



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RETROPERİTONEAL YAĞ DOKUSU
DENERVASYONUNU TAKİBEN DİYETLE
OBEZ YAPILMIŞ SIÇANLARDA
ADİPONEKTİN GEN EKSPRESYONU VE
SERUM SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

Neslihan SAĞLAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2016

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim DalıYüksek Lisans öğrencisi Neslihan SAĞLAM' ın hazırladığı “**Retroperitoneal Yağ Dokusu Denervasyonundan Sonra Diyetle Obez Yapılmış Ratlarda Adiponektin Gen Ekspresyonu ve Serum Seviyelerinin İncelenmesi** ” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim -Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ahmet ALVER

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Cihangir EREM

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Tarih:/.../201...

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

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tez çalışmam süresince her aşamada göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e,

Yüksek Lisans eğitimimde büyük emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül V. KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN'a,

Çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Cemil KAHRAMAN'a, Dr. Ayşe ŞENTÜRK'e, Dr. Diler US ALTAY'a, Dr. Öğr. İmran İNCE'ye ve Taghi AHMADİ RENDİ'ye

Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Tüm aşamalarda varlıklarını hissettiğim her daima yanımda olan sevgili aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Neslihan SAĞLAM

Bu tez çalışması "Retroperitoneal Yağ Dokusu Denerve Edilmiş Sıçanlarda Retroperitoneal ve Epididimal Yağ Dokularından Salgılanan Adipokin Profillerinin İncelenmesi" başlıklı, 114S147 kodlu proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Yağ Dokusu	5
4.1.1. Beyaz Yağ Dokusunun Fonksiyonları	6
4.2. Yağ Dokusu ve Sinir Sistemi	7
4.2.1. Yağ Dokusu İnervasyonu ve Denervasyonu	9
4.2.2. Otonom Sinir Sisteminin Beyaz Yağ Dokusunun Salgıları Üzerine Etkisi	11
4.3. Obezite ve Metabolik etkileri	12
4.3.1. Obezite ve Metabolik Hastalıklarda Adipokinlerin Rolü	12
4.4. Adiponektin	13
4.4.1. Adiponektinin Yapısı ve Etki Mekanizması	14
4.4.2. Adiponektinin Reseptörleri	16
4.4.3. Adiponektinin Salgılanması	17
5. GEREÇ ve YÖNTEM	19
5.1. Gereç	19
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
5.1.2. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	20
5.1.3. Kullanılan Hayvanlar	20
5.1.4. Kullanılan Ticari Kitler	21
5.2. Yöntem	21
5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	21

5.3. Serumda Glukoz ve Trigliserit Ölçümü	23
5.4.Serumda Adiponektin Ölçümü	23
5.5.Serumda İnsülin Ölçümü	23
5.6.Dokuda Norepinefrin (NE) Ölçümü	24
5.6.1. Norepinefrin Ölçümünde Kullanılan PBS Çözeltilisinin Hazırlanması	24
5.6.2.Homojenizasyon Aşaması	24
5.7. Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu	25
5.8. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	26
5.9. RT- PCR	27
5.9.1. Real Time PCR Protokolü	29
5.10. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	30
6. BULGULAR	31
6.1. Morfolojik Bulgular	31
6.2. Çalışma Gruplarının Kilo Artışı ve Son Ağırlık Ölçümü Sonuçları	31
6.3. Serum Glukoz, TG ve İnsülin Ölçümü Sonuçları	32
6.4. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Norepinefrin Ölçümü Sonuçları	32
6.5. Retroperitoneal Yağ Dokusunun Ağırlık Ölçümü Sonuçları	33
6.6. Serum Adiponektin Ölçümü Sonuçları	35
6.7. Retroperitoneal ve Epididimal Yağ Dokularında Gen Ekspresyon Sonuçları	35
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
8. KAYNAKLAR	41
9. ETİK KURUL ONAYI	50
10. ÖZGEÇMİŞ	51

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	19
Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler	20
Tablo 3. Kullanılan kitler ve üretici firmalar	21
Tablo 4. Yüksek yağ içerikli sıçan yeminin içeriği	22
Tablo 5. Standart sıçan yeminin içeriği	22
Tablo 6. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	27
Tablo 7. Örneklerin RT-PCR için hazırlanması	28
Tablo 8. RT-PCR Protokolü	28
Tablo 9. Deney grupların kilo artışı ve son ağırlık sonuçları	32
Tablo 10. Deney gruplarının serum glukoz, TG ve insülin sonuçları	32
Tablo 11. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokusu NE sonuçları	33
Tablo 12. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokularının ağırlık sonuçları	33
Tablo 13. Deney gruplarının adiponektin /vücut ağırlığı sonuçları	35
Tablo 14. Deney gruplarının retroperitoneal ve epididimal gen ekspresyon sonuçları	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Beyaz yağ dokusu ve beyin arasındaki sinirsel ilişki	8
Şekil 2.	Adiponektinin periferik dokularda insülin duyarlılığı ve metabolizma üzerindeki temel mekanizması	14
Şekil 3.	Adiponektin sentezi ve etkileşimleri	15
Şekil 4.	Adiponektin standart grafiği	23
Şekil 5.	İnsülin standart grafiği	24
Şekil 6.	Norepinefrin standart grafiği	25
Şekil 7.	Adiponektin için erime noktası grafiği	29
Şekil 8.	Amplifikasyon eğrileri	30
Şekil 9.	Beslenme programı başlangıcında denerve edilmeyen sinir lifleri	31
Şekil 10.	Denerve olmuş sinir lifi	31
Şekil 11.	Deney grupların adiponektin ölçümü sonuçları	34

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

WAT	Beyaz Yağ Dokusu
BAT	Kahverengi Yağ Dokusu
TG	Trigliserit
SNS	Sempatik Sinir Sistemi
PNS	Parasempatik Sinir Sistemi
HSL	Hormon Duyarlı Lipaz
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa
IL-6	İnterlökin-6
NE	Norepinefrin
AMPK	5' Adenozin Monofosfat-Aktive Edilmiş Protein Kinaz
CRP	C-Reaktif Protein
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
APPL1	Adaptor Protein, Phosphotyrosine İnteraction, PH Domain And Leucine Zipper Containing 1
PPAR-α	Peroksizom Proliferatör Aktive Edilmiş Reseptör Alfa
PKA	Protein Kinaz A
BKİ	Beden Kitle İndeksi
ACC	Asetil-CoA Karboksilaz
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
DEPC	Dietil Pirokarbonat
cDNA	Komplementer DNA
YD+	Retroperitonel Yağ Dokusu İki Taraflı Denervasyon Yapılan ve Yüksek Yağlı Yem ile Beslenen Grup
YD-	Denervasyon Yapılmayan ve Yüksek Yağlı Yem ile Beslenen Grup
SD+	Retroperitonel Yağ Dokusu İki Taraflı Denervasyon Yapılan ve Standart Yem ile Beslenen Grup
SD-	Denervasyon Yapılmayan ve Standart Yem ile Beslenen Grup

ÖZET

Retroperitoneal Yağ Dokusu Denervasyonunu Takiben Diyetle Obez Yapılmış Sıçanlarda Adiponektin Gen Ekspresyonu ve Serum Seviyelerinin İncelenmesi

Adiponektin başlıca beyaz yağ dokusu hücrelerinde sentezlenen ve antidiyabetik, antiaterojenik ve antiinflamatuvar etkiler gösteren bir adipokindir. Yağ dokusunun metabolik ve sekreatuar özellikleri birçok faktörün yanı sıra sempatik sinir sistemi tarafından da düzenlenir. Çalışmamızda, yüksek yağlı ve standart diyetle beslenen sıçanlarda iki taraflı retroperitoneal yağ dokusu denervasyonunun, retroperitoneal ve epididimal yağ dokusunda adiponektin ekspresyonuna ve serum adiponektin konsantrasyonuna etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, her bir grupta 8 adet 100-150 g ağırlığında ve 3-5 haftalık Sprague Dawley ırkı sıçan bulunan 4 grup oluşturuldu: I. Grup: Retroperitoneal yağ dokusu iki taraflı denervasyon yapıldı ve yüksek yağlı yem ile beslendi (YD+), II. Grup: Denervasyon yapılmadı ve yüksek yağlı yem ile beslendi (YD-), III. Grup: Retroperitoneal yağ dokusu iki taraflı denervasyon yapıldı ve standart yem ile beslendi (SD+), IV. Grup: Denervasyon yapılmadı ve standart yem ile beslendi (SD-) ve kontrol grubu olarak kabul edildi. 10 haftalık diyet programı sonunda sıçanlardan serum ve doku numuneleri toplandı. Serum numunelerinde glukoz, trigliserit, insülin ve adiponektin seviyeleri ölçüldü. Retroperitoneal ve epididimal yağ dokusunda adiponektin mRNA seviyesi RT-PCR ile belirlendi. YD+ grubun serum adiponektin seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlendi ($p=0.010$). Retroperitoneal yağ dokusundaki adiponektin gen ekspresyonunun ölçümü sonucunda, YD+ grubunda adiponektin seviyesi yüksek bulundu ($p=0.023$). Epididimal yağ dokusu adiponektin gen ekspresyonunun ölçümü sonucunda, YD- grubunda adiponektin seviyesi daha düşük bulundu ($p=0.021$). Sonuç olarak, denerve edilmiş sıçanlarda, diyetle ilgili olarak adiponektin ekspresyonlarında ve serum adiponektin seviyelerinde farklılıklar olduğu görüldü. İki taraflı denervasyonun ve diyetin adiponektin seviyelerine ve sentezine farklı etkileri olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Adiponektin, Denervasyon, Obezite, Sempatik Sinir Sistemi, Yüksek Yağlı Diyet

SUMMARY

The Investigation of Adiponectin Gene Expressions and Serum Levels in Diet Induced Obese Rats Subsequent to Retroperitoneal Adipose Tissue Denervation

Adiponectin is a adipokine which is synthesized mainly in the white adipose tissue and shows anti-diabetic, anti-atherogenic and anti-inflammatory effects. Besides a number of other factors, the metabolic and secretory properties of adipose tissue is regulated by these sympathetic nervous system. In our study, we aimed to investigate the effects of retroperitoneal fat tissue denervation (both sides) on mRNA expression of adiponectin in the retroperitoneal and epididymal fat tissues and adiponectin concentrations in the serum in rats fed with standard and high fat diet. In our study, there were four experimental groups each containing 8 Sprague Dawley rats weighing 100-150 g and aging 3-5 weeks: I. Group: Denervated of both retroperitoneal tissue and fed high fat rat diet (YD+), II. Group: Not denervated and fed with high fat rat diet (YD-), III. Group: Denervated of both retroperitoneal tissue and fed standard fat rat diet (SD+), IV. Group: Not denervated and fed with standart rat diet (SD-) (control group). At the end of 10 week period, the animals tissue and serum samples were collected. In serum samples glucose, triglyceride, insulin and adiponectin levels were measured. Furthermore, in retroperitonel and epididymal tissue samples adiponectin mRNA levels were determined by using RT-PCR. Serum adiponectin levels were determined to be higher in high-fat diet and denervated group compared to the control group ($p=0.010$). In the retroperitoneal adipose tissue in YD+ group gene expression of adiponectin was found to be increased ($p=0.023$). In the epididymal adipose tissue in YD- group gene expression of adiponectin significantly lower ($p=0.021$). In conclusion, in the denervated rats depending on diet, it was shown that there were differences in the adiponectin expressions and serum adiponectin levels. It was considered that bilateral denervation and diet could have different effects on the adiponektin levels and synthesis.

Key Words: Adiponectin, Denervation, Obesity, Semphatic Nerve System, High Fat Diet

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya sağlık örgütüne göre beden kitle indeksi (BKİ) ≤ 25 -29.9 ise fazla kilolu ve BKİ ≥ 30 ise obezite ile sağlığı bozabilecek anormal ve fazla yağ birikimi olarak tanımlanmıştır. 2014 yılında yaklaşık olarak 1.9 milyar yetişkinin aşırı kilolu olduğu ve bunlardan 600 milyonun üzerinde kişinin de obez olduğu belirlenmiştir. 2014 yılında dünya nüfusunun %13'ü obez ve %39'u aşırı kilolu olup bu oran 1980 ve 2014 yılları arasındaki obezite prevalansının iki katından daha fazladır. Obezite ve fazla kilo alımının ana sebebi, alınan kalori ve tüketilen kalori arasındaki enerji dengesinin bozulmasıdır. Global olarak yüksek yağlı yoğun kalorili yiyecekler ve fiziksel inaktivitenin artmasından dolayıdır. Fazla kilo ve obezite diyabetin %44, iskemi kalp hastalıklarının %23 ve belirli kanser türlerinde %7-41 oranlarında görülmesine sebep olmaktadır (1).

Adiponektin Acrp30, AdipoQ, apM1 veya GBP28 olarak da bilinmektedir. Adiponektinin ağırlığı insanda yaklaşık 30 kDa iken, farelerde ise 28 kDa'dur. Adiponektinin insan plazma seviyesi 5-30 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar ulaşabilir (2). Plazma konsantrasyonu BKİ ile negatif ilişkilidir. Obezite ile miktarı azalır. Adiponektinin AdipoR1 ve AdipoR2 olmak üzere iki temel reseptörü vardır. AdipoR1 çoğunlukla kaslarda sentezlenirken, AdipoR2 sentezi ise karaciğerde gerçekleşmektedir (3). Adiponektinin glukoz alımına ve β oksidasyona etkisi 5' adenosin monofosfat aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) aracılığıyla olur. İskelet kasında AMPK'nın aktivasyonu adiponektin tarafından uyarılmaktadır. Adiponektin, AMPK aktivasyonuna ek olarak miyositlerde Asetil-CoA karboksilaz (ACC), yağ asidi oksidasyonunu, glukoz alımı ve laktat üretimini uyarır. Adiponektin ayrıca ACC fosforilasyonunu ve karaciğerde glukoneogenezde rol alan moleküllerin miktarında azalmayı uyarmaktadır (4).

