.

Adiponektin yağ asidi oksidasyonunu ve insülin duyarlılığını arttıran bir adipokindir. Anti-aterojenik ve anti-inflamatuvar özelliği vardır. İskelet kasındaki serbest yağ asitlerinin beta oksidasyonunu artırır ve hepatik glukoneogenezin insülinle inhibisyonunu güçlendirir (175). Diğer pek çok adipokin aksine dolaşımdaki

adiponektinin konsantrasyonları, vücut kitle indeksi, glisemi, açlık insülin değerleri ve obezite, tip 2 diyabet hastalıklarıyla negatif korelasyon gösterir. Obezite ile ilişkili katekolaminler, insülin, glukokortikoidler, TNF- α ve IL-6'yı içeren çeşitli hormonlar, *in vitro* yağ hücrelerinde adiponektin salgılanmasını baskılamaktadır (176).

Grupların adiponektin seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre diğer üç grubun serum adiponektin düzeylerinde anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p<0.05$) (Bkz. Şekil 17). Mariana ve arkadaşları C57BL/6 ırkı fareleri 10 hafta yüksek yağlı diyetle (kalorinin %60'ı yağlardan) beslediklerinde insülinle ters orantılı olarak serum adiponektin değerlerindeki azalmayı görmüşlerdir (156). C57BL/6J ırkı fareleri standart ve yüksek yağlı diyetle (kalorinin %60'ı yağlardan) 4 hafta besledikleri farelerin serum adiponektin seviyelerini düşük bulmuşlardır (177). Günümüzde adiponektin serum konsantrasyonları, glukoz toleransı ve metabolik homeostazın önemli bir göstergesi olmaya devam etmektedir (178). Gruplarda azalan adiponektin seviyeleri insülin direncini ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini arttıracığından BDNF'nin de etkilediği görülen bu düşüşün uzun dönemde metabolik etkileri önem taşımaktadır.

Metabolik hastalık için yüksek oranda ilişkili bir risk faktörü olan visceral kilo alımı, insülin direnci ve düşük adiponektin seviyeleri ile bağlantılıdır (179). Obezitede artan proinflamatuvar sitokinler ve hipoksi, oksidatif stres gibi koşullar tarafından adiponektin ekspresyonu inhibe edilir (180, 181). Çalışmamızda visceral yağ deposu olan epididimal yağ dokusunda serum adiponektin ile tutarlı olarak ekspresyonunda kontrole göre bir azalma gözükse de sadece yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF heterozigot farelerde anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p<0.05$) (Bkz. Şekil 22). Adiponektin visceral yağ dokusundan daha çok sentezlenmektedir (74) ve sonuçlarımıza bakıldığında asıl azalmanın bu yağ deposunda olduğunu görmekteyiz. Joanne ve arkadaşları 15 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle besledikleri (kalorinin %45'i yağlardan) C57BL/6 ırkı farelerin subkutan ve epididimal yağ dokularında adiponektin ekspresyonunda değişme bulamamışlardır. Ancak 24 haftalık beslenme periyodunun sonunda adiponektin ekspresyonundaki azalmayı görmüşlerdir (182). Diyetle indüklenen obezitede adiponektin mRNA düzeylerindeki azalmanın her zaman serum adiponektin konsantrasyonlarıyla paralel düşüşü yansıtmadığı görülmektedir. C57BL/6J erkek farelerde Barnea ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, yüksek yağlı ve kontrol diyeti verdikleri gruplarda epididimal yağ dokusunda ekspresyondaki azalmaya karşın

serumda anlamlı bir azalma bulamamışlardır ve dolaşımdaki adiponektin seviyeleri için transkripsiyon sonrası kontrol mekanizmalarının karmaşıklığını vurgulamışlardır (183). Dolaşımdaki adiponektin seviyelerinin netleşmemiş mekanizmalarla düzenlendiği görülmektedir. Çalışmamızda bulduğumuz serum adiponektindeki azalmaya, epididimal dokuda ekspresyondaki azalma eşlik etse de, dokudaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Serumdaki bu azalmaya adiponektinin yağ dokusuyla birlikte sentezlendiği karaciğer gibi diğer organlardaki ve diğer yağ depolarındaki azalmanın da katkı yapmış olması muhtemeldir. Epididimal yağ dokusunda yüksek yağlı diyetle beslenen heterozigot farelerde baskılanan adiponektin ekspresyonuna BDNF yoksunluğunda da artan ve yüksek yağlı diyetle ortaya çıkabilen inflamatuvar moleküllerin rolü olabileceği düşünmekteyiz. İnflamasyonun bir göstergesi olarak da değerlendirdiğimiz leptin/adiponektin oranında yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF (+/-) grupta daha yüksek bulduğumuz değerler artan inflamasyonun göstergesi olabilir.

Leptin ve adiponektin, inflamasyon ve insülin direnci üzerine ters etkilere sahiptir. Leptin, insülin direnci ve tip 2 diyabet ile ilişkili tümör nekroz faktör- α , interlökin-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri uyarır. Buna karşılık, adiponektin anti-inflamatuvar özelliklere sahiptir ve bir dizi proinflamatuvar immun düzenleyicinin ekspresyonunu ve salgılanmasını baskılar. İnsülin direncinin patogeneğinde obezitenin merkezi rolü göz önüne alındığında, plazma leptin ve adiponektin oranlarının, bozulmuş yağ dokusu fonksiyonunu yansıtır, bir inflamatuvar marker olarak kullanılarak faydalı bir insülin indeksi oluşturduğunu varsaymışlardır. Analizler sonucu Leptin/adiponektin oranının en az insülin direncinin altın standart ölçütü kadar insülin direnciyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermişlerdir (184, 185). Çalışmamızda leptin/adiponektin oranına baktığımızda kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı artış bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 18). Bu bilgiler dikkate alındığında inflamasyonun ve insülin direncinin en fazla olduğu grup yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF (+/-) grubu olarak gözükmektedir. Buna göre BDNF'nin de artan inflamasyon vasıtasıyla insülin direncini indükleyebileceğini söyleyebiliriz.

Zayıf farelere rezistinin ekzojen enjeksiyonu, insülin duyarlılığını azaltır ve glukoz intoleransını indükler. Genel olarak yüksek rezistin seviyeleri, kemirgenlerde glukoz intoleransı, azalmış insülin duyarlılığı, hiperglisemi ve dolaşımdaki serbest yağ

asitleri seviyesiyle, obezite, diyabet gelişimi ilişkili iken, insanlarda ateroskleroz ve kardiyometabolik hastalık ile ilişkili bulunmaktadır (186).

Serum rezistin seviyeleri yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Bkz. Şekil 19). Yüksek yağlı diyetin çeşitli hayvan modellerinde dolaşımdaki rezistin seviyelerini arttırdığıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Stepan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 8 hafta boyunca enerjinin %45'inin yağlardan sağlandığı diyetle beslenen C57BL/6J farelerde serum rezistin seviyelerini yüksek bulmuşlardır (187). Yine aynı şekilde 6 haftalık erkek C57BL/6 fareleri 12 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle (toplam kaloringin % 60'ı yağdan) beslediklerinde standart diyet (toplam kaloringin % 10 yağdan) grubuna göre serum rezistin seviyelerini yüksek bulmuşlardır (188). Sonuçlarımız BDNF etkisi yönünden incelendiğinde standart diyetle beslenen heterozigot farelerde serum rezistin seviyelerinde herhangi bir değişiklik görülmedi. Yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip ve heterozigot farelerin serum rezistin seviyeleri birbirine çok yakın bulunduğu için serum rezistine olan etkinin sadece diyet kaynaklı olduğu sonucuna varıldı.

Epididimal yağ dokusunda daha çok sentezlendiği bilinen rezistin ekspresyon seviyeleri bu dokuda kontrol grubuna göre diğer üç grupta anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$) (Bkz. Şekil 23). Çalışmamızda rezistin dolaşım seviyeleriyle yağ dokusu ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır. Yağ dokusunda rezistin gen ekspresyonunun BMI veya insülin direnci biyolojik belirteçleri ile ilişkisi açıkça doğrulanmamıştır. Çünkü dolaşımdaki rezistin, genetik ve diyetle indüklenen obez fare modellerinde yağlanmanın artmasıyla birlikte artarken, birçok çalışmada obezitede yağ dokusunda rezistin mRNA seviyesinin baskılandığı bulunmuştur (189, 190). Yapılan hayvan çalışmalarında yağ dokusunda rezistin mRNA düzeylerinin obez hayvanların yağ dokusunda baskılandığı ve dolaşımdaki insülin veya glukoz seviyeleri ile pozitif ilişkili olmadığını göstermektedir (191, 192). Le ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rezistin mRNA'sının obez farelerde baskılanmasına karşın, dolaşımdaki rezistin seviyesini önemli ölçüde artmış ve insülin, glukoz, lipitler ile çoğunlukla pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Farklı yağ miktarı içeren diyetle besledikleri (düşük yağlı %10, yüksek yağlı %45) C57BL/6J farelerin epididimal yağ dokusunda mRNA ekspresyonu diyet yağ oranı arttıkça baskılanırken, serum rezistin seviyelerinin belirgin şekilde yükseldiğini göstermişlerdir (193). Bu konuda Rajala ve arkadaşlarının

yaptıkları bir çalışmada 2 hafta boyunca hergün intraperitoneal leptin tedavisinin (2 mg/kg), *Lep ob/ob* farelerde rezistin mRNA ekspresyonunu, glukoz ve insüline paralel olarak azalttığı bulunmuştur (194). Bu çalışmadaki gibi bir mekanizmayla, gruplarımızda artan leptin seviyelerinin glukozu düşürme etkisinin rezistin baskılamasını içermesi de olasıdır. Ek olarak Fred ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 3T3-L1 hücrelerine insülin ilavesi ile rezistin mRNA seviyesinde önemli bir azalma gözlenmiştir (195). Gruplarımızda azalan ekspresyonlara artan insülin seviyelerinin de etki etmesi muhtemeldir. İnsülin duyarlılığını azaltan bu proteinin, BDNF'nin de katkıda bulunduğu kilo alımında epididimal yağ dokusundaki ekspresyonundaki azalmaların sebebini anlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmalarda bulunan ve bizim çalışmamızda da ortaya çıkan yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde yüksek serum rezistin düzeylerinin potansiyel sebepleri, serum faktörleri ile bağlanma ve/veya temizlenmesinin azalmış bir sonucu olarak protein yarı ömrünün uzatılmasıyla ilgili olabilir. Sonuçta protein seviyeleri ile mRNA ekspresyonları arasında tutarsızlıklar ortaya çıkabilir.

Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 hem t-PA hem de u-PA'nın birincil inhibitörüdür ve dolayısıyla fibrinolitik işlemi kısıtlar. Plazma PAI-1 seviyeleri yüksek yağlı diyetle beslenmede, obezitede artmaktadır. Hipertansiyon, glukoz intoleransı, insülin direnci, hiperinsülinemi, tip 2 diyabet ve antifibrinolitik özelliklerinden dolayı aterotromboz gelişme riski ile ilişkilendirilmiştir (196). Çalışmalarda tPA'nın silinmesinin depresyon ve anksiyete benzeri davranışlarla ilişkili olmasının mekanizmasının BDNF'yi içerdiği belirtilmektedir. PAI-1'nin yüksek seviyeleri, tPA/plazminojen sistemini inhibe edebilir. Bu da hücre dışında proBDNF'nin mBDNF'ye dönüşümünü sağlayan plazmin vasıtasıyla proBDNF'nin bölünmesini engelleyerek BDNF sinyalinin bozulmasına neden olabilir (197).