İnsanlarda yapılan çalışmalar, yağlı diyet miktarı ile vücut ağırlığı artışı arasında pozitif ilişki olduğunu göstermektedir. İnsanlarda gösterilen bu ilişki hayvan çalışmaları ile desteklenmiştir. Bu yüzden transgenik deney hayvanları ve kimyasal ajanlarla indüklenmiş obezite modelleri daha az tercih edilmektedir. Genel olarak total enerjinin %30'undan fazlasının yağ içerdiği diyetler obezite gelişimine neden olmaktadır. Yüksek yağlı diyetle indüklenen hayvan modelleri insulin direnci, dislipidemi ve obezite oluşturmak için kullanılan en etkili yöntemlerdir (5-7). Yüksek karbohidratlı beslenme (fruktozun diyet kaynağı olan sükroz ile beslenme) de obeziteye neden olur. Sükroz, bozulmuş glukoz

toleransıyla beraber plazmada artmış insülin, leptin, trigliserit, glukoz ve serbest yağ asitleri ile sıçanlarda lipogenezi indükler. Yüksek şükrozla beslenme sıçanlarda karaciğer yağlanması gelişmesine neden olmaktadır (8).

Sempatik sinir sistemi (SNS), beyaz yağ dokusunun metabolik ve sekreatuar fonksiyonlarını düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Beyaz yağ dokusundaki gömülü sinirlerin elektriksel uyarımı, serbest yağ asitlerinin salınımını artırmaktadır. Beyaz yağ dokusunun adrenerjik reseptörleri de yağ hücrelerinin lipolizini düzenlemede önemli rol oynamaktadır. İnsan ve kemirgenlerde β -adrenoreseptörlerin aktivasyonu siklik adenosin monofosfatı (cAMP'yi) uyarmakta ve hormon duyarlı lipazı (HSL) etkinleştirirken, aktif α -adrenoreseptörler ise, cAMP'yi ve lipolizi inhibe etmektedir. Adiponektin sentezi sempatik sinir sistemi ile tarafından baskılanmaktadır (9). Delporte ve arkadaşları β -adrenoreseptor agonistlerinin Gs protein bağımlı PKA yolu aktivasyonu aracılığıyla WAT ve 3T3-L1 yağ hücrelerinde adiponektin gen ekspresyonunu azalttığını göstermiştir (10).

Otonom sinir sisteminin yağ dokusu üzerindeki etkilerini incelemek için sinir liflerinin devre dışı bırakıldığı denervasyon deneyleri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda retroperitoneal ve inguinal yağ pedlerindeki cerrahi denervasyonda yağ hücresi metabolizmasında ölçülebilir değişim olmaksızın, hücre proliferasyonundan dolayı yağ depolarının genişlediği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar SNS'nin, lipolize ek olarak yağ dokusunun büyümesini kontrol ettiğini göstermektedir (9).

Bu çalışmada, iki taraflı retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmiş sıçanlarda hem retroperitoneal hem de epididimal yağ dokularında denervasyona ve diyetle ilgili meydana gelen adiponektin gen ekspresyonu ve serum adiponektin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Yağ Dokusu

Yağ dokusu gevşek bir bağ dokusudur (11). İnsanlarda farklı fonksiyonlara sahip iki tip yağ dokusu vardır: beyaz ve kahverengi yağ dokusu. Beyaz yağ dokusu (WAT) temel olarak enerji depolanması ve mobilizasyonunda bulunur. WAT vücudun çeşitli bölgelerinde yerleşmiştir, metabolik hastalıklarla ilişkili yağ birikiminin artması ve genişlemesinde muazzam bir kapasitesi vardır. Kahverengi yağ dokusu (BAT) enerji tüketiminde özelleşmiştir, termogenik bir organdır ve yağları yakarak ısı üretir (12).

Yağ dokusu olgun yağ hücrelerinin yanında, stroma vasküler fraksiyon olarak adlandırılan, makrofajlar, fibroblastlar, kan hücreleri, endotel hücreleri ve yağ hücresi öncül hücrelerinden meydana gelmektedir (13). Yağ depolarının normal düzeydeki ve obezite durumundaki genişlemesi yağ hücreleri sayısının ve hacminin artmasının bir sonucu olarak gerçekleşmektedir. *In vivo* ortamda olgun yağ hücreleri bölünmediği için, yağ hücreleri miktarının artması ve yağ hücrelerinin rejenerasyonu yağ hücreleri öncüllerinin olgun yağ hücrelerine farklılaşması ile gerçekleşmektedir (12).

Yağ dokusunun tipine göre bazı yağ dokularında bulunan hücreler hücre hacminin büyük bir kısmını oluşturan tek bir yağ damlası içerirken, bazıları ise çok sayıda küçük yağ damlacıkları içermektedir. WAT tek ve büyük bir yağ damlası içeren, tek damlacıklı hücre tipinden oluşmaktadır. BAT ise tipik olarak çok damlacıklı hücrelerden oluşmaktadır. WAT ve BAT'ın renklerindeki farklılık ise, içerdikleri damar ve mitokondri miktarından kaynaklanmaktadır. BAT ayrıca zengin bir damar ağına sahiptir, bu özelliği bu dokuyu diğerlerinden ayırır. WAT'ın damarlanması, BAT'a göre daha azdır ancak WAT'ın her bir hücresi en azından bir kapilerle bağlantı kurmaktadır (14).

İnsanlarda WAT, birçok organ çevresinde ve deri altında geniş olarak yerleşirken, kalp, epikardium, perikardium, geniş kan damarları, büyük lenf nodülleri ve beyinde parasellüler bölgede küçük depo alanları şeklinde bulunmaktadır. BAT ise böbreklerin, adrenal bezlerin, aortun çevresinde, kürek kemiklerinin arasında ve boyun içinde bulunmaktadır (14).

4.1.1. Beyaz Yağ Dokusunun Fonksiyonları

WAT'ın başlıca üç fonksiyonu vardır: serbest yağ asitlerini trigliserit (TG) olarak depolama, depolanmış olduğu TG'leri gliserol ve serbest yağ asitlerine katabolize etme ve son olarak da, özel biyolojik fonksiyonları olan adipokin adı verilen proteinleri, hormonları ve sitokinleri salgılamaktır (15).

WAT'taki TG formu yiyecek eksikliği döneminde kullanılmak üzere fazla enerjinin depolanmış halidir. Yağların oluşumunda TG'lerin alımı kadar lipogenez işleminde ve fazla enerjinin diğer organlardaki hücrelerde kullanılması için lipoliz işleminde de gerekli lipid formundaki şeklidir (12).

WAT'tan salgılanan faktörler listelendiğinde, aslında WAT metabolizmayı etkileyen çok sayıda peptidleri (hormonları, büyüme faktörleri ve sitokinleri), proteinleri (enzimleri, ekstraselüler matriks bileşenleri) ve lipidleri (yağ asitleri ve türevli ürünleri) ürettiği için endokrin organ olarak düşünülmesine sebep olmuştur. Bu faktörlerin çoğu otokrin/parakrin mekanizmalar aracılığı ile WAT arasında lokal olarak rol oynarlar, fakat bir kısmı da beyin, iskelet kası, karaciğer, pankreas ve kalp gibi uzak dokuların fonksiyonunu sistematik olarak etkileyerek rol oynarlar. WAT'tan salgılanan leptin, adiponektin, retinol bağlayıcı protein-4 (RBP-4), rezistin, tümör nekroz faktor- α (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi moleküllerin metabolizma homeostazisi üzerine etkisi ve rolleri konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Bunlardan leptin ve adiponektin neredeyse sadece yağ hücrelerinden salgılandığı tanımlanan iki proteindir. Diğer proteinler yağ pedleri arasından, diğer dokulardan ve hücre tiplerinden salgılanır (16).

Buna ek olarak, farklı yağ depolarının salgılama kapasiteleri arasında hatta aynı türdeki bireyler arasındaki vücut dağılımı açısından bölgesel farklılıklar olduğu bildirilmiştir (12). Genellikle WAT'ın anatomik yerleşime göre iki temel depoda bulunduğu düşünülür: derinin altına yerleşen (subkutan) yağ doku ve bağırsakların, böbreklerin çevresinde ve sıçanlarda gonadların çevresinde bulunan (visseral) yağ doku. Ayrıca kas içinde ve kas çevresinde az miktarda bulunan yağ dokusu da visseral yağ dokusuna dahil edilmektedir (15). Visseral ve subkutan yağ dokusu işlevsel olarak farklılıklar göstermektedirler. Son zamanlardaki visseral ve subkutan yağ dokusunu karşılaştıran nicel analizler visseral yağ dokusunun subkutan yağ dokusundan daha fazla salgılama kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (16). Visseral yağ dokusu hem sistemik

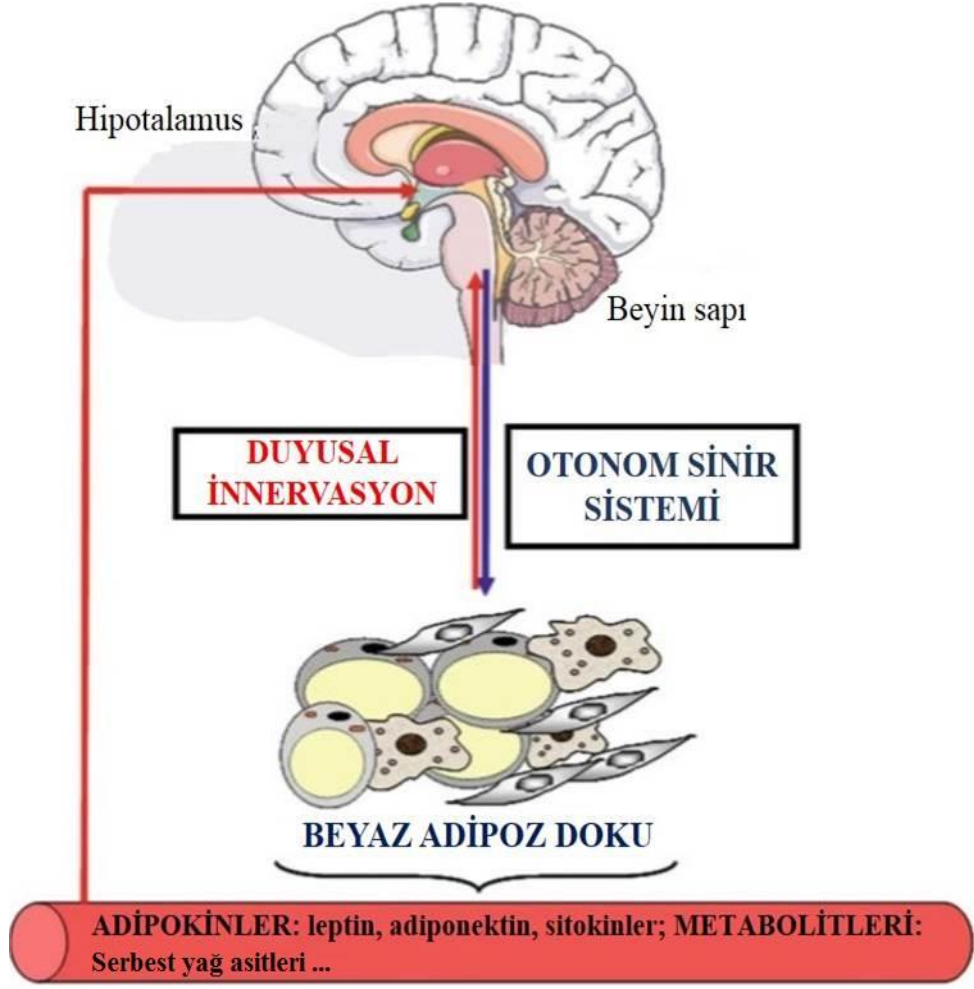
hem de lokal inflamatuvar olayları etkiler. Örneğin, visseral yağ dokusunda, anjiotansinojen için genler, kompleman faktörler ve yağ asidi bağlayıcı protein 4, subkutan yağ dokusuna göre daha fazla eksprese edilir. Visseral ve subkutan yağ doku, otonom sinir sistemi tarafından her bir yağ deposu için farklı motor nöronlar ile birlikte nöroendokrin geri bildirim kontrolü altında innerve edilir (17, 18). Visseral yağ dokusu subkutan yağ dokusuna göre daha fazla kan teminini sağlayan zengin damar ağı ve yoğun sinir innervasyonu ile karakterize edilmiştir (19).

Normal ağırlıktaki bir insanda yağ dokuları vücut ağırlığının erkeklerde %15-20'sini, kadınlarda ise %20-25'ini oluşturmaktadır İnsan vücudundaki yağ dokusunun yaklaşık %80'i yüzeysel ve derin subkutan yağ dokusu ve kalan %20'si ise visseral yağ dokusudur (14).

Obezite durumunda fazla yağ birikiminin subkutan veya visseral depolarda olup olmaması obezite ilişkili hastalıkların (insülin direnci, diyabet, kalp-damar hastalıkları gibi) gelişmesine çok farklı etkiler yapar (12).

4.2. Yağ Dokusu ve Sinir Sistemi

Enerji homeostazinin kontrolü için sinir kökenli faktörler önemli bir rol oynar. Merkezi ve otonom sinir sistemleri tüm vücut enerjisinin alım, tüketim ve depolama gibi farklı bileşenlerini düzenleyerek bütün vücut enerjisinin düzenlenmesinde rol oynar. Aslında çeşitli doku veya organların metabolik ve salgılama faktörleri otonom sinir sistemleri kontrolü altındadır. Bu durumun karaciğer, pankreas ve böbreküstü bezleri için ve aynı zamanda kaslar için de geçerli olduğunu gösteren veriler vardır (20). Ayrıca yağ dokularının metabolik ve salgılama kapasiteleri otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilir. Birçok çalışmanın desteklediği WAT ve beyin arasında bir yanda duyuşal sinir lifleri diğer yanında metabolitler ve hormonal sinyalleri içeren otonom sinir sistemi geri bildirim vardır. Beyaz yağ dokusu ve beyin arasındaki sinirsel ilişki Şekil 1'de gösterilmiştir (21).



Şekil 1. Beyaz yağ dokusu ve beyin arasındaki sinirsel ilişki (Pénicaud'tan, 21)

Yapılan çalışmalarda WAT'ın otonom sinir sisteminin sempatik uçlarındaki sinir lifleriyle donatıldığını göstermiştir. Bu katekolaminerjik liflerin başlangıçta kan damarlarıyla yakın ilişkide olduğu bunun da WAT'taki kan akımına sempatik sinir sisteminin dahil olmasına neden olduğu bildirilmiştir. Daha sonraki araştırmalarda sempatik uçların birçok yerinden “en passant” tipte norepinefrin salgılanmasına izin verildiği görülmüştür (21).

Sempatik sinir sisteminin asıl nörotransmitteri norepinefrindir ancak nöropeptid Y gibi nörotransmitterleri de içerir ve salgılar. Yağ hücreleri de farklı reseptör alt tiplerini aktifleştirerek lipolizi kontrol ederler (21).

Lipolitik yollar temel olarak trigliserit lipaz, hormon duyarlı lipaz ve perilipin A moleküllerinin kontrolü altındadır (21). Lipolizin en genel ve güçlü inhibitörü pankreas β

hücrelerinden üretilen insülin dir. İnsülin cAMP'yi hidrolizleyen ve PKA aktivitesini azaltan fosfodiesteraz 3B aktivasyonu vasıtasıyla lipolizi inhibe etmektedir. İnsülin konsantrasyonu yemek sonrası artar ve insülin indüklü lipoliz inhibisyonu insanlarda yağ hücrelerini artırır (22). Bu düzenleme yemek sonrasında insülinin substrat alımı ve depolamasının yanında yağ hücrelerindeki trigliseritlerin hidrolizini de sınırlandırdığı için önemlidir. İlginç şekilde insülinin antilipolitik etkisi visseral yağ dokusundan çok insülin reseptör substrat-1 ilişkili fosfotidilinositol 3-kinaz yolu vasıtasıyla insülinin otofosforilasyon ve sinyal iletimi arttığından dolayı subkutan yağ dokusunda daha fazladır (14).

Ayrıca katekolaminler ve özellikle norepinefrin (NE) lipolizin kontrolünde bulunan başlıca hormonlardır. Buna rağmen, insülinin antilipolitik etkisi daha baskındır ve bu yüzden katekolaminler insülin seviyesi düşük olduğu zaman etkilerini gösterebilirler. Sonuç olarak sempatik sinir sistemi yağ doku lipolizi için temel tetikleyicidir. Lipoliz üzerine etkilerinin iyi bilinmesinden başka, SNS anabolik yolların düzenlenmesinde de bir rol oynar. Dolayısıyla, sempatik sinirlerin uyarılmasının WAT'ta glukoz alımı, tüketimi ve lipogenez üzerine temel etkisi olmadığı gösterilmiştir. Oysaki, parasempatik sinir sistemi (PNS) innervasyonunun WAT'ta insülin duyarlılığını arttırdığını gösteren kanıtlar vardır. Beyaz yağ dokusunun parasempatik sistemi tarafından uyarılması oldukça tartışmalı ve şüpheli bir konu olarak kalmıştır (20-23).

Pek çok doku ve organ hem SNS hem de PNS tarafından innerve edilir. Uzun bir süredir, WAT'ların parasempatik sinirleri içermediği düşünülmüştür. Son nöroanatomikal çalışmalar, sıçanlarda WAT'ta parasempatik innervasyon olduğunu göstermiştir. Vagatominin insülin-bağımlı glukoz ve serbest yağ asiti alımını azalttığını göstermesinden beri parasempatik innervasyonunun fizyolojik bir rolü olduğu düşünülmüştür. PNS'nin bu rolü ayrıca beyaz yağ hücrelerinde fonksiyonel nikotinik reseptörlerin varlığının ve aynı zamanda nikotin uyarısı altında bu hücrelerin artmış bir insülin duyarlılığı göstermesiyle de açıklanabilir. Buna rağmen, WAT'ın PNS innervasyonu oldukça tartışmalıdır (21).

4.2.1. Yağ Dokusu İnnervasyonu ve Denervasyonu

Yağ kütlesi yağ hücrelerinin hacim ve miktarının düzenlenmesi gibi iki prosesin sonucu oluşur. Aslında otonom sinir sistemi ilk olarak enerji depolanması ve yıkımının düzenlenmesinde bulunur. SNS'nin beyaz yağ hücrelerinin apoptozunda, çoğalmanın,

farklılaşmanın ve daha az bir genişlemenin kontrolünde bulunduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Sempatik aktivasyon ile WAT'ın gelişimi inhibe olabilmektedir (20). WAT'ta β -adrenerjik reseptörler lipoliz uyarıcı etki gösterirken, α -2 adrenerjik reseptörler lipolizi inhibe edici etki göstererek yağ hücrelerinin lipolitik aktivitesini belirlerler. Genel bir β -adrenoreseptör bloklayıcısı olan propranolol ile öncül yağ hücrelerinin muamele edilmesi, genellikle poliferasyonun NE inhibisyonunu engeller. Bu veriler beyaz yağ hücresi proliferasyonunun kontrolünde sempatik sinirlerden salgılanan NE'nin rolü olduğu kanıtlarını destekler niteliktedir (24).

Yağ dokusu genel bir tanım olarak kullanılmasına rağmen, yağ pedleri kökeninden, anatomik özelliklerinden ve fonksiyonları açısından oldukça farklıdır. Aslında yağ depolarının nörotransmitter reseptörlerinin hem otonom innervasyonu (fiber yoğunluğu veya alt-lokasyonu) hem de sayısı ve afinitesi heterojendir. İlk olarak inguinal ve epididimal pedlerin nispeten ayrılmış bir sempatik innervasyonu vardır. Sempatik sinirlerde bu periferik viserotrofik ayrıma ek olarak, viserotrofik spinal kord veya beyin arasında merkezi olarak bulunabilir. Ayrıca, innervasyonun bu heterojenitesi beslenme duruma göre değişebilir. İkinci olarak, SNS'nin aktivitesinin bir indeksi olarak NE turnover sayısı alınır ve özel yapının uyarılıma bağlı olabileceği tasvir edilir. Tüm bunlarla beraber, bu son veriler subkutan yağ pedleriyle karşılaştırıldığında visseral yağ pedlerinde daha yüksek bir lipoliz olduğunu göstermektedir. Üçüncü olarak, bu reseptörlerin türüne, cinsiyete ve yağ depolarına bağlı olan farklı alt sınıflarının dağılımları ile desteklenir. Böylece, kadınlarda örneğin, α_2 ve β_1 ve β_2 -adrenoreseptörlerinin sayısının omental, abdominal ve femoral yağ dokuları arasında epinefrin veya norepinefrine lipolitik bir cevabın sonucu olarak çeşitlendiği gösterilmiştir (21).

Otonom sinir sisteminin yağ dokusu üzerindeki etkilerini incelemek için sinir liflerinin devre dışı bırakıldığı denervasyon deneyleri kullanılmaktadır. *In vivo* ortamda beyaz yağ dokusunun cerrahi veya farmakolojik olarak sıçan ve Sibirya hamsterlerindeki denervasyonu, öncül yağ hücrelerinin ve yağ hücrelerinin sayısının önemli miktarda artmasını tetikler. Yapılan ilk çalışma tek taraflı retroperitoneal yağ pedinin denervasyonundan bir hafta sonra olgun yağ hücrelerin miktarında bir değişim olmaksızın DNA içeriğinin büyük oranda arttığını göstermiştir. İlave, beyaz yağ hücrelerinin farklılaşmasının erken bir belirteci olan insan tip IV kollajen 2 zinciri (A_2COL_6) geninin miktarı denerve edilmiş pedlerde yükselmiştir. Bir ay sonra, olgun yağ hücrelerinin miktarı

denerve edilmiş pedlerde önemli ölçüde artmıştır. Denerve edilmiş yağ pedlerine göre, sonuçlar her zaman aynı olmayabilir, bu da WAT pedlerinin heterojenitesinin temel olarak innervasyona bağlı olduğu düşüncesini kuvvetlendirir. Heterojen yapıyı, beyaz yağ dokusundaki öncül yağ hücrelerinin sayısı, beyaz yağ hücrelerinin boyutu veya kahverengi yağ hücreleri oluşturur. Bütün bunlar, *in vivo* ortamda SNS innervasyonunun yağ hücresi gelişiminin modülatörü olarak hareket ettiğini göstermektedir (21).

4.2.2. Otonom Sinir Sisteminin Beyaz Yağ Dokusunun Salgıları Üzerine Etkisi

Beyaz yağ dokusunun yağ depolama ve enerji salınımı fonksiyonlarının haricinde bir endokrin organ olduğu bir gerçektir. Ayrıca leptin, adiponektin, inflamasyon ve bağışıklıkta yer alan proteinler gibi birçok faktörleri sentezleyerek ve salgılayarak diğer fizyolojik fonksiyonlarının bir kısmını gerçekleştirir. Bu bileşiklerin bazılarının salgılanması ve sentezi katekolaminlerin aracılığı ile SNS'nin bir rol oynadığı birçok faktörlerin kontrolü altındadır. Muhtemelen leptin bunlar arasında üzerinde en çok çalışma yapılandır. β -adrenoreseptörlerin uyarılmasının leptin salınımını azalttığını gösteren birçok çalışma vardır. Ayrıca adiponektin de β -adrenoreseptörler tarafından negatif olarak düzenlenir. Aksine, TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin salgılanması β -adrenerjik uyarılar altında artar. Tüm bu veriler, β -adrenoreseptör aktivasyonu ile proinflamasyon sitokinlerin artmasının ve adiponektinin azalmasının katekolamin-indüklü insülin direncinin patogeneze katkı sağlayabileceğini göstermektedir (21).

Çalışmalarda β -adrenoreseptör agonistlerinin Gs protein bağımlı PKA bağımlı yolun aktivasyonu aracılığıyla WAT ve 3T3-L1 yağ hücrelerinde adiponektin gen ekspresyonunu azalttığını gösterilmiştir. Son dönemde yapılan çalışmalar, katekolaminlerin insülin duyarlılığını harap ettiğini ve sempatik sinir sisteminin aktivitesinin artmasıyla insülin direncine sebep olduğunu kanıtlamaktadır. Adiponektinin insülin duyarlaştırmacı etkisi tam olarak bilinmemesine rağmen Yamauchi ve arkadaşları adiponektin tedavisinden sonra kaslarda yağ asiti transferi, yanma ve enerji kaybının arttığını göstermiştir. Bu süreç kaslarda trigliserit konsantrasyonunun ve serumda serbest yağ asitlerinin azalmasına neden olur. Bu değişikliklerin sonunda kaslarda insülin sinyalizasyonu artar. Bu veriler adiponektin seviyesinin azalması ile serum serbest yağ asitlerini artırabilir ve insülin duyarlı dokularda insülin sinyalleri harap olabilir. İlginç şekilde katekolaminlerin neden olduğu insülin direncinde de her iki etki gözlenebilmiştir. Yapılan birçok çalışmada β adrenerjik

uyarların serum serbest yağ asitleri konsantrasyonunun artmasına neden olduğu ve insulin reseptör substratları gibi insulin hareketi için gerekli sinyal moleküllerini inhibe ettiğini göstermiştir. Öyle görülüyor ki, adiponektin ekspresyonunun azalması serbest yağ asitleri seviyesinin artmasına katkı sağlar ve kronik katekolamin tedavi sonrasında insulin sinyalleri bozulması mümkündür. Fakat β adrenerjik aktivasyonun lipoliz ve insulin sinyal molekülleri üzerine doğrudan etki göstermesinden daha çok katkıya benzemektedir (25).

4.3. Obezite ve Metabolik etkileri

Obezite temel bir halk sağlığı problemidir ve obeziteye bağlı ölümler tip 2 diyabet, ateroskleroz gibi metabolik disfonksiyon sonucu meydana gelir. Kronik patolojinin gelişmesi ile beyaz yağ dokusunun kronik inflamasyonu arasında kuvvetli bir ilişki vardır. WAT'taki hipertrofik yağ hücreleri, depolanan fazla enerjinin verimli şekilde kullanılmasını azaltır, bu da yağ dokusu disfonksiyonu, dislipidemisi ve insülin direncine sebep olur (26, 27). Yağ depolarındaki artmış doku inflamasyonu yağ hücrelerinden sitokinlerin, kemokinlerin ve proinflamatuvar doymuş yağ asitlerinin salınımına neden olur, monositleri M1-polarize makrofajlara dönüştürür. Böylece yağ doku yatakları arasındaki çevrede inflamasyon artar. Aktive makrofajlar tarafından üretilen proinflamatuvar faktörler yağ hücrelerinde karşılıklı olarak hareket ederler, böylece yağ dokusundaki doku inflamasyonu ve disfonksiyonu devam eder (28). Obezite sıklıkla adipokin salgılanmasında disregülasyona neden olur (29, 30). Adipokinler açlığın ve tokluğun, yağ dağılımının, insülin duyarlılığının ve insülin salgılanmasının, enerji tüketiminin, inflamasyonun, kan basıncının, homeostazinin ve endotelial fonksiyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı için, adipokinler obezitenin ve obezite ile ilgili hastalıkların gelecekteki tedavisi için umut verici bir adaydır (30, 31).

Bazı endokrin ve psikiyatrik hastalıkların obeziteye neden olduğu bilinmesine rağmen obezitenin en yaygın nedenleri diyetle fazla kalori alınması, fiziksel aktivitenin azalması ve genetik yatkınlık olarak bilinmektedir (32).

4.3.1. Obezite ve Metabolik Hastalıklarda Adipokinlerin Rolü

Yağ dokusu yağ asitlerini, diğer lipidleri ve metabolitleri salgılamasının yanı sıra, 600'den fazla biyoaktif faktörleri (adipokinleri) salgılar (33). Yağ doku seviyesinde, adipokinler adipogenezin, yağ dokuya immün hücre göçünü, yağ hücresi metabolizması ve fonksiyonunun düzenlenmesine katkı sağlar (30, 34, 35). Bütün vücut seviyesinde,

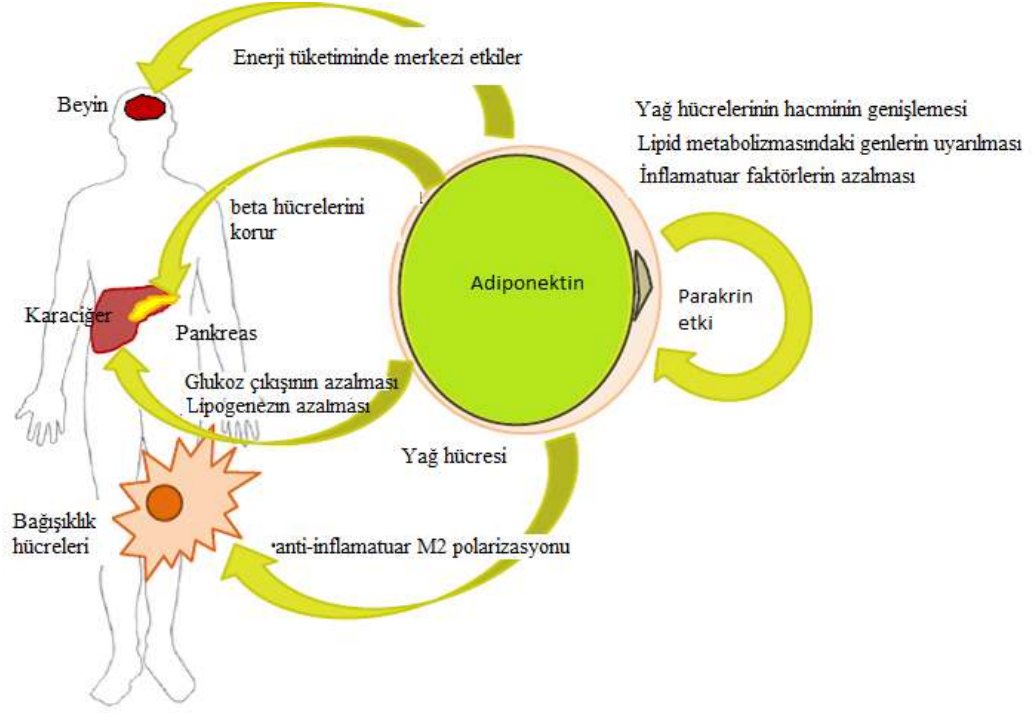
adipokinler beyin, karaciğer, kas, damar düzeni, kalp ve pankreatik β -hücrelerini içeren hedef organlarda farklı biyolojik süreçleri ayarlar ve düzenler (34).