Çalışmamızda gruplar serum PAI-1 seviyeleri yönünden karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Bkz. Şekil 20). Mariana ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada C57BL/6J ırkı fareleri 10 hafta boyunca farklı yağ kaynakları kullanarak enerjinin % 60'ının yağlardan sağlandığı diyetlerle besledikleri deney hayvanlarının serum PAI-1 seviyelerinde kontrole göre değişiklik bulamamışlardır (156). Lin ve arkadaşları 14 hafta C57BL/6 farelerini kalorisinin %45'inin yağlardan sağlandığı diyetle beslediklerinde plazma PAI-1 seviyelerini yüksek

bulmuşlardır (198). Kim ve arkadaşları 12 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle (kalorinin % 60'ı yağdan) besledikleri erkek C57BL/6 farelerin serum total PAI-1 seviyelerini artan standart diyetle (kalorinin % 10 yağdan) beslenen grubuna göre TNF- α , IL-6 ile birlikte yüksek bulmuşlardır (188). Literatür incelendiğinde çoğunlukla serum PAI-1 seviyelerinin obeziteyle arttığı görülmektedir. Dolaşımda PAI-1 aktif, latent ve substrat olmak üzere 3 formda bulunmaktadır (107). Fark bulunan çalışmalarda genellikle total PAI-1 veya dolaşımda daha çok bulunan substrat hali ölçülmüştür. Bizim çalışmada kullandığımız kit ile aktif formunu ölçtük. Fark bulamamamızın bir sebebi de bu olabilir. Ek olarak bizim çalışmamızda, PAI-1 ölçümünde kullandığımız kite uygun olarak serumlarda yaptığımız 20 katlık seyreltme sonucu elde ettiğimiz absorbanslar, kit duyarlılığından, alt sınır ölçüm limitinden çoğunlukla düşüktü. Serum PAI-1 seviyelerinde değişiklik bulamamızın sebebi ölçümünden dolayı oluşan sıkıntıdan da kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda subkutan ve epididimal yağ dokularında PAI-1 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Bkz. Şekil 24). Yapılan bir insan çalışmasında, şiddetli obezitede visceral ve subkutan yağ dokusunda PAI-1 mRNA ekspresyonu, BMI ile pozitif korelasyon göstermektedir (199). Piao ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 10 hafta süreyle kalorinin % 60'ının yağlardan kaynaklanan diyetle beslenen C57BL/6J farelerin epididimal yağ dokularında PAI-1 ekspresyonunun plazma değerleriyle birlikte arttığını bulmuşlardır (200). Erkek C57BL/6J *ob/ob* farelerde Samad ve arkadaşlarını yaptıkları bir çalışmada zayıf kontrollerle karşılaştırıldığında obez farelerin epididimal, subkutan yağ dokularında PAI-1 gen ifadesinin önemli ölçüde yükseldiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada obezitede PAI-1 mRNA'sında diğer major organlarda da genel bir artış olsa da, bu artışlar yağ dokularındaki artışlarla karşılaştırıldığında daha küçük bulunmuştur (201). Yağ dokusu artışında ortaya çıkan tümör nekroz faktör (TNF- α), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), oksidatif stresin yağ dokusunda PAI-1 ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir (202, 203). Sonuçlarımızda BDNF (+/-) grubun yüksek yağlı diyetle beslenen farelere yakın bir şekilde PAI-1 proteini ekspresyonu subkutan ve epididimal yağ dokularında indüklediği görülmektedir. PAI-1 artması obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların patolojisinde ortak bir etken olarak görüldüğünden, insülin direnci ile ilişkili hem metabolik değişiklikleri iyileştiren hem de PAI-1

düzeylerini düşüren tedavi seçenekleri, protrombotik ve proinflamatuvar durumları azaltabilir.

Genel olarak BDNF eksikliği durumunda ortaya çıkan beyin ve adipoz doku arasındaki yetersiz crosstalk mekanizmaları tip 2 diyabet gelişimine ve obezitenin komplikasyonlarının ilerlemesine yol açabileceği görülmektedir. Esas olarak merkezi sinir sisteminde etkisini göstererek enerji dengesini düzenleyen bu molekülün, adipoz dokudaki bazı etkilerinin ortaya koyulmasından sonra pankreas, karaciğer, kas dokusu gibi organlarda da incelenmesi metabolik etkilerinin büyük oranda anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda ölçtüğümüz adipokinlerin yağ dokusu yerleşimine bağlı olarak diyetten etkilendiğine ve sentezlerinin, salgılanmalarının BDNF proteini ile ilişkili olabileceği görüldü. Yüksek yağlı diyetle beslenen BDNF heterozigot farelerde ortaya çıkan sonuçlardan bu proteinin, adipokinlerin sentezlerini değiştirerek obeziteyle gelişen patolojik durumlara karşı obezitede koruyucu rol oynayabileceği kanaatine varıldı.

8. ÖNERİLER

1. BDNF'nin reseptörlerinin (TrkB, p75) dokularda incelenmesi ve olgun BDNF ile pro-BDNF miktarlarının ayrı ayrı değerlendirilmesi diyetle BDNF kaynaklı patolojilerin daha ayrıntılı incelenmesi bakımından yardımcı olacaktır.
2. Yüksek yağlı diyet indüklü obezite çalışmalarında obezitede artan ve BDNF dahil birçok molekülün sentezini düzenleyen inflamatuvar belirteçlerin araştırılması, ilişkilerin kurulması açısından daha faydalı olabilir.
3. İnsülin, glukoz metabolizması üzerine güçlü etkileri olduğu görülen BDNF'nin pankreas, karaciğer, iskelet kası gibi organlarda da incelenmesi, metabolik etkilerinin anlaşılmasını arttırabilir. Bu şekilde özellikle diyabet ile ilişkisinin ortaya koyularak bu hastalıktaki yerinin belirlenmesini sağlayabilir.
4. Geniş dağılım gösteren TrkB reseptörünün agonistleri kullanılarak yapılacak çalışmalar, BDNF'nin doz bağımlı sistemik etkilerinin ortaya koyulmasında ve tedavi etkinliklerinin araştırılmasında yardımcı olacaktır.
5. BDNF'nin sentezlendiği beyin ve birçok periferik dokuda ekspresyonuna bakılması, diyetin bu protein üzerine etkisinin incelenmesi, yüksek yağlı diyetle beslenen wild tip farelerdeki kilo alımına katkısının belirlenmesinde daha faydalı olabilir.
6. Farelere kontrollü yem verilmesiyle BDNF'nin besin alımından bağımsız etkilerinin incelenmesi sağlanabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Cordeira J, Rios M (2011). Weighing in the role of BDNF in the central control of eating Behavior. *Mol Neurobiol* 44(3): 441-448.
2. Lachak P, Hefti F (1992). BDNF and NGF treatment in lesioned rats: Effects on choline function and weight gain *NeuroReport* 3: 405-408.
3. Pellemounter MA, Cullen MJ, Wellman CL (1995). Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp Neurol* 131: 229-238.
4. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Embo J* 19: 1290-1300.
5. Bengi V, Riva MA, Cattaneo A (2016). Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 131: 123-138.
6. Blüher M, Mantzoros CS (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* 64(1): 131-45.
7. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *JAMA* 289:76-9.
8. Hariri N, Thibault L (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23: 270-299.
9. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT (2016). Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Invest* 26(1): 25-42.
10. Rothman SM, Griffioen KJ, Wan R, Mattson MP (2012). Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. *Ann NY Acad Sci* 1264: 49-63.
11. Purves D, Snider WD, Voyvodic JT (1998). Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 336: 123-128.
12. Chaldakov GN, Tonchev AB, Aloe L (2009). NGF and BDNF: from Nerves To Adipose Tissue, From Neurokines To Metabokines. *Riv Psichiatr* 44(2):79-87.
13. Reichardt LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545-1564.