Adipokin salgı durumu yağ doku fonksiyonunu yansıtır ve obezitenin metabolik ve kardiyovasküler ek hastalıklarını oluşturan bireysel risklerin belirlenmesinde önemli görülmektedir. Yağ doku inflamasyonu ve disfonksiyonu geliştiğinde, adipokin salgılanması diyabetojenik, proinflamatuvar ve aterojenik duruma doğru önemli ölçüde değişir (30, 36).

Hipertrofik yağ dokuda adipokin üretimi bozulur bu da obezite ile ilişkili inflamasyon ile sonuçlanır (37). Örneğin, adiponektinin dolaşımdaki seviyesi obez kişilerde ve obez yapılmış deneysel hayvanlarda sürekli olarak azalır. Adiponektinin diyabet, dislipidemi ve ateroskleroz durumlarında koruyucu bir rol oynadığı ve obez kişilerde, C-reaktif protein (CRP) ve TNF- α gibi sitokinleri içeren dolaşımdaki inflamatuvar belirteçlerle plazma adiponektin konsantrasyonunun ters ilişkili olduğu bildirilmiştir (38-41). Bu bulgular doğrultusunda, adiponektinin doğrudan anti-inflamatuvar aktivitesi gösterilmiştir. Adiponektin makrofajların köpük hücrelere dönüşümünü inhibe eder ve makrofaj göçünü ve kemokin üretimini azaltır (40-42). Adiponektin ayrıca bir anti-inflamatuvar M2 fenotipine karşı makrofaj tipini uyarır ve toll benzeri reseptör (TLR) sinyaliye karşı makrofojları duyarsızlaştırır (43, 44).

4.4. Adiponektin

Adiponektin 1995 yılında keşfedilen ve uzun bir süredir çok yaygın bir şekilde çalışılan yağ hücresi türevli sekretuvar bir proteindir. *In vitro* olarak doku kültürü sistemlerinde ve *in vivo* olarak kemirgen modellerinin genetik uygulamasıyla karakterize edilmiştir. Ayrıca klinik çalışmalarda bir biyobelirteç olarak kabul edilmiştir (45). Bu protein başlangıçta Acrp30 olarak biliniyordu, fakat yaygın ismi olan adiponektin üzerine bir konsensüs sağlanıncaya kadar adipoQ, apM1 and GBP28 gibi isimler de kullanılmıştır (46, 47). Çok farklı fonksiyonlara sahip olması bu adipokine katkı sağlamıştır. Bu molekülün hücresel ve sistemik fizyolojide pek çok rolünün olduğu bilinmesine rağmen, literatürde adiponektinin genellikle birçok farklı hücre tipi üzerinde insülin duyarlılığı, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik olayları oluşturduğu ortak bir görüştür (45). Bu durum Şekil 2’de belirtilmiştir.



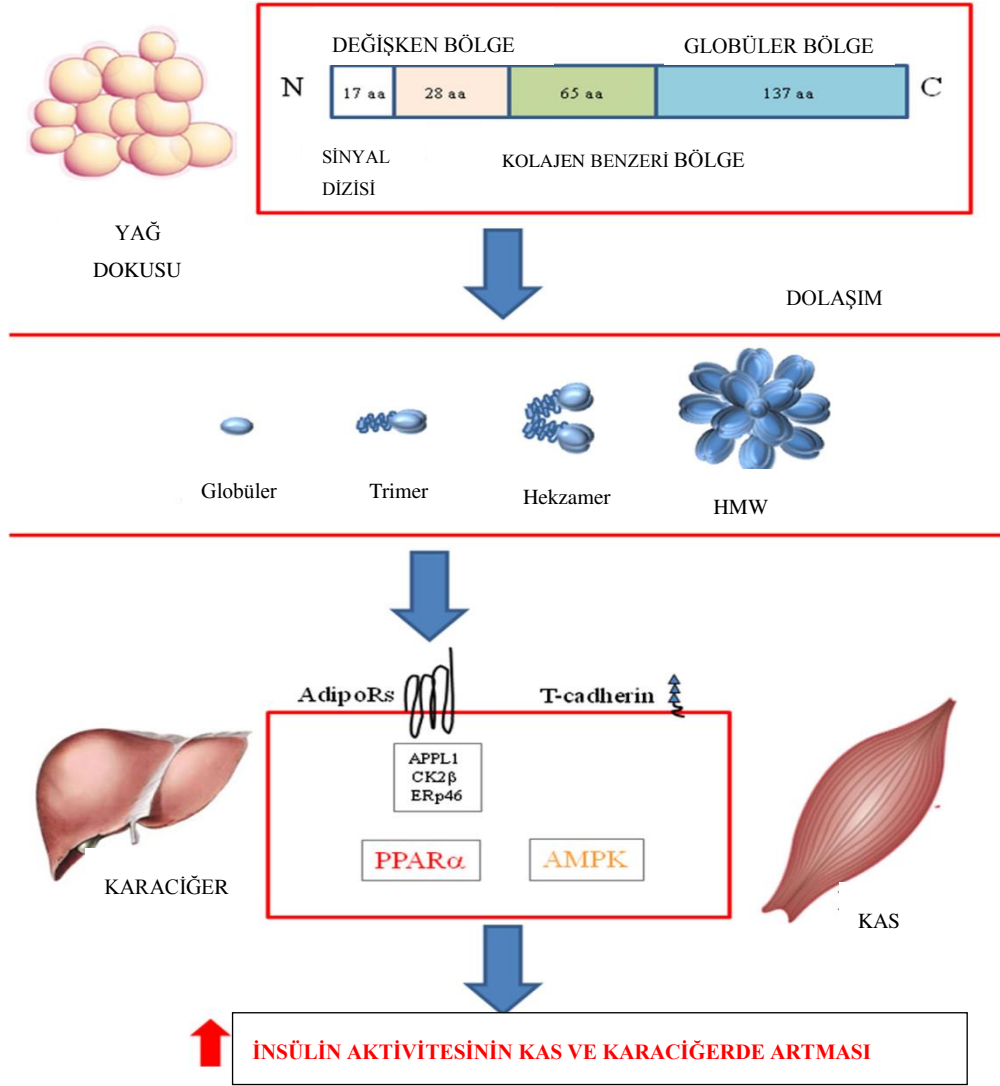
Şekil 2. Adiponektinin periferel dokularda insülin duyarlılığı ve metabolizma üzerindeki temel mekanizması (Turer'den, 45)

Adiponektinin bu faydalı metabolik etkileri göstermesi adipokinler içerisinde yağ hücresi kökenli sekratuvar molekülleriyle ilişkilendirildiğinde onu en şaşırtıcı ve oldukça nadir adipokin yapmaktadır. Bu olağandışı özelliklere sahip olmasına rağmen, yağ hücrelerinden salgılanan adiponektin olumsuz metabolik şartlar altında genellikle downregüle olur bu da plazmadaki seviyesinde azalmayla sonuçlanır (45).

4.4.1. Adiponektinin Yapısı ve Etki Mekanizması

İnsanlarda adiponektin geni kromozom 3q27'de lokalize ve 244 aminoasitten oluşmuştur (48). Adiponektin globüler bir C- terminal domaini ve kollajenöz N-terminal domainden oluşan 30 kDa ağırlığına sahip bir proteindir (49). Kollajen domaini, adiponektinin salgılanmadan önce trimer, heksamer ve yüksek molekül ağırlıklı kompleksler oluşturmaya imkan sağlar. Sistein rezidüleri kollajenöz bölgede yüksek molekül ağırlıklı komplekslerin oluşmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu yapılar proteinin biyolojik olarak en aktif formlarını temsil eder (50-52). Globüler form adiponektinin dolaşımdaki halinin % 1'lik kısmını oluşturur ve biyolojik fonksiyonları gerçekleştiren kısım olan multimerik formları mekanizması daha önemlidir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda total adiponektinden çok HMW biyolojik aktif formu metabolik ve

kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için antiaterojenik, antiinflamutuar ve antidiyabetik etkiyi gösterebilir (3). Adiponektinin sentez ve etkileşimleri Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Adiponektin sentezi ve etkileşimleri (Caselli'den, 3)

Adiponektin molekülleri yağ dokusu hücreleri tarafından üretilir, sonra post-translasyonel modifikasyonlarla adiponektinin globuler, trimer (LMW), hekzamer (MMW) ve yüksek molekül ağırlıklı (HMW) izoformları halinde periferel dolaşıma salgılanır. Adiponektin mekanizması harekete geçer. Kas ve karaciğer gibi hedef dokularda AdipoR1 ve AdipoR2 reseptörlerine bağlanır (3). AdipoR1 reseptörü globüler adiponektin için yüksek afinitelidir ve trimer, hekzamer ve multimer formlarına karşı çok düşük afiniteli

reseptördür. AdipoR2 reseptörü ise globüler ve diğer formlarına karşı orta derecede afinite gösteren reseptördür (53, 54).

Adiponektin metabolik fonksiyonlarının pek çoğunu AMPK aracılığıyla gerçekleştirir. Adiponektin AMPK fosforilasyonunu ve aktivitesini kasta ve karaciğerde *in vivo* ve *in vitro* olarak uyarır. Kasta, AMPK'nın aktivasyonu yağ asidi oksidasyonu ve glukoz transportu üzerine adiponektinin etki edebilmesi için gereklidir ve artmış AMP seviyeleri ile ilişkilidir. Karaciğerde, AMPK aktivasyonu fosfoenolpiruvat karboksikinas'ın, glukoz 6 fosfataz'ın ekspresyonunun ve hepatik glukoz üretiminin inhibisyonuna etki etmesi için gereklidir. Ayrıca karaciğerde AMPK'yı aktive etmek için adiponektinin etkisini bir dominant-negatif AMPK kullanarak bloklama adiponektinin glukoz düşürücü etkisini ortadan kaldırır (55). Biyolojik etkisi bilinmemesine rağmen adiponektin izole edilmiş adipositlerde AMPK'yı aktive eder. Bu nedenle, AMPK yolağı adiponektinin metabolik ve insulin duyarlaştırıcı fonksiyonları için önemlidir (56).

4.4.2. Adiponektinin Reseptörleri

Adiponektin fizyolojik faaliyetleri adiponektin reseptörleri 1 ve 2 (AdipoR1 ve AdipoR2) gibi pek çok reseptörler vasıtasıyla gerçekleşir (57). Bu reseptörlerin yedi transmembran bölgeden oluştuğu fakat bunların özellikle de zıt polariteye sahip oldukları için G-protein-coupled reseptörlerden fonksiyon olarak farklı olduğu tahmin edilmektedir. Tekli ve ikili reseptör genleri nakavt edilmiş farelerin adiponektin reseptörleri için reseptörler arasında önemli farklılıklar olduğu öne sürülmüştür (58). Her iki reseptörde özellikle monosit ve makrofajlarda her zaman sentezlenir (59-61). AdipoR1 çoğunlukla iskelet kaslarında sentezlenir (59) fakat ayrıca endotel hücreler, kardiyomiyositler ve pankreatik- β hücrelerde de eksprese edilir (62, 63). AdipoR2 ise çoğunlukla karaciğerde eksprese edilir (58) ve kısmen de endotelyal hücreler (61) ve kardiyomiyositlerde (64) ekspreslenir. Kas ve yağ dokusunda hiperglisemik hiperinsülinemik durumlarda ise her iki reseptörün ekspresyonu da anlamlı miktarda azalır (65).

Adiponektin reseptörlerine ek olarak bir glikozil-fosfotidilinositol (GPI) olan T-cadherin de adiponektin için potansiyel bir reseptör olarak düşünülmektedir (66). Bu reseptör kas ve karaciğerde etkin şekilde sentezlenmez fakat vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde ekspreslenir (65). Adiponektine bağlanmasına rağmen, intraselüler sinyal

domaini olmadığı için tek başına bir sinyal reseptörü değildir. Yine de, T-cadherin adiponektininkardiyoprotektif özelliklerini uygulayabilmesi için gereklidir (66).

AdipoR1 ve AdipoR2 adiponektinin önde gelen metabolik etkilerini APPL1 (adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1) vasıtasıyla düzenler. APPL1 insülin sinyal molekülleriyle etkileşerek adiponektin ve kandaki insülin bulunuşu arasında bir moleküler bağı gösterir. Yapılan çalışma ile adiponektin reseptörlerinin karaciğerde peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör alfa (PPAR- α) sinyal yolu ve AMPK ile sıkı ilişkili oluşu açıkça gösterilmiştir. AMPK, PPAR- α ve p38 mitojen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) sinyal yolları adiponektinin moleküler sinyalini sağlarlar (65). İnsülin duyarlılığında iyileşmeye aracılık eden adiponektin reseptörü henüz belirlenememiştir (67). Ayrıca, bazı hücre tiplerinde, adaptor protein APPL1 adiponektin reseptörleriyle etkileşerek adiponektin sinyalinde bir azalmaya neden olur (68).

4.4.3. Adiponektinin Salgılanması

Adiponektin başlıca beyaz yağ dokusundan ve özellikle olgun yağ hücrelerinde üretilir. Ayrıca epikardiyal yağ dokusu adiponektin ekspresler. Adiponektinin plazma seviyesi toplam vücut yağından çok visseral yağ miktarıyla yakın ilişkilidir. Bu durum özellikle visseral obezite, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarla yakın ilişkide olduğunu gösterir. Karaciğer, kardiyomiyositler, kalın bağırsak, tükrük bezleri, plasenta ve hipofiz bezinde ise düşük seviyelerde eksprese edilmektedir (61).

Adiponektin plazma proteinlerinin yaklaşık %0.01–0.05’ini oluşturur, bu yüzden bir plazma faktörüdür. Adiponektin çok kararlı bir proteindir, dolaşımdayken minimal yıkım gösterir, fakat sürpriz bir şekilde bulunduğu formuna ve şartlara bağlı olarak yaklaşık 45-75 dakikalık bir yarılanma ömrü vardır (69). Dolaşımdaki adiponektinin temizlenmesinin primer bölgesi karaciğerdir, fakat özellikle pankreatik β hücreleri, kalp ve böbrek gibi bazı hücre tipleri de adiponektini kuvvetlice bağlar (70). Adiponektin yağ dokusundan salgılanmasına rağmen, dolaşımdaki seviyesi visseral yağ hücrelerinin sayısının artmasıyla çelişkili biçimde azalır (71, 72). Buna rağmen, alt ekstremitenin ve gövdeye ait yağlanmanın yüksek derecesi daha yüksek adiponektin konsantrasyonuyla ilişkilidir. Bu yüzden, yağ depolarının yerleşimi, farklı bir şekilde dolaşımdaki adiponektin konsantrasyonunu etkiler. Farklı etnik gruplar arasında adiponektin seviyelerinde

farklılıklar varken, gövdesel ve alt ekstremitte yağlanmasının artması ve yüksek adiponektin seviyesi (ve yüksek insülin duyarlılığı) arasındaki ilişkinin korunduğu konusunda bir yönelim vardır (73).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları hakkında bilgi Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma
Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Merck
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Bakır II klorür (CuCl_2)	Lancaster
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
Dietil prikarbonat (DEPC)	Sigma
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Sigma
Etidyum bromür ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$)	Sigma
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	Carlo Erbo Reagent
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Merck
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Sigma
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
İzopropil alkol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$)	Sigma
Kloroform	Merck
Ksantin	Sigma
Ksantin oksidaz	Sigma
Nitro blue tetrazolium (NBT)	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Sıçan yemi	Research diet
Sığır Serum Albumin (BSA)	Merck
Sodyum bifosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	Merck
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Lancaster
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Merck
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Merck

5.1.2. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo2’de listelenmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Etüv	Gallenkamp
Vorteks	Nüve, NM 110
ELISA pleyti	Bioscience
Real Time PCR Cihazı	Roche Light Cyclers 480 II
Santrifüj	Eppendorf
Magnetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet,10-100 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet,100-1000 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet,1-5 mL	Eppendorf Research
Mikrodalga fırın	Altus ALMD 171
pH metre	Hanna Instruments
El homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazî	Metler Toledo AB 204-S
Deney tüpleri	SH&GLASS
Mikropleyt okuyucu	VERSA max
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R Centrifuge
Steril DNAaz, RNAaz free pipet uçları	Greiner
Thermocycler	PE Biosystem
Çalkalayıcı	Nüve SL 35
Nanodrop	Thermo
ELISA yıkayıcısı	Biotek
Derin dondurucu	Thermo -86 °C

5.1.3. Kullanılan Hayvanlar

Çalışmamızda TÜBİTAK tarafından desteklenen 114S147 nolu projede kullanılan hayvanlardan alınan örnekler kullanılmıştır. Yine aynı projeden üretilen ve Taghi AHMADI RENDİ’nin yüksek lisans tezinde bulunan ve bu tez çalışmasında da faydalanılacak veriler kaynak belirtilerek kullanılmıştır (74). Projede KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Sprague-Dawley ırkı 32 adet erkek 3-5 haftalık 100-150 g ağırlığında sıçanlar kullanıldı. Yapılan deneylerin tümü

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2013/29 protokol (Ek 1. Etik Kurul Onayı) numaralı etik kurulu onayı ile yapıldı.

5.1.4. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firmaları hakkında bilgi Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kitler ve üretici firmalar

Kullanılan kitler	Üretici firma
Rat Adiponectin ELISA kiti	Sun Red - Cat. no201-11-0759
Rat NE ELISA kiti	Sun Red - Cat. no 201-11-0515
Rat insulin ELISA kiti	SPI bio - Cat. no A05105
TRI pure RNA izolasyon kiti	Roche - Cat. no 11667165001
Transcriptor First Strand cDNA synthesis kiti	Roche - Cat. no 04896866001
DNA Master SYBR Green I	Roche - Cat. no 12239264001

5.2. Yöntem

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışma başlamadan önce, deney hayvanları aynı yerde deneyler için vücut ağırlıklarına göre dengeli bir şekilde ayarlanarak 4 farklı grup oluşturuldu ve 24 saatlik adaptasyon süresince standart yem ile beslendi. Çalışmada kullanılan tüm yemler (D12450J ve D12492) Research Diyet'ten satın alındı.

5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar standart sıçan yemi (D12450J) 24 saat süreyle beslendi. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Adaptasyon süresi bittikten sonra sıçanlar rastgele her grupta 8 adet sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve tartım işlemleri gerçekleştirildi.

I. Grup: Retroperitoneal yağ dokusu iki taraflı denerve edildi ve yüksek yağ içerikli sıçan yemi ile beslendi (YD+).

II. Grup: Sadece batınları açılıp dikildi ve yüksek yağ içerikli sıçan yemi ile beslendi (YD-).

III. Grup: Retroperitoneal yağ dokusu iki taraflı denerve edildi ve standart sıçan yemi ile beslendi (SD+).

IV. Grup: Sadece batinları açılıp dikildi ve standart sıçan yemi ile beslemeye devam edildi (SD-) (kontrol grubu). Tüm gruplara su ve yem *ad libitum* olarak verildi.

Bütün hayvanlara batin kapatılmadan önce tek doz penisilin seyreltilerek batin içi uygulandı. Toplam 70 günlük beslenme periyodunun sonunda, sıçanların tartımı gerçekleştirildi ve 12 saatlik yemsiz bir periyod geçirdikten sonra sabah saatlerinde dekapitasyon ile kanları alınarak sakrifiye edildi. Kanların santrifüjlenmesiyle elde edilen serumlar ependorflara konularak -20°C’de saklandı. Sıçanlar kan alındıktan sonra batından açılıp her iki tarafta olan retroperitoneal yağ dokusunun tümü ve epididimalın bir kısmı çıkarılıp hemen DNAaz, RNAaz içermeyen steril ependorflara konularak ölçüm yapılana kadar -80°C’de saklandı.

Beslenme periyodunda kullanılan D12492 ve D12450J yemlerinin içeriği Tablo 4’te ve Tablo 5’de sunulmuştur.

Tablo 4. Yüksek yağ içerikli sıçan yeminin içeriği

D12492 kodlu yüksek yağlı sıçan yemi içeriği	% g	% K. kalori
Protein	26.2	20
Karbohidrat	26.3	20
Yağ	34.9	60
Toplam kilo kalori / g	5.24	100

Tablo 5. Standart sıçan yeminin içeriği

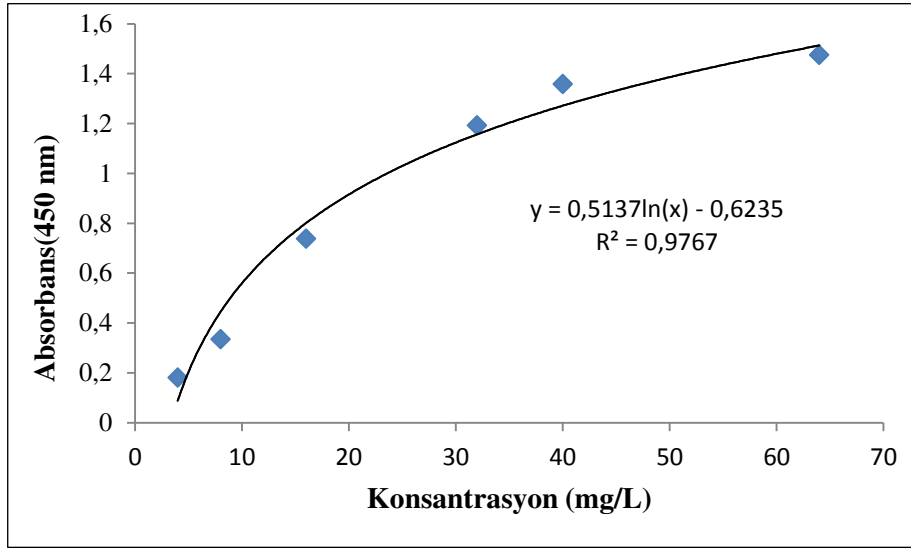
D12450J kodlu standart sıçan yemi içeriği	% g	% K. kalori
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam kilo kalori / g	3.85	100

5.3. Serumda Glukoz ve Trigliserit Ölçümü

Serum numunelerin açlık glukoz ve TG seviyeleri Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Farabi Hastanesi rutin tıbbi biyokimya laboratuvarında Roche Hitachi Cobas 8000 oto analizöründe ölçülmüştür.

5.4. Serumda Adiponektin Ölçümü

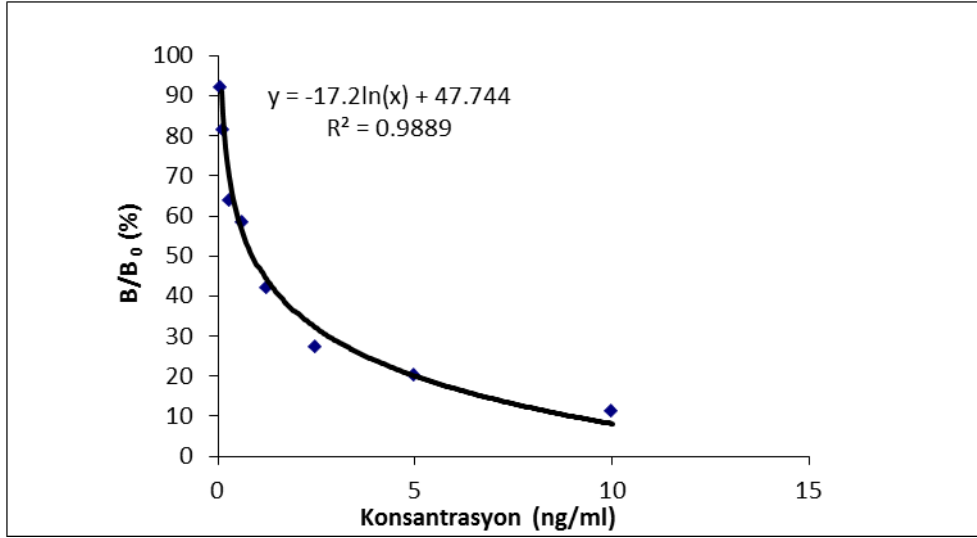
Serum adiponektin ölçümünde SunRed firmasının 201-11-0759 katalog nolu sıçan adiponektin ELISA kiti kullanılmıştır. Serumda adiponektin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. Adiponektin standart grafiği

5.5. Serumda İnsülin Ölçümü

Serum insülin ölçümünde Rat insülin ELISA kiti (katalog noA05105, SPI Bio) kullanıldı. Serumda insülin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Elde edilen standart grafiği Şekil 5’te gösterilmiştir.



Şekil 5. İnsülin standart grafiği (405 nm) (Ahmadi Rendi'den, 73)

5.6. Dokuda Norepinefrin (NE) Ölçümü

5.6.1. Norepinefrin Ölçümünde Kullanılan PBS Çözeltilisinin Hazırlanması

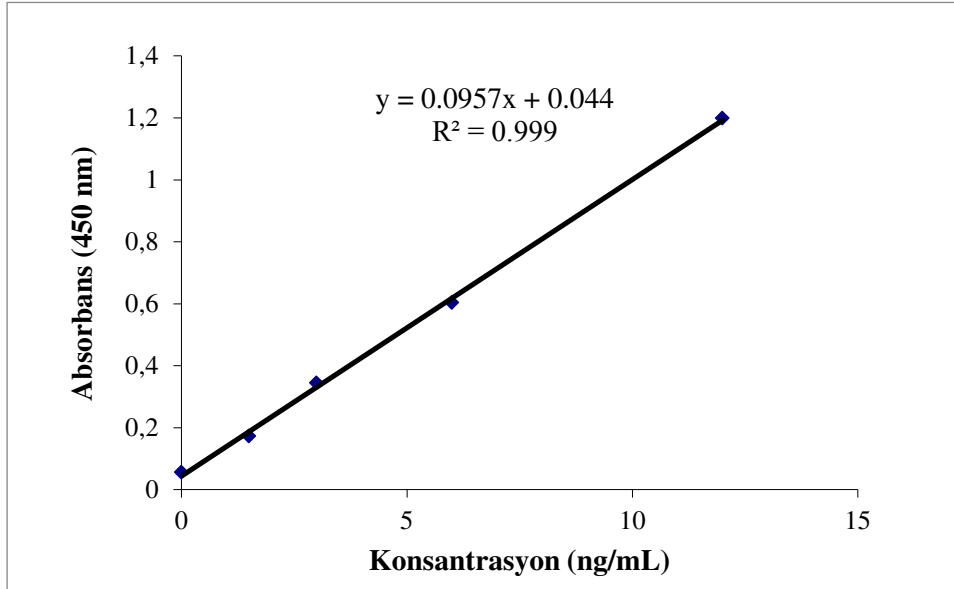
PBS (Fosfat Tamponu), 10 mM, pH 7.4:

8.02 g NaCl, 0.18 g KCl, 0.863 g Na₂HPO₄, 0.471 g NaH₂PO₄ tartılarak 900 mL saf suda çözüldü. pH'sı 1M NaOH ile 7.4'e ayarlanarak saf su ile son hacim 1L'ye tamamlandı.

5.6.2. Homojenizasyon Aşaması

Yağ dokusunun yaklaşık 150 mg'lık kısmı ependorfta olan 500 µL soğuk homojenizasyon çözeltisi (PBS) içine konuldu. Bütün örnekler aynı zamanda sıvı azot'ta (-196 °C) yaklaşık 45 saniye donduruldu, ardından 2- 8 °C'de çözündükten sonra tekrar 500 µL PBS eklenerek her numune el homojenizatörü ile 6000 rpm'de 30 saniye homojenize edildi. Daha sonra 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi, süpernatanı ayırarak alt faz kullanıldı.