14. Segal RA (2003). Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* 26: 299-330.
15. Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1: 549-553.
16. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85: 525-535.
17. Huang TL, Lee CT, Liu YL (2008). Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: Effects of antidepressants. *J Psychiatr Res* 42: 521-525.
18. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995). Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15: 1768-1777.
19. Vazquez-Sanroman D, Sanchis-Segura C, Toledo R, Hernandez ME, Manzo J, Mique M (2013). The effects of enriched environment on BDNF expression in the mouse cerebellum depending on the length of exposure. *Behav Brain Res* 243: 118-128.
20. Zoladz JA, Pilc A (2010). The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. *J Physiol Pharmacol* 61(5): 533-41.
21. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3: 1-14.
22. Cattaneo A, Cattane N, Begni V, Pariante CM, Riva MA (2016). The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 6: 1-10.
23. Marosi K, Mattson MP (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab* 25(2): 89-98.
24. Wurzelmann M, Romeika J, Sun D (2017). Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 12(1): 7-12.
25. Vanevski F, Xu B (2013). Molecular and neural bases underlying roles of BDNF in the control of body weight. *Front Neurosci* 7: 37-61.

26. Dechant G, Barde YA (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5: 1131-1136.
27. Binder DK, Scharfman HE (2004). Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 22(3): 123-131.
28. Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Graham SL (2013). TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders. *Int J Mol Sci* 14: 10122-10142.
29. Woo NH, Lu B (2009). BDNF in synaptic plasticity and memory. Elsevier Ltd. 135-143.
30. Rost B, Hanf G, Ohnemus U, Otto-Knapp R, Groneberg DA, Kunkel G, Noga O (2005). Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3. *Regul Pept* 124: 19-25.
31. Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Eur J Physiol* 469(5-6): 593-610.
32. Gibon J, Barker PA (2017). Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain. *The Neuroscientist* 1-18.
33. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110(2):167-73.
34. Binder DK (2004). The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Adv Exp Med Biol* 548: 34-56.
35. Nagahara AH, Tuszynski MH (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10: 209-219.
36. Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 15: 1748-1757.
37. Rosas-Vargas H, Martinez-Ezquerro JD, Bienvenu T (2011). Brain-Derived Neurotrophic Factor, Food Intake Regulation, and Obesity. *Arch Med Res* 42: 482-494.
38. Komori T, Morikawa Y, Nanjo K, Senba E (2006). Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience* 139: 1107-15

39. Wang C, Bomberg E, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM (2010). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Res* 1336: 66-77.
40. Wang C, Bomberg E, Levine A, Billington C, Kotz CM (2007). Brain-derived neurotrophic factor in the ventromedial nucleus of the hypothalamus reduces energy intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(3): 1037-45.
41. Bariohay B, Roux J, Tardivel C, Trouslard J, Jean A, Lebrun B (2009). Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor type B signaling is a downstream effector of the brainstem melanocortin system in food intake control. *Endocrinology* 150: 2646-2653.
42. Liu X, Zhu Z, Kalyani M, Janik JM, Shi H (2014). Effects of energy status and diet on Bdnf expression in the ventromedial hypothalamus of male and female rats. *Physiol Behav* 130: 99-107.
43. Bariohay B, Lebrun B, Moyse E, Jean A (2005). Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology* 146(12): 5612-20.
44. Xu B, Goulding EH, Zang K (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736-42.
45. Xu B, Xie X (2016). Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neurosci* 17(5): 282-92.
46. Gelfoa F, Bartoloa PD, Tirassa P, Crocea N, Caltagironea C, Petrosini L, Angelucci F (2011). Intraperitoneal injection of neuropeptide Y (NPY) alters neurotrophin rat hypothalamic levels: Implications for NPY potential role in stress-related disorders. *Peptides* 32: 1320-1323.
47. Tsuchida A, Nonomura T, Ono-Kishino M, Nakagawa T, Taiji M, Noguchi H (2001). Acute effects of brain-derived neurotrophic factor on energy expenditure in obese diabetic mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(9): 1286-93.
48. Cao L, Choi EY, Liu X, Martin A, Wang C, Xu X, Durrant MJ (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab* 14(3): 324-38.
49. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Fujiwara K, Shimasaki T, Mitsutomi K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H (2013). Hypothalamic brain-

- derived neurotrophic factor regulates glucagon secretion mediated by pancreatic efferent nerves. *J Neuroendocrinol* 25(3): 302-11.
50. Nakagawa T, Ono-Kishino M, Sugaru E (2002). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 185-191.
 51. Nonomura T, Tsuchida A, Ono-Kishino M, Nakagawa T, Taiji M, Noguchi H (2001). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy expenditure through the central nervous system in obese diabetic mice. *Int J Exp Diabetes Res* 2: 201-209.
 52. Yamanaka M, Tsuchida A, Nakagawa T, Nonomura T, Ono-Kishino M, Sugaru E, Noguchi H, Taiji M (2007). Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* 9(1): 59-64.
 53. Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerstrom T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52(7): 1409-18.
 54. Markham A, Cameron I, Bains R, Franklin P, Kiss JP, Schwendimann L, Gressens P, Spedding M (2012). Brain-derived neurotrophic factor-mediated effects on mitochondrial respiratory coupling and neuroprotection share the same molecular signalling pathways. *Eur J Neurosci* 35(3): 366-74.
 55. Duan W, Guo Z, Jiang H (2003). Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain derived neurotrophic factor. *Endocrinol* 144: 2446-2453.
 56. Ying Z, Covalin A, Judy J (2012). Hypothalamic stimulation enhances hippocampal BDNF plasticity in proportion to metabolic rate. *Brain Stimul* 5(4): 642-646.
 57. Chaldakov GN, Tonchev AB, Manni L, Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R (2007). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 431-438.

58. Shimizu E, Hashimoto K, Iyo M (2004). Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 126(1): 122-3.
59. Banni S, Carta G, Murru E, Cordeddu L, Giordano E, Marrosu F, Puligheddu M, Floris G, Asuni GP, Cappai AL, Deriu S, Follesa P (2012). Vagus nerve stimulation reduces body weight and fat mass in rats. *PLoS One* 7(9): e44813.
60. Rendeiro C, Vauzour D, Rattray M, Waffo-Tégou P, Mérillon JM, Butler LT, Williams CM, Spencer JP (2013). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PLoS One* 8(5): e63535.
61. Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW, Tweedie D, Perry T, Mattson MP, Kapogiannis D, Sambamurti K, Lahiri DK, Greig NH (2010). GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19(4): 1205-19.
62. Frühbeck G (2008). Adipose Tissue Protocols. Overview of Adipose Tissue and Its Role in Obesity and Metabolic Disorders. *Methods Mol Biol* 456:1-22.
63. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 2: 191-200.
64. Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39(8): 715-728.
65. Jacobi D, Stanya K, Lee CH (2012). Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity. *Adipocyte* 1(1): 4-12.
66. Kwok K, Lam KSL, Xu A (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* 48: e215.
67. Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11(1): 11-8.
68. Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard JP (2008). Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 34 2-11.
69. Karastergiou K, Mohamed-Ali V (2010). The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol* 318: 69-78.

70. Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW (2005). Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand* 183: 13-30.
71. Blüher M (2009). Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117: 241-250.
72. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ (2010). The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 323: 20-34.
73. Töre F, Tonchev AB, Fiore M, Tunçel N, Atanassova P, Aloe L, Chaldakov GN (2007). From Adipose Tissue Protein Secretion to Adipopharmacology of Disease. *Immun Endoc & Metab Agents in Med Chem* 7: 149-155.
74. Harwood HJ (2012). The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 63: 57-75.
75. Blüher M (2012). Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J* 36: 317-27.
76. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Salvador J, Fruhbeck G (2009). Adipokines in the treatment of diabetes mellitus and obesity. *Expert Opin Pharmacother* 10: 239-54.
77. Luo L, Liu M (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol* 231: 77-99.
78. Sahin-Efe A, Katsikeris F, Mantzoros CS (2012). Advances in adipokines. *Metabolism* 61: 1659-65.
79. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
80. Flier JS (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116: 337-350.
81. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6231-6235.
82. Matsuzawa Y (2006). The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Letters* 580: 2917-21.
83. Unger RH, Zhou YT, Orci L (1999). Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *PNAS* 96: 2327-2332.

84. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8(1): 21-34.
85. Long YC, Zierath JR (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116: 1776-1783.
86. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS (2016). Leptin and Hormones Energy Homeostasis. *Endocrinol Metab Clin N Am* 45: 633-645.
87. Rios M (2013). BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci* 36: 83-90.
88. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110: 1093-103.
89. Meier U, Gressner AM (2004). Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Chemical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin Chem* 50(9): 1511-25.
90. Farooqi IS, O'Rahilly S (2014). 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol* 223(1):T63-70
91. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70: 537-56.
92. Shimizu H, Oh IS, Okada S, Mori M (2007). Leptin resistance and obesity. *Endocr J* 54: 17-26.
93. Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B (2012). The role of adipokines in connective tissue diseases. *Eur J Nutr* 51: 513-528.
94. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A (2013). Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta* 417: 80–84.
95. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MRS, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2005-2010.
96. Leal VO, Mafra D (2013). Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta* 419: 87-94.
97. Kadowaki T, Yamauchi T (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26: 439-451.

98. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-953.
99. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769.
100. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11(2): 85-97.
101. Falcao-Pires I, Castro-Chaves P, Miranda-Silva D, Lourenco AP, Leite-Moreira AF (2012). Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug Discov Today* 17:(15/16) 880-9.
102. Golden E, Emiliano A., Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, Egan JM, Driscoll I, Ferrucci L, Martin B, Mattson MP (2010). Circulating Brain-Derived Neurotrophic Factor and Indices of Metabolic and Cardiovascular Health: Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *PLoS One* 5(4): e10099.
103. Kusminski CM, McTernan, PG, Schraw T (2007). Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid: distinct complex distribution from serum. *Diabetologia* 50: 634-642.
104. Banerjee RR, Lazar MA (2003). Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med (Berl)* 81: 218-226.
105. Sheng CH, Di J, Jin Y, Zhang YC, Wu M, Sun Y (2008). Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocrine* 33: 135-143.
106. Piestrzeniewicz K, Luczak K, Komorowski J, Maciejewski M, Jankiewicz Wika J, Goch JH (2008). Resistin increases with obesity and atherosclerotic risk factors in patients with myocardial infarction. *Metabolism* 57: 488-493.
107. Declerck PJ, De Mol M, Vaughan DE, Collen D (1992). Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem Jun* 15;267(17):11693-6.

- 108.** Ma LJ, Mao SL, Taylor KL, Kanjanabuch T, Guan Y, Zhang Y (2004). Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor-1. *Diabetes* 53: 336-46.
- 109.** Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2003). Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111: 225-30.
- 110.** World Health Organization (2017). Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>
- 111.** Gesta S, Tseng YH, Kahn CR, (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256.
- 112.** Singla P, Bardoloi A, Parkash AA (2010). Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes* 1(3): 76-88.
- 113.** Gregor MF, Hotamisligil GS (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29: 415-445.
- 114.** Wronska A, Kmiec Z (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol* 205: 194-208.
- 115.** Jung U, Choi MS (2014). Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 15: 6184-6223.
- 116.** Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 54: 1847-1856.
- 117.** Sethi JK, Vidal-Puig AJ (2007). Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48: 1253-1262.
- 118.** Stupin JH, Arabin B (2014). Overweight and Obesity before, during and after Pregnancy: Part 2 Evidence based Risk Factors and Interventions. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 74(7): 639-645.
- 119.** Bluher M (2005). Transgenic animal models for the study of adipose tissue biology. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 605-623.
- 120.** Valet P, Tavernier G, Castan-Laurell I, Saulnier-Blache JS, Langin D (2002). Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J Lipid Res* 43: 835-860.