Denervasyon markörü olarak kullanılan NE, retroperitoneal yağ dokusu numunelerinde Rat norepinefrin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kiti (katalog no 201-11-0515, Sun Red) ile ölçüldü. Dokuda NE ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Elde edilen standart grafiği Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Norepinefrin standart grafiği (Ahmadi Rendi’den, 73)

5.7. Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu TRİpure total RNA izolasyon kiti (Katalog no: 11667165001, Roche) kullanılarak yapıldı. Kit prosedürü modifiye edilerek sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. 140-160 mg arasında tartılan yağ dokularının RNAaz ve DNAaz’sız endorflarına konulduktan sonra üzerine 0.8 mL denatürasyon çözeltisi (TRİpure Roche) eklendi.
2. Örnekler el homojenizatorü ile 6000 rpm’de 15 saniye homojenize edildi.
3. Homojenize edilen numuneler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. 12000 g’de 10 dk +4 °C’de santrifüj edildi.
5. Santrifüj edildikten sonra tüplerin üst kısmında oluşan beyaz tabaka atıldı ardından ayını tüpün dibine dokunmadan ortadaki faz yeni bir tüpe alındı.

6. Üzerine 100 µL kloroform ilave edildi ve elle karıştırıldı.
7. 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 12000 g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
9. Oluşan iki fazın üst kısmı yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine eşit miktarda izopropil alkol ilave edildi (alt faz atıldı).
10. 10 dk 25°C'de inkübe edildi.
11. 12000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
12. Süpernatant tamamen atıldı.
13. 0.5 mL %75'lik etanol ilave edildi.
14. 7500 g'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
15. Süpernatant tamamen atıldı.
16. Ependorflar kapakları açık olarak oda sıcaklığında kurutuldu.
17. Tüplerin içinde kalmış olan RNA'ların üzerine 50 µL RNAaz'sız su (DEPC'li su) eklendi ve 10 dk 55 °C'de termomikserde inkübe edildi.

Elde edilen RNA örnekleri DEPC'li suda seyreltilerek 260/280 nm'de konsantrasyonları ve absorbands oranları nanodrop kullanılarak belirlendi (Elde edilen RNA'nın saflığı 260/280 absorbands oranına bağlıdır ve iyi bir RNA izolasyonu için bu oranın 1.6-1.9 arasında olması gerekir). Daha sonra Reverse Transkriptaz ile cDNA elde edildi.

5.8. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Ekstraksiyon sonunda elde edilen total RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla ticari cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit, katalog no04896866001, Roche) kullanıldı. Kit prosedürüne uygun olarak cDNA sentez işlemi yapıldı. Elde edilen cDNA örnekleri RT-PCR yapılmak için kullanıldı.

5.9. RT- PCR

RT-PCR’da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarlarıyla orantılı olarak artan floresans boyanın verdiği sinyalin izlenmesiyle belirlenir. RT- PCR’da ilgili genlerin ekspresyonlarını belirlemek için SYBR Green boyası kullanıldı. RT-PCR işlemi Roche Light Cycler 480 II marka cihazda (Roche, Germany) DNA master SYBR green I qRT-PCR kiti (katalog no 12239264001, Roche) prosedürü doğrultusunda yapıldı.

Sonuçların hesaplanmasında her bir örneğin hedef genin Cp değerinin (Adiponektin) o örneğin referans geninin (GAPDH) Cp değerine orantılayarak relatif kantifikasyon yapıldı. Kontrol grubuna göre artış ve azalışlar belirlendi. Sonuçlar *Arbitrary unit* olarak ifade edildi. Çalışmamızda kullandığımız primerler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer dizisi
Adiponektin	İleri primer 5’-TCA TTC CTG TCT GTA CGA GTG C-3’
	Geri primer 5’-CAT CCA ACC TGC ACA AGT TTC-3’
GAPDH	İleri primer 5’-ACA TGG TGA AGG CCG GTG T-3’
	Geri primer 5’-CAT TCT CAG CCT TGA CTG TGC-3’

5.9.1. Real Time PCR Protokolü

1- Amplifikasyonun (Büyütme) başlangıcında, reaksiyon karışımı denatüre cDNA’yı, primerleri ve SYBR Green boyasını içerir.

2- Primerlerin yapışması (Annealing): Bu aşamada primerlerin ortamda bulunan hedef DNA komponenti ile birleşmesi ve tekrar ayrışması olayı sonrasında, çok az boya molekülü çift zincire bağlanabilir. DNA’ya bağlanma sonucunda uyarıma bağlı olarak SYBR Green moleküllerinin ışığı yaymasında önemli bir artış olur.

3- Uzama (Elongasyon) sürecinde, daha çok boya yeni sentezlenen DNA’ya bağlanır. Yeni sentezlenen çift sarmal yapılı DNA molekülünün yapısına boya katılarak

zaman içerisinde floresans miktarında artışa neden olur. Gelecek ısıtma döngüsü için DNA denatürasyonuna bağlı olarak boya molekülleri salınırlar ve floresans ışımaya sinyali düşer.

Tablo 7. Örneklerin RT-PCR için hazırlanması

Enzimler için eklenecek reaktifler	Bir örnek için hacim (µL)	64 Örnek için hacim (µL)
RNaz'sız su	12.8	819.2
MgCl ₂ (25 mM)	1.2	76.8
10 µM ileri primer (500 nM final)	1	64
10 µM geri primer (500 nM final)	1	64
DNA master SYBR Green 10x (mix vial 1)	2	128
cDNA (her örnek için)	2	-

Tablo 8. RT-PCR Protokolü

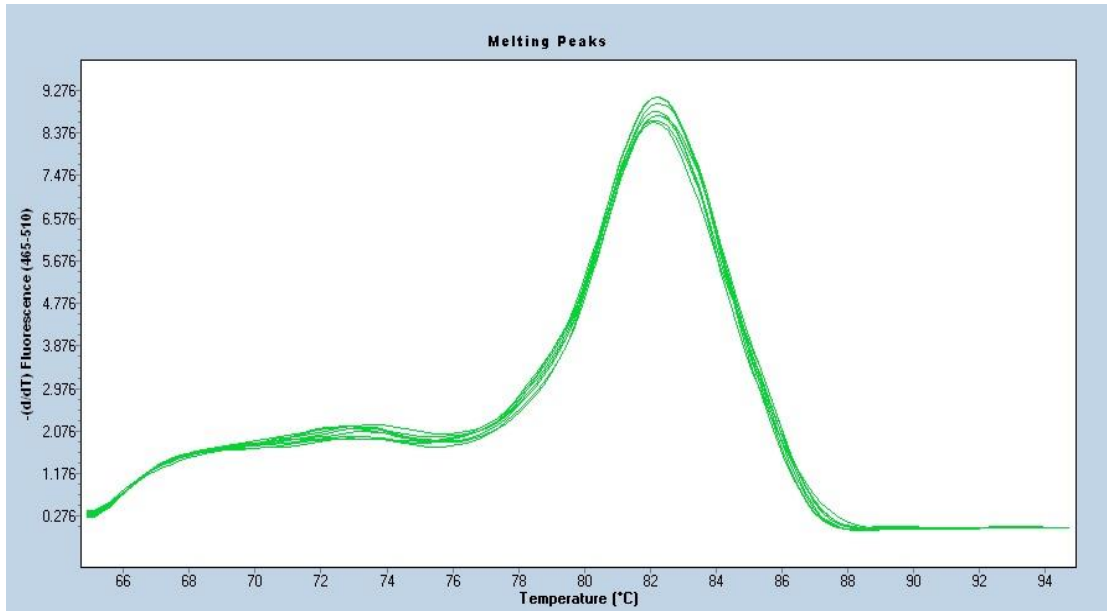
Program	Döngü	Analiz Modu
Ön inkübasyon	1	-
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrileri
Soğutma	1	-

Hedef Sıcaklık (°C)	Elde EtmeModu	Süre (hh:mm:ss)	Sıcaklık Artış Hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	00:08:00	4.4
Amplifikasyon			
95	-	00:00:10	4.4
58	-	00:00:07	2.2
72	Single	00:00:08	4.4
Erime Eğrisi			
95	-	00:00:05	2.0
65	-	00:01:00	2.0
97		Devamlı	
Soğuma			
40	-	00:00:10	2.0

Her PCR döngüsünün uzama basamağının sonunda floresans ışık şiddeti ölçümü amplifiye olmuş DNA'nın miktarındaki artışı monitörden izleyebilmek için yapılır. Sadece istenen PCR ürününün amplifiye olduğundan emin olmak için erime eğrisi analizi PCR'dan sonra yapılabilir. Erime eğrisi analizinde reaksiyon karışımı yavaşça 95°C'ye kadar ısıtarak çift zincirli DNA eritilir ve SYBR Green I floresansındaki sürekli azalış tespit edilir. Floresans ışık şiddetindeki bu azalış erime piki olarak monitörden görülebilir. Her bir erime piki DNA ürün partikülünün karakteristik erime sıcaklığını (T_m) gösterir. Erime sıcaklığı (T_m), çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya dönüşümünün %50'sinin tamamlandığı sıcaklıktır.

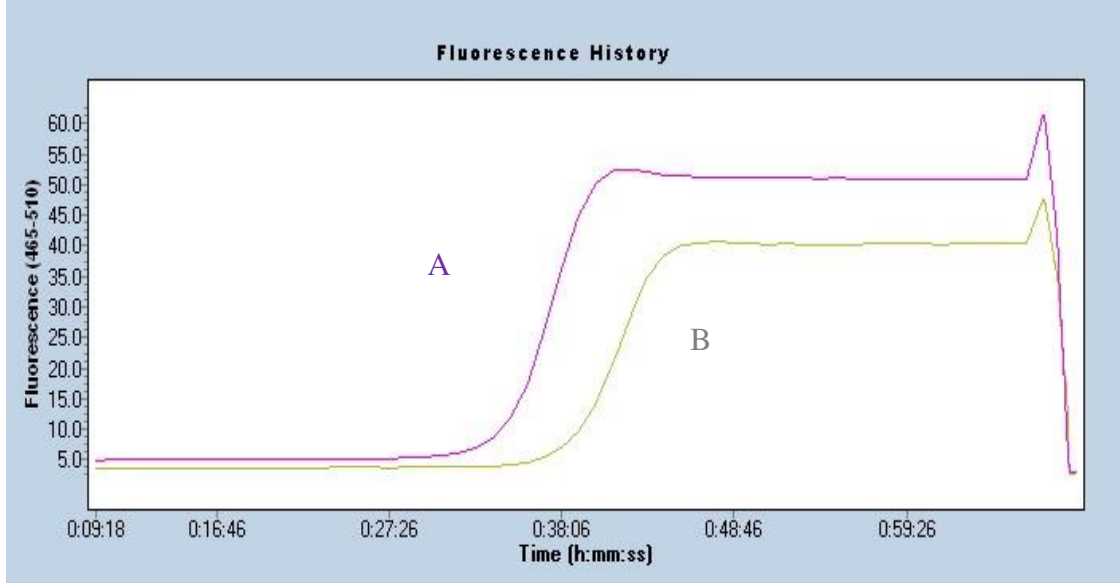
cDNA'ları oluşturulan her bir örnek için Tablo 7'deki gibi pipetlemeler yapıldıktan sonra Light Cycler 480 II (Roche, Germany) cihazında Tablo 8'deki program eşliğinde Real Time PCR yapıldı.

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz RT-PCR sonuçlarına göre kullandığımız primerlerin çalışmamıza uygun olduğu ve yan ürün oluşturmadığı gözlemlendi. Buna ilişkin örnek adiponektin erime noktası grafiği Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Adiponektin için erime noktası grafiği

RT-PCR çalışmasında adiponektin ve GAPDH'a ait amplifikasyon grafiği Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Amplifikasyon eğrileri. A: GAPDH, B: Adiponektin

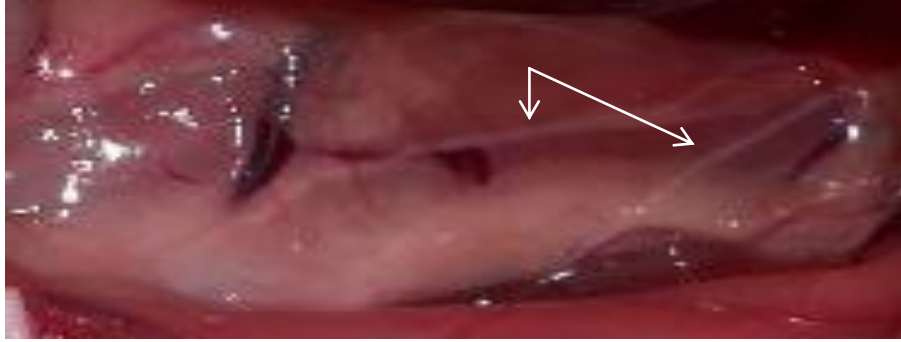
5.10. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak verildi. Grup ortalamalarının karşılaştırılması için Kruskal Wallis testi, Post-Hoc olarak da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

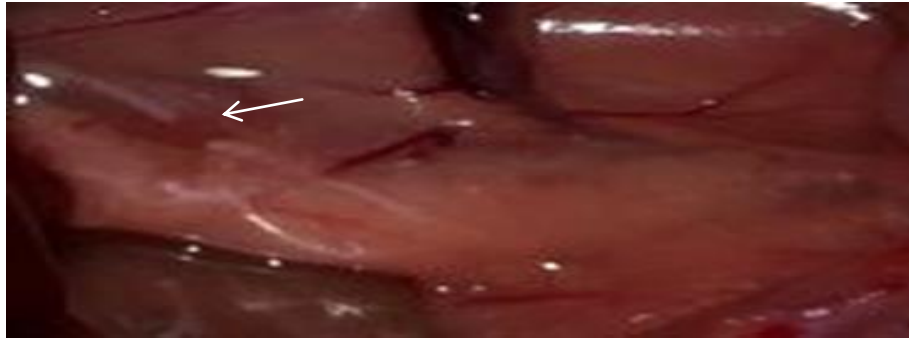
6. BULGULAR

6.1. Morfolojik Bulgular

İki grup denervasyon işlemi yapılmış ve iki grup sadece batın açılıp ve kapanmış şeklinde toplam 4 gruba ayrılarak gruplarına uygun sıçan yemleri ile 70 gün boyunca beslendi. Beslenme programı başlangıcında retroperitoneal yağ dokularının denerve edilmeyen sinir lifleri Şekil 9’da denerve edilen sinir lifi Şekil 10’ da gösterilmiştir.



Şekil 9. Beslenme programı başlangıcında denerve edilmeyen sinir lifleri



Şekil 10. Denerve olmuş sinir lifi

6.2. Çalışma Gruplarının Kilo Artışı ve Son Ağırlık Ölçümü Sonuçları

Çalışmamızda uyguladığımız beslenme periyodu sonucu grupların başlangıç ağırlık, son ağırlık ve toplam ağırlık artışı ortalamaları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Deney grupların kilo artışı ve son ağırlık sonuçları

Gruplar	Kullanılan Yem	Başlangıç Ağırlık Ort (g)	Son Ağırlık Ort (g)	Toplam Ağırlık artışı Ort (g)
YD+	Yüksek yağlı yem	125 ± 13.8	436.3 ± 49.5	280.6 ± 27.9
YD -	Yüksek yağlı yem	128.6 ± 14.7	454 ± 32.6 ^a	291.3 ± 20.8
SD +	Standart yem	123.5 ± 16	419.8 ± 30	269.8 ± 20.8
SD -	Standart yem	127.7 ± 10.7	392.3 ± 38	260.8 ± 20.1

(Ahmadi Rendi'den,73)

a. YD- grubu SD- grubuna göre p=0.007 düzeyinde farklıdır.

6.3. Serum Glukoz, TG ve İnsülin Ölçümü Sonuçları

Serum numunelerin açlık glukoz ve TG seviyeleri ölçümü Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Farabi Hastanesi rutin tıbbi biyokimya laboratuvarında ve serum insülin ölçümü SPI Bio firmasının Rat insülin ELISA ticari kiti ile yapılmıştır. 70 günlük periyodun sonunda yüksek yağlı uygulanan ve denerve edilmiş gruplarla, standart diyet ve denerve edilmemiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05). Grupların glukoz, TG ve insülin değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Deney gruplarının serum glukoz, TG ve insülin sonuçları

Gruplar	Glukoz (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)	İnsülin(ng/mL)
YD +	107.14 ± 16.85	80.62 ± 40.34	0.46 ± 0.53
YD -	104 ± 22.29	93.37 ± 28.62	0.39 ± 0.36
SD +	95.25 ± 19.79	113.75 ± 47.55	0.58 ± 0.45
SD -	112.42 ± 20.37	97.75 ± 58.58	0.74 ± 0.72

(Ahmadi Rendi'den, 73)

6.4. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Norepinefrin Ölçümü Sonuçları

Denervasyon markörü olan NE'nin, denerve edilmiş gruplarda ciddi bir düşüşü gözlemlendi ve diğer gruplara göre anlamlı fark belirlendi (p=0.037). Sonuçlar Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokusundaki norepinefrin sonuçları

Gruplar	NE (ng/mL) / Retroperitoneal doku (g)
YD+	126.85 ± 34.82 ^b
YD-	142.95 ± 73.45
SD+	125.54 ± 37.30 ^a
SD-	188.96 ± 28.21

(Ahmadi Rendi'den,73)

a. SD+ grubu SD- grubuna göre p= 0.005 düzeyinde farklıdır.

b. YD+ grubu SD- grubuna göre p= 0.007 düzeyinde farklıdır.

6.5. Retroperitoneal Yağ Dokusunun Ağırlık Ölçümü Sonuçları

Bütün gruplardaki hayvanlar sakrifiye edildikten sonra retroperitoneal yağ dokuları tartıldı ve gruplar arasında anlamlı fark bulundu (p=0.033). Grupların retroperitoneal yağ dokuları ağırlık ortalamaları Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokularının ağırlık sonuçları

Gruplar	Sağ Retroperitoneal doku ort. (g) ¹	Sol Retroperitoneal doku ort. (g)
YD+	5.04 ± 2.02	5.16 ± 1.6 ^c
YD-	4.96 ± 1.78	4.91 ± 1.71 ^b
SD+	4.84 ± 1.51	4.59 ± 1.51 ^a
SD-	3.09 ± 0.96	3.05 ± 0.97

(Ahmadi Rendi'den, 73)

1. Sağ retroperitoneal yağ dokusunda istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

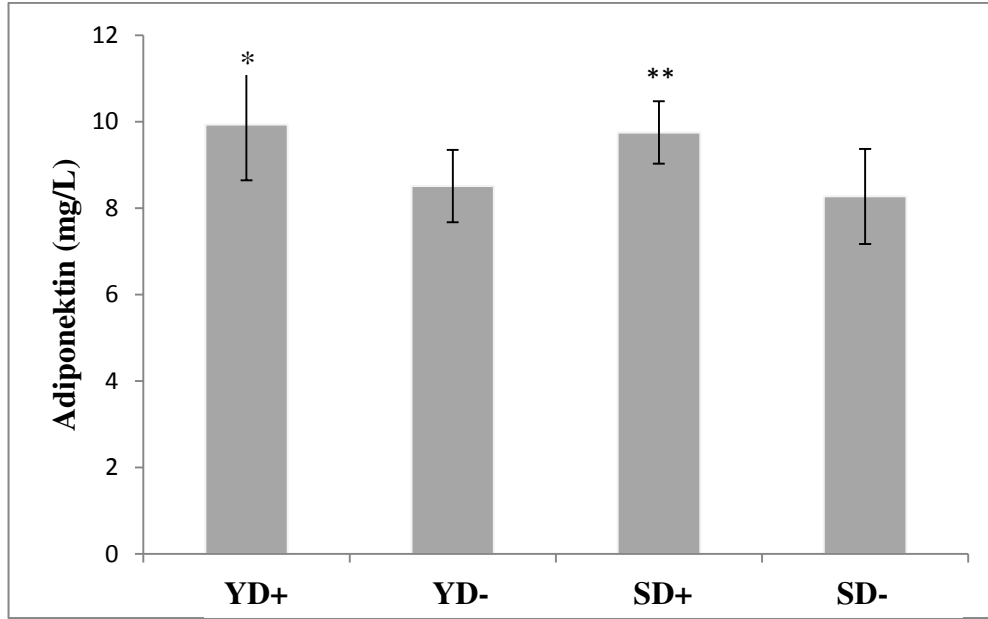
a. SD+ grubu SD- grubuna göre p=0.038 düzeyinde farklıdır.

b. YD- grubu SD- grubuna göre p=0.05 düzeyinde farklıdır.

c. YD+ grubu SD- grubuna göre p=0.004 düzeyinde farklıdır.

6.6. Serum Adiponektin Ölçümü Sonuçları

Serum adiponektin ölçümünde SunRed firmasının 201-11-0759 katalog nolu sıçan adiponektin ELISA kiti kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, yüksek yağlı diyet kullanan ve denerve edilen grubunda adiponektin seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (p= 0.01). Sonuçlar Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Deney gruplarının serum adiponektin ölçümü sonuçları

*, YD+ grubu YD- grubuna göre p=0.038 düzeyinde farklıdır.

**, SD+ grubu SD- grubundan p=0.009 düzeyinde farklıdır.

Adiponektin ile BKİ arasında negatif bir ilişki olduğundan serum adiponektin miktarı vücut ağırlığı başına da ifade edilerek değerlendirildi. Adiponektin değerleri vücut ağırlığı (g) başına da analiz edildiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu (p=0.010). Grupların son ağırlık ortalamaları ile birlikte adiponektin/vücut ağırlığı değerleri Tablo13'te verilmiştir.

Tablo 13. Deney gruplarının adiponektin /vücut ağırlığı sonuçları

Gruplar	Adiponektin (mg/L)	Ağırlık ort. (g)	Adiponektin (mg/L) / Vücut Ağırlığı (g)*1000
YD+	9.93 ± 1.29 ^{a,b}	436.25 ± 49.51	24 ± 5.4
YD-	8.51 ± 0.84	454 ± 32.54	20 ± 4.8
SD+	9.75 ± 0.72 ^c	419.75 ± 29.99	22 ± 4.3
SD-	8.27 ± 1.10	392.25 ± 37.71	21 ± 2.8

a. YD+ grubu SD- grubuna göre p=0.014 düzeyinde farklıdır.

b. YD+ grubu YD- grubuna göre p=0.038 düzeyinde farklıdır.

c. SD+ grubu SD- grubuna göre p=0.009 düzeyinde farklıdır.

6.7. Retroperitoneal ve Epididimal Yağ Dokularında Gen Ekspresyon Sonuçları

Retroperitoneal ve epididimal yağ dokularındaki adiponektin gen ekspresyonu değerleri ile birlikte Tablo 14'de gösterilmiştir. Gruplar arasında retroperitoneal ($p=0.023$) ve epididimal ($p=0.035$) gen ekspresyon açısından fark bulundu. Sonuçlar Tablo 14'te listelenmiştir.

Tablo 14. Deney grupların retroperitoneal ve epididimal yağ dokusundaki gen ekspresyon sonuçları

Gruplar	Retroperitoneal yağ dokusu (Arbitrary unit)	Epididimal yağ dokusu (Arbitrary unit)
YD+	0.93 ± 0.06^a	1.12 ± 0.12
YD-	0.91 ± 0.06^b	0.99 ± 0.09^c
SD+	0.86 ± 0.06	1.02 ± 0.09^d
SD-	0.87 ± 0.07	1.11 ± 0.05

a. YD+ grubu SD+ grubuna göre $p=0.040$ düzeyinde farklıdır.

b. YD- grubu SD- grubuna göre $p=0.029$ düzeyinde farklıdır.

c. YD- grubu SD- grubuna göre $p=0.021$ düzeyinde farklıdır.

d. SD+ grubu SD- grubuna göre $p=0.038$ düzeyinde farklıdır.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite dünya çapında yaygın bir sosyal problemdir (75). Obezite yağ hücrelerinin boyut ve sayılarının artmasıyla yakından ilişkilidir (76). Vücuttaki fazla miktardaki yağ birikimi tip 2 diyabet, hipertansiyon ve dislipidemiye içeren çeşitli metabolik risk faktörleriyle bağlantılı olarak kardiyovasküler hastalıkların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Obezitede özellikle visseral yağ birikimi kronik düşük düzeyli inflamasyona sebep olarak metabolik rahatsızlıkların başlamasına ve gelişimine katkı sağlamaktadır. Yağ dokusunun aktif bir endokrin organ olduğu ve adipokin olarak bilinen çeşitli molekülleri salgıladığı bilinmektedir. Obezitede yağ dokusundaki artış adipokin profillerini etkilemektedir ve bu adipokinlerin faydalı etkileri inhibe olmaktadır (75).

Obezitenin metabolik etkilerini araştırabilmek için *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Hayvan çalışmalarında obez farelerde genişleyen yağ hücreleri gözlemlenmiş ve tip 2 diyabet ve insülin direnci ile benzer durumlara neden olmuştur (77). Bu çalışmalarda obezitenin genellikle diyet kaynaklı olduğu düşünülerek farklı beslenme modelleri ile obezite oluşturulmuştur. Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda obezite, insülin direnci, hiperglisemi gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Yüksek karbohidratlı diyetlerle de TG seviyeleri yüksek ve insülin dirençli modeller oluşturabilmektedir. Her iki diyetle obeziteye sebep olmaktadır fakat yüksek yağlı diyetin obezite oluşumu üzerine etkisi daha belirgindir (4).

WAT, merkezi ve otonom sinir sistemi gibi çeşitli innervasyonlara sahiptir. SNS innervasyonunun lipolizi başlatmada ve yağ hücreleri proliferasyonunu düzenlemede oldukça önemli rolü vardır. Bilinen iki fonksiyonu olarak lipit mobilizasyonunu başlatması ve yağ hücre sayısının inhibisyonuyla WAT büyümesinin inhibitörü olmasıdır. Artan yağ hücresi proliferasyonu ve ardından gelen hiperselülarite obezitenin en karakteristik özelliğidir. SNS denervasyonunun *in vivo* yağ hücreleri proliferasyonunu artırabildiği ve NE vasıtasıyla öncül yağ hücrelerinin *in vitro* proliferasyonunu azaltabildiğini desteklemektedir (78).

Otonom sinir sisteminin yağ dokusu üzerindeki etkilerini incelemek için sinir liflerinin devre dışı bırakıldığı denervasyon deneyleri kullanılmaktadır. Sempatik sinir sisteminin denervasyonun başarısını göstermek için, doku NE miktarı ölçülmektedir (9). Sempatik uyarının azalmasına bağlı olarak yağ dokusundaki NE miktarı azalmaktadır.

Retroperitoneal yağ dokusunda yaptığımız NE ölçümlerinde standart yem kullanan gruplarda denervasyonun net bir şekilde norepinefrin miktarını azalttığı görülmüştür ($p=0.005$, Tablo 11). Yüksek yağlı diyet kullanan gruplarda denervasyona bağlı olarak NE miktarında azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 11, $p>0.05$). Harris'in 6 hidroksi dopamin kullanarak yaptığı tek taraflı denervasyon çalışmasında, 4 haftanın sonunda denerve edilmiş yağ pedlerinde kontralateral pedlere göre norepinefrin miktarında ciddi bir artışın olduğu, bunun denerve edilmiş pedlerdeki genişlemenin (hücre sayısındaki artış) bir sonucu olduğu ifade edilmiştir (9). Ayrıca, yüksek yağlı diyet kullanan hayvanlarda norepinefrin miktarındaki düşüşün daha az olması, alınan fazla kaloringin doku metabolizmasında oluşturduğu değişikliğe bağlı da olabilir. Frasson ve arkadaşları beyaz yağ dokusunda denervasyonun glukoz kullanımı ve gliseroneogenez enzimlerinin sentezini etkilediklerini göstermişlerdir (79). Yüksek yağlı diyet kullanan grupta artmış metabolik yüke bağlı olarak da norepinefrin miktarında değişimler gözlenmiş olabilir.

Çalışmamızda sinir lifleri denerve edilmemiş hayvanlar karşılaştırıldığında, yüksek yağlı yem tüketen hayvanların standart yem tüketen hayvanlara göre daha fazla kilo aldığı gözlemlendi ($p=0.007$, Tablo 9). Denervasyon yapılmış hayvanlarda ise ağırlıkları yönünden herhangi bir fark gözlenmedi. Ancak, her iki grupta (YD+,YD-) standart yem tüketen denervasyon yapılmamış hayvanlara (SD-) göre daha yüksek ağırlık ortalamalarına sahip olduğu görüldü. Genel olarak standart yem tüketen hayvanlarda denervasyonun belirgin bir kilo artışına sebep olduğu, yüksek yağlı yem tüketen hayvanlarda ise denervasyona bağlı bir fark oluşmadığı görüldü. Bu sonuç, yüksek yağlı yem tüketimine bağlı beslenme davranışı değişikliğinin bir sonucu olabilir. Yağ dokusundan salgılan bazı faktörlerin (leptin, adiponektin, nesfatin ve visfatin, gibi) enerji tüketimi ve iştahı düzenlediği bilinmektedir (80). YD+ ve YD- gruplarda alınan fazla kaloringin bir sonucuna olan değişiklik, SD+ grupta da gözlenmesi, retroperitoneal yağ dokularındaki artışa bağlı olabilir.