121. Thomas A, Lutz, Stephen C. Woods (2012). Overview of Animal Models of Obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. Chapter: Unit5.61.
122. Wang CY, Liao JK (2012). A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Methods Mol Biol* 821: 421-433.
123. Jequier E (2002). Pathways to obesity. *Int J Obes* 26: 12-17.
124. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT (2000). Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr* 130: 284-288.
125. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44(5): 645-51.
126. Rebuffe-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J (1993). Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 42: 1405–1409.
127. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, Van HM, Hwa JJ (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res* 10: 956-963.
128. Inui A (2003). Obesity a chronic health problem in cloned mice? *Trends Pharmacol Sci* 24: 77-80.
129. Nishina PM, Verstuyft J, Paigen B (1990). Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res* 31: 859-869.
130. Kasim-Karakas SE, Vriend H, Almario R, Chow LC, Goodman MN (1996). Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med* 128: 208-213.
131. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain- derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8856-60.
132. Yang K (2008). Adipose tissue protocols. İkinci baskı. Humana Press, 999 Riverview Drive, Suite 208, Totowa, NJ 07512 USA; 259-263.
133. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25:402-408.

134. Garg MK, Dutta MK, Mahalle N (2011). Study of beta-cell function (by HOMA model) in metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab* 15:44-49.
135. Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, Keogh JM, Yanovski JA, El Gharbawy A, Han JC, Tung YC, Hodges JR, Raymond FL, O'rahilly S, Farooqi IS (2006). Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 55(12):3366-71.
136. Roh E, Kim MS (2016). Brain Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol Metab* 31(4): 519-524.
137. Fryer RM, Randall J, Yoshida T, Hsiao LL, Blumenstock J, Jensen KE, Dimofte T, Jensen RV, Gullans SR (2002). Global analysis of gene expression: Methods, interpretation, and pitfalls. *Experimental Nephrology* 10: 64-74.
138. Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:45.
139. Uddin JM, Cinar UM, Tesfaye D, Looft C, Tholen E, Schellander K (2011). Age-related changes in relative expression stability of commonly used housekeeping genes in selected porcine tissues. *BMC Res Notes* 4 (441).
140. Obesity, adipokines and neuroinflammation. Aguilar-Valles A, Inoue W, Rummel C, Luheshi GN (2015). *Neuropharmacology* 96:124-134
141. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15: 798-808.
142. Boger HA, Mannangatti P, Samuvel DJ, Saylor AJ, Bender TS, McGinty JF, Fortress AM, Zaman V, Huang P, Middaugh LD, Randall PK, Jayanthi LD, Rohrer B, Helke KL, Granholm AC, Ramamoorthy S (2011). Effects of brain-derived neurotrophic factor on dopaminergic function and motor behavior during aging. *Genes Brain Behav* 10(2):186-98.
143. Cordeira JW, Frank L, Sena-Esteves M, Pothos EN, Rios M (2010). Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. *J Neurosci* 30(7): 2533-2541.

144. Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng XX, Tong KY (2011). The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS One* 6(2):e16643.
145. Yamada-Goto N, Katsuura G, Ochi Y, Ebihara K, Kusakabe T, Hosoda K, Nakao K (2012). Impairment of Fear-Conditioning Responses and Changes of Brain Neurotrophic Factors in Diet-Induced Obese Mice. *J Neuroendocrinol* 24:1120-1125.
146. Yoshida T, Ishikawa M, Iyo M, Hashimoto K (2012). Serum Levels of Mature Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Its Precursor proBDNF in Healthy Subjects. *The Open Clinical Chemistry Journal* 5:7-12.
147. Bathina S, Undurti N (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci* 6: 1164–1178.
148. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. (2010). A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 46:212-223.
149. Boyuk B, Degirmencioglu Atalay H, Guzel S, Acar A, Celebi A, Ekizoglu I, Simsek C (2014). Relationship between Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Metabolic Parameters in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 978143.
150. Teillon S, Calderon GA, Rios M (2010). Diminished diet-induced hyperglycemia and dyslipidemia and enhanced expression of PPARα and FGF21 in mice with hepatic ablation of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Endocrinology* 205:37-47.
151. Serra-Millàs M (2016). Are the changes in the peripheral brain-derived neurotrophic factor levels due to platelet activation? *World J Psychiatry* 6(1): 84-101.
152. Jo YH, Chua SC (2013). The Brain–Liver Connection Between BDNF and Glucose Control. *Diabetes* 62(5):1367-1368.
153. Meek TH, Wisse BE, Thaler JP, Guyenet SJ, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ Jr, Schwartz MW, Morton GJ (2013). BDNF action in the brain attenuates

diabetic hyperglycemia via insulin-independent inhibition of hepatic glucose production. *Diabetes* 62(5):1512-8.

154. Yamanaka M, Itakura Y, Ono-Kishino M, Tsuchida A, Nakagawa T, Taiji M (2008). Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor ameliorates glucose metabolism in obese diabetic mice. *J Biosci Bioeng* 105(4):395-402.
155. Allarda JS, Perez EJ, Fukui K, Carpenter P, Ingram DK (2016). Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research* 301:1-9.
156. Catta-Preta M, Martins MA, Marlowe T, Brunini C, Mendes-Ribeiro AC (2012). Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition* 28 212-219.
157. Rask-Madsen C, Kahn CR (2012). Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(9):2052-9.
158. Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, Baur LA (1993). High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Ann N Y Acad Sci* 683:82-90.
159. Ghibaudi L, Cook J, Farley C (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. *Obes Res* 10:956-963.
160. Tsuchida A, Nakagawa T, Itakura Y, Ichihara J, Ogawa W, Kasuga M, Taiji M, Noguchi H (2001). The effects of brain-derived neurotrophic factor on insulin signal transduction in the liver of diabetic mice. *Diabetologia* 44(5):555-66.
161. Zeyda M, Stulnig TM (2009). Obesity, inflammation, and insulin resistance a minireview. *Gerontology* 55:379-386.
162. Ferranti S, Mozaffarian D (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54:945-955.
163. Furuhashi M, Fucho R, Görgün ZC (2008). Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest.* 118:2640-50.

- 164.** Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Andrikopoulos S, Proietto J, Thorburn AW (2007). Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab* 9:840-852.
- 165.** Wang H, Storlien LH & Huang XF (2002). Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and Arc leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E1352-E1359.
- 166.** Hoevenaars FP, Keijer J, Swarts HJ, Snaas-Alders S, Bekkenkamp-Grovenstein M, van Schothorst EM. (2013). Effects of dietary history on energy metabolism and physiological parameters in C57BL/6J mice. *Exp Physiol* 98(5):1053-62.
- 167.** Guzmán-Ruiza R, Stucchi P, Ramos MP, Sevillanoc J, Somozaa B, Fernández-Alfonso M, Ruiz-Gayo M (2012). Leptin drives fat distribution during diet-induced obesity in mice. *Endocrinol Nutr* 59(6):354-361.
- 168.** Leal VO, Mafra D (2013). Adipokines in obesity. *Clinica Chimica Acta* 419 87-94.
- 169.** Russell CD, Ricci MR, Brolin RE, Magill E, Fried SK (2001). Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E399-E404.
- 170.** Gollisch SC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF (2009). Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(2):E495-504.
- 171.** Sims EK, Hatanaka M, Morris DL, Tersey SA, Kono T, Chaudry ZZ, Day KH, Moss DR, Stull ND, Mirmira RG, Evans-Molina C (2013). Divergent compensatory responses to high-fat diet between C57BL6/J and C57BLKS/J inbred mouse strains. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(12):E1495-511.
- 172.** Bulló M, García-Lorda P, Peinado-Onsurbe J, Hernández M, Del Castillo D, Argilés JM, Salas-Salvadó J (2002). TNF- α expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(5):652-8.
- 173.** Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang CF (2011). The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R1053-R1069.

174. Cao L, Liu X, Lin D, Wang C, Choi EY, Riban V, Lin B, Matthew J (2010). Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell* 9;142(1): 52-64.
175. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7(8):941-6.
176. Blüher M (2014). Adipokines-removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab* 3:230-240.
177. Chaolu H, Asakawa A, Ushikai M, Li YX, Cheng KC, Li JB, Zoshiki T, Terashi M (2011). Effect of exercise and high-fat diet on plasma adiponectin and nesfatin levels in mice. *Exp Ther Med* 2(2): 369–373.
178. Altomonte J, Harbaran S, Richter A, Dong H (2003). Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats. *Metabolism* 52:958-963.
179. Cote M, Mauriege P, Bergeron J, Almeras N, Tremblay A, Lemieux I, Despres JP (2005). Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1434-9.
180. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y (2012). Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie* 94:2137-2142.
181. Brunn JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue derived cytokines:in vivo anin vitro investigations in human. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527-E533.
182. Tan JT, McLennan SV, Williams PF, Rezaeizadeh A, Lo LW, Bonner JG, Twigg SM. (2013). Connective tissue growth factor/CCN-2 is upregulated in epididymal and subcutaneous fat depots in a dietary-induced obesity model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304(12):E1291-302.
183. Barnea M, Shamay A, Stark AH, Madar Z (2006). Animal Physiology A High-Fat Diet Has a Tissue-Specific Effect on Adiponectin and Related Enzyme Expression. *Obesity (Silver Spring)* 14(12):2145-53.

184. López Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, López-López C, Martínez-Ortega J, Gómez-Rodríguez A, Triana-Cubillos S (2014). The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm Mol Biol Clin Invest* 18(1): 37-45.
185. Finucane FM, Luan J, Wareham NJ, Sharp SJ, Rahilly SO, Balkau B, Flyvbjerg A, Walker M (2009). Correlation of the leptin: adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia* 52(11): 2345-2349.
186. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S (2005). Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 109(3):243-56.
187. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 18;409(6818):307-12.
188. Kim D, Lee JE, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Park SK, Kim SH, Park BH, Kim W, Kang KP (2013). Metformin decreases high-fat diet-induced renal injury by regulating the expression of adipokines and the renal AMP-activated protein kinase/acetyl-CoA carboxylase pathway in mice. *Int J Mol Med* 32(6):1293-302.
189. Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS (2001). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276:25651-3.
190. Rajala MW, Lin Y, Ranalletta M, Yang XM, Qian H, Gingerich R, Barzilai N, Scherer PE (2002). Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule-alpha in adipose tissue. *Mol Endocrinol* 16:1920-30.
191. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G & Vettor R (2002). Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obesity Research* 10:1095-1103.
192. Lee JH, Bullen JW Jr, Stoyneva VL, Mantzoros CS (2005). Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E625-E632.

193. Le Lay S, Boucher J, Rey A (2001). Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 289:564-7.
194. Rajala MW, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS. (2004). Regulation of Resistin Expression and Circulating Levels in Obesity, Diabetes, and Fasting. *Diabetes* 53(7):1671-9.
195. Haugen F, Örgensen AJ, Drevon CA, Trayhurn P (2001). Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* 507:105-108.
196. Lijnen HR, Alessi MC, Van Hoef B, Collen D, Juhan-Vague I (2005). On The Role Of Plasminogen Activator Inhibitor-1 In Adipose Tissue Development And Insulin Resistance in Mice. *J Thromb Haemost* 3(6):1174-9.
197. Jiang H, Li X, Chen S, Lu N, Yue Y, Liang J, Zhang Z, Yuan Y (2016). Plasminogen Activator Inhibitor-1 in depression: Results from Animal and Clinical Studies. *Sci Rep* 6:30464.
198. Yan L, Graef GL, Claycombe KJ, Johnson LK (2013). Effects of Voluntary Running and Soy Supplementation on Diet Induced Metabolic Disturbance and Inflammation in Mice. *J Agric Food Chem* 61:9373-9379.
199. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, Geel O, Juhan-Vague I (2000). Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 49: 1374-1380.
200. Piao L, Jung I, Huh JY, Miyata T, Ha H (2016). A novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor, TM5441, protects against high-fat diet-induced obesity and adipocyte injury in mice. *Br J Pharmacol* 173(17):2622-32.
201. Samad F, Loskutoff DJ (1996). Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol Med* 2:568–582.
202. Loskutoff DJ, Samad F (1998). The Adipocyte and Hemostatic Balance in Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(1):1-6.
203. Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I (2007). Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 18:240-245.

10. EKLER

(EK 1)

Ek 2. Çalışmada kullanılan D12550J kodlu standart diyetin içeriği

D12550J kodlu standart diyetin içeriği	% g	% kcal
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam		100
kcal / gr	3.83	

Bileşenler	g	kcal
Kazein	200	800
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	506.2	2024.8
Maltodeksrin 10	125	500
Sukroz	68.8	275
Selüloz, BW200	50	0
Soya fasülyesi yağı	25	225
Hayvansal yağ	20	180
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (1.H ₂ O)	16.5	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
FD&C Sarı gıda boyası #5	0.04	0
FD&C Kırmızı gıda boyası #40	0	0
FD&C Mavi gıda boyası #1	0.01	0
TOPLAM	1055.05	4057

(EK 2)

Ek 2. Çalışmada kullanılan D12492 kodlu yüksek yağlı diyetin içeriği

D12492 kodlu yüksek yağlı diyetin içeriği	% g	% kcal
Protein	26	20
Karbohidrat	26	20
Yağ	35	60
Toplam		100
kcal / gr	5.24	

Bileşenler	g	kcal
Kazein	200	800
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	0	0
Maltodeksrin 10	125	500
Sukroz	68.8	275
Selüloz, BW200	50	0
Soya fasülyesi yağı	25	225
Hayvansal yağ	245	2205
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (1.H ₂ O)	16.5	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
FD&C Sarı gıda boyası #5	0	0
FD&C Kırmızı gıda boyası #40	0.025	0
FD&C Mavi gıda boyası #1	0.025	0
TOPLAM	1055.05	4057

11. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ**

Çalışmanın Adı : "BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör)'nin, Yağ, Dokusunda Diyetle Bağlı Adipokin Salgılanması ve Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi"
Çalışmacılar : Doç.Dr.Ahmet ALVER, Y.Doç.Dr.İsmail ABİDİN, Doç.Dr.Sinan CANPOLAT, Doç.Dr.Ersan KALAY, Arş.Gör.Cemil KAHRAMAN, Doktora Öğr.İmran İNCE, Doktora Öğr.Akın BODUR
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya ABD.

Etik Kurul
Dosya No
2013/ 6

Etik Kurul
Toplantı Tarihi
12.02.2013

Etik Kurul
Toplantı No
2013/03

Etik Kurul
Karar No
5

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında; "BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör)'nin, Yağ, Dokusunda Diyetle Bağlı Adipokin Salgılanması ve Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi" başlığını taşıyan çalışmasını, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütilebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (12.02.2013)

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

12. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	İmran İNCE
Doğum Tarihi/Yeri	11.03.1988/TRABZON
E-posta	narmince@hotmail.com
Adres	KTÜ SABE, Tıbbi Biyokimya AD, Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Fakülte/Bölüm	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Fakültesi/Kimya	Atatürk Üniversitesi	2005-2009
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2009-2012
Doktora	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2012-2017

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR/BİLDİRİLER

Yüksek Lisans Tezi:

Kronik Apelin Uygulamasının Karaciğer Antioksidan Enzimleri (CAT, SOD, GSH-Px) Üzerine Etkisinin İncelenmesi (2012). Danışman: Prof. Dr. Ahmet ALVER

Makaleler

1-Bodur A, Alver A, Kahraman C, Altay DU, **Ince I** (2016). Investigation of N-acetylcysteine on contralateral testis tissue injury by experimental testicular torsion: long-term effect. Am J Emerg Med 34 (6): 1069-74.

2-Altay UD, Keha EE, Ozer YS, **Ince I**, Alver A, Erdogan B, Canpolat S, Cobanoglu U, Mentese A (2016). Investigation of the expression of irisin and some cachectic factors in mice with experimentally induced gastric cancer. QJM 109 (12): 785-790.

3-Hacioglu G, Senturk A, Ince I, Alver A (2016). Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model. *Iran J Basic Med Sci* 19 (4): 388-93.

4-Birincioğlu İ, Akbaba M, Alver A, Kul S, Özer E, Turan N, Şentürk A, İnce İ (2016). Determination of skin wound age by using cytokines as potential markers. *J Forensic Leg Med* 44: 14-19.

5-Arslan FC, Tiryaki A, Yıldırım M, Özkorumak E, Alver A, Altun İK, İnce İ, Gedikli Ö (2016). The effects of edaravone in ketamine-induced model of mania in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 76(3): 192-8.

6-Iskender H, Dokumacioglu E, Sen TM, Ince I, Kanbay Y, Saral S (2017). The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF-κB and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. *Biomed Pharmacother* 90: 500-508.

Bildiriler

1-İnce İ., Alver A., Canpolat S., Saral S., Kahraman C., Kronik Apelin Uygulamasının Karaciğer Antioksidan enzimleri üzerine etkisinin incelenmesi, 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, KONYA, 2012.

2-Kahraman C., Saral S., İnce İ., Bodur A., Canpolat S., Alver A., Ratlarda Kronik Apelin Uygulamasının Serum Melatonin Seviyesine Etkisi, 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 2012.

3-Kahraman C.,Alver A., İnce İ. Diyetle İndüklenmiş Obezitede N-asetilsistein Uygulamasının Leptin Sentezi ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi. 25.Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, 2013.

4-M. Malkoc, D. Us Altay , S. Ozer Yaman, I. Ince, A. Alver. The effects of royal jelly on the antioxidant parameters in the breast tissues of the rats with breast carcinoma treated with paclitaxel or not. *The FEBS Journal, Turkey, 2016*

5-I. Ince , A. Bodur , I. Abidin , A. Alver. Effect of high fat diet on liver oxidative stress parameters in BDNF heterozygous mice. *The FEBS Journal, Turkey, 2016*

6-A. Bodur1 , I. Ince , I. Abidin , A. Alver. Investigation of some oxidative stress parameters in Bdnf heterozygous mice liver tissue. *The FEBS Journal, Turkey, 2016*