Yağ kütlesi, yağ hücrelerinin sayısı ve boyutlarının düzenlenmesi ile kontrol edilir. Birçok çalışma, sempatik sinir sisteminin yağ hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını kontrol ettiğini göstermiştir. Yağ hücresi apoptozu üzerine etkisi daha azdır (21). Sempatik aktivasyon beyaz yağ dokusunun gelişimini baskılar (81). Sempatik sinir sistemi denerve edilmiş deney hayvanlarında, beyaz yağ dokusunun hücre

proliferasyonuna bağılı olarak boyutlarının arttığı gösterilmiştir (21). Biz de çalışmamızda, denervasyon yaptığımız retroperitoneal yağ dokularını, SD- gruptaki hayvanların retroperitoneal yağ dokularına oranla daha ağır olduğunu bulduk ($p=0.038$, Tablo 12). Denervasyona bağılı dokudaki NE miktarındaki azalış, yağ dokularında hipertrofiye neden olmaktadır. NE öncül yağ hücrelerinin proliferasyonunu *in vitro* çalışmalarda inhibe eder. *In vivo* beyaz yağ dokusunun cerrahi ve farmakolojik (6 OH-DA uygulaması) denervasyonu hem ratlarda hem de Sibirya hamstırlarında beyaz yağ dokusundaki öncül yağ hücreleri ve yağ hücrelerinin sayısını ciddi anlamda artırır (82).

Beyaz yağ dokusunun iki ana metabolik yolu vardır. Birincisi, TG'lerin sentez ve depolanması, ikincisi bunların serbest yağ asitleri ve gliserole yıkılmasıdır (82). Yağ dokusunda lipit depolarının artması iki yolla gerçekleştirilir; birincisi dolaşımdaki lipoproteinlerle birlikte bulunan TG'lerin direkt alınımı, ikincisi ise lipogenik yollarca sentezi (TG'lerin glukozdan *de novo* sentezi). Bu anabolik yollar çok büyük ölçüde insülinin kontrolü altındadır (20). Yağ dokusunda lipolitik yollar üç ana faktör tarafından kontrol edilir: adiposit TG lipaz, hormon duyarlı lipaz ve perilipin A (83). Beyaz yağ hücresinde hem serbest yağ asitleri hem de gliserol diğer organlara yakıt sağlamak için kana verilir. Katekolaminler ve özellikle NE lipolizin kontrolünü, düzenleyen ana hormonlardır. Ancak insülinin antilipolitik etkisi katekolaminlerden daha baskındır ve insülin seviyesi düştüğü zaman bu hormonlar etkilidir (21). Deney gruplarında yaptığımız serum glukoz, TG ve insülin ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$, Tablo 10). Yüksek yağlı diyet kullanımına bağılı oluşan insülin direnci ve dislipidemi birçok çalışmada gösterilmiştir. Ancak, elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu çalışmalarda vardır (84). Bu farklılıkta kullanılan yağ kaynağı farklılığı kadar, diyetin uygulama süresi ve hayvan türü de etkili olabilir. Bu haliyle sonuçlar değerlendirildiğinde, yukarıda bahsedildiği gibi insülinin baskın antilipolitik etkisinin bir sonucu olarak, TG ve glukoz miktarlarında denervasyona bağılı değişiklikler gözlenmemiş olabilir.

Beyaz yağ dokusunda bazı bileşiklerin sentez ve salgılanması, diğer birçok faktörün yanı sıra, katekolaminler yolu ile sempatik sinir sisteminde de kontrol edilir. Adiponektin sentezi sempatik sinir sistemi tarafından baskılanmaktadır (21). Biz de çalışmamızda, serum adiponektin miktarını denerve edilmiş gruplarda, inhibisyonun kalkmasına bağılı olarak daha yüksek bulduk ($p<0.05$, Tablo 13). β -adrenoreseptor agonistleri aracılığıyla

diyabet (db/db) farelerin kronik tedavisinde plazmadaki adiponektin seviyeleri artmış ve insülin seviyesi azalmıştır. Fakat diğer taraftan yağ dokusundaki adiponektin reseptörleri değişmemiştir (85). Katekolaminlerin insülin duyarlılığını azalttığı ve sempatik sinir sisteminin aktivitesinin artmasıyla insülin direncinin olduğu bilinmektedir. Adiponektinin insülin duyarlılığını artıran bir adipokindir. Miktarının artması kaslarda yağ asiti transferini, oksidasyonunu ve enerji kaybını artırır. Bu süreç kaslarda trigliserit konsantrasyonunun ve serum serbest yağ asitlerinin azalmasına neden olur. Bu değişikliklerin sonunda kaslarda insülin sinyalizasyonu artar. Yapılan birçok çalışmada, β -adrenerjik uyarıların serum serbest yağ asitleri konsantrasyonunun artmasına sebep olduğu ve insülin reseptör substratları gibi insülin sinyalizasyonu için gerekli moleküllerin inhibe edildiği gösterilmiştir. β -adrenerjik aktivasyonun lipoliz ve insülin sinyal molekülleri üzerine doğrudan etkisin yanı sıra, insülin duyarlılığını artıran adiponektin miktarını azaltarak dolaylı olarak insülin direncini artırmaktadır (25).

Adiponektin sentezi ise denervasyondan bağımsız olarak retroperitoneal yağ dokusunda artmıştır. Her ne kadar obezite ile birlikte adiponektin miktarı azalsa da, yağ dokularının metabolik farklılıkları farklı sonuçları doğurabilmektedir (86).

Adiponektin sentezinin epididimal yağ dokusunda yüksek yağlı diyet kullanımına bağlı azaldığı, standart yem tüketen grupta denervasyona bağlı azaldığı görüldü (Tablo 13). Farklı yağ dokularının denervasyonu, farklı metabolik ve sekreatuar sonuçlar doğurmaktadır. Bu farklılık, beyaz yağ dokularındaki metabolik ve sekreatuar heterojenitenin esasen innervasyonlarına bağlı olduğu iddiasını güçlendirmektedir (21). Ancak yine de, yağ dokuları merkezi sinir sistemi üzerinden birbiri ile haberleşmektedir. Harisin yaptığı bir çalışmada, visseral yağ dokularının bazılarında meydana getirilen sempatik denervasyonun diğer denerve edilmemiş yağ dokularından tarafından algılandığı ve doku boyutları ile bazı proteinlerin sentezinde farklılıklar ortaya çıktığı gösterilmiştir. Doğrudan birbirleri ile iletişimi olmayan bu dokuların nöronal temelli mekanizmalarla bir birlerini algıladıkları ve farklı metabolik cevaplar oluşturdıkları düşünülmektedir (9).

Sonuç olarak, iki taraflı retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmiş sıçanlarda, yağ dokularındaki adiponektin ekspresyonunda, retroperitoneal yağ dokusunun ağırlığında ve serum adiponektin seviyelerinde diyetle ilgili farklılıklar bulunduğu görüldü. Gözlenen

değişikliklerin diyetin diğer yağ dokularına olan etkisinden kaynaklanabileceği kanaatine varıldı.

8. KAYNAKLAR

1. 10 Facts on obesity (2015). Electronic resources [online]. Available from:<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/en/index1.html> [17 Aralık 2015]
2. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A (2008). Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 409: 623-633
3. Caselli C (2014). Role of adiponectin in insulin resistance. *Mol Genet Metab* 113: 155-160.
4. Yamauchi T, Kamon I, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 1288-1295.
5. Silva AP, Guimarães DE, Mizurini DM, Maia IC, Ortiz-Costa S, Sardinha FL, do Carmo MG (2006). Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids* 41: 535-541.
6. Hariri N, Thibault L (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23: 270-299.
7. Akagiri S, Naito Y, and Yoshikawa T (2009). Diet and Metabolic Syndrome. *J Biol Macromol* 9: 39-48.
8. Panchal SK, Brown L (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 351982.
9. Harris RBS (2012). Sympathetic denervation of one white fat depot changes norepinephrine content and turnover in intact white and brown fat depots. *Adipocyte Biology* 20: 1355-1366.
10. Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y, Brichard SM (2002). Pre- and Post translational negative effect of β -adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J* 367: 677–685.

11. Alver A (2003). Sıçan yağ hücrelerinde leptin hormonu ile karbonik anhidraz III izoenzimi arasındaki etkileşimin in vitro incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
12. Gesta S, Kahn CR (2012). White adipose tissue. Adipose Tissue Biology (Ed: Symonds ME). Boston, 72-72.
13. Frühbeck G (2008). Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. Adipose Tissue Protocols (Ed: Yang K). Totowa, 1-19.
14. Peker E (2005). Soğuk stresine maruz bırakılan sıçanlarda damar düz kas aktivitesinin yağ dokusu ile ilişkisi. Yüksek lisans tezi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
15. Kahraman C (2013). Diyetle indüklenmiş obezitede yağ dokusundaki oksidan antioksidan dengenin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
16. Gesta S, Kahn CR (2012). White Adipose Tissue. Adipose Tissue Biology (Ed: Symonds EM). Boston, 83-84.
17. Dusserre E, Moulin P, Vidal H (2000). Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. Biochim Biophys Acta 1500: 88-96.
18. Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van-Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Sauerwein HP, Buijs RM (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intraabdominal fat–functional implications. J Clin Invest 110: 1243-1250.
19. İbrahim MM (2010). Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. Obes Rev 11: 11-18.
20. Giordano A, Song CK, Bowers RR, Ehlen JC, Frontini A, Cinti S, Bartness TJ (2006). White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. Am J Physiol 291: 1243-1255.

21. Pénicaud L, Lorsignol A (2013). Chatting Between the Brain and White Adipose Tissues. *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue* (Ed: Bastard JP, Fève B). Paris, 171-181.
22. Bartness TJ, Liu Y, Shrestha YB, Ryu V (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front Neuroendocrinol* 35: 473-93.
23. Kreier F, Buijs RM (2007). Evidence for parasympathetic innervation of white adipose tissue, clearing up some vagaries. *Am J Physiol* 293: 548-549.
24. Jones DD, Ramsay TG, Hausman GJ, Martin RJ (1992). Norepinephrine inhibits rat pre-adipocyte proliferation. *Int J Obes* 16: 349–354.
25. Fasshauera M, Kleinb J, Neumann S, Eszlingera M, Paschkea R (2001). Adiponectin gene expression is inhibited by L-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507: 142-146.
26. Odegaard JI, Chawla A (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Ann Rev Pathol* 6: 275–297.
27. Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M (2011). Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol* 32: 307–314.
28. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S (2011). NF- κ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metab* 13: 11–22
29. Blüher M (2010). Do adipokines link obesity to its related metabolic and cardiovascular diseases? *Clin Lipidol* 5: 95–107.
30. Blüher M (2012). Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Met J* 36: 317–327.
31. Hand LE, Usan P, Cooper GJS, Xu LY, Ammori B, Cunningham PS, Aghamohammadzadeh R, Soran H, Greenstein A, Loudon ASI, Bechtold DA, Ray DW (2015). Adiponectin induces A20 expression in adipose tissue to confer metabolic benefit. *Diabetes* 64: 128–136.
32. Kushner RF, Bessesen DH (2007). *Treatment of the Obese Patient*. Humana press, Totowa, 86-140.

33. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A (2005). Adiponectin induces TNF- α and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1254–1263.
34. Blüher M (2009). Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117: 241–250.
35. Bays HE (2009). “Sick fat,” metabolic disease and atherosclerosis. *Am J Med* 122: S26–S37.
36. Van Gaal LF, Mertens IL, DeBlock CE (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444: 875–880.
37. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11: 85–97.
38. Arita Y¹, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79–83.
39. Ouchi N, Kihara S, Arita Y (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103:1057–1063.
40. Yokota T, Oritani K, Takahashi I (2000). Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96:1723–1732.
41. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M (2008). Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *Circ Res* 102: 218–22.
42. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175–184.
43. Yamaguchi N, Argueta JG, Masuhiro Y (2005). Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett* 579: 6821–6826.

44. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A (2005). Adiponectin induces TNF- α and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1254–1263.
45. Turer AT, Scherer PE (2012). Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 55: 2319–2326.
46. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270: 26746–26749.
47. Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996). AdipoQ is a novel adipose specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697–10703.
48. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286–289.
49. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 120:803–812.
50. Arita Y¹, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y(1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79–83.
51. Szmitko P, Teoh H, Stewart D, Verma S (2007). Adiponectin and cardiovascular disease: state of the art? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: 1655–1663.
52. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T et al (2006). Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 29: 1357–1362.
53. Chakraborti CK (2015). Role of adiponectin and some other factors linking type 2 diabetes mellitus and obesity. *World J Diabetes* 6: 1296-1308.

54. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 1784–1792.
55. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ (2003). Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52: 1355–1363.
56. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339–343.
57. Zhu N, Pankow JS, Ballantyne CM et al (2010). High-molecular weight adiponectin and the risk of type 2 diabetes in the ARIC Study. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 5097–5104.
58. Davis KE, Scherer PE (2008). Adiponectin: no longer the lone soul in the fight against insulin resistance? *Biochem J* 416: 7–9.
59. 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.
60. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13: 332–339.
61. Vaiopoulos AG, Marinou K, Christodoulides C, Koutsilieris M (2012). The role of adiponectin in human vascular physiology. *Int J Cardiol* 155:188–193.
62. Pang TTL, Narendran P (2008). The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Ann N Y Acad Sci* 1150:143–145.

63. Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ (2004). Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 264–271.
64. Piñeiro R1, Iglesias MJ, Gallego R, Raghu K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F (2005). Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 579: 5163–5269.
65. Tan KC, Xu A, Chow WS, Lam MC, Ai VH, Tam SC, Lam KS. (2004) Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 765–769.
66. Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL (2009). Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Rev Cardiol* 6: 27–35.
67. Esfahani M, Movahedian A, Baranchi M, Goodarzi MT(2015). Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. *Iran J Basic Med Sci* 18: 430-442.
68. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10308–10313.
69. Awazawa M, Ueki K, Inabe K et al (2011). Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab* 13: 401–412.
70. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 8: 516–523.
71. Pischon T, Hotamisligil GS, Rimm EB (2003). Adiponectin: stability in plasma over 36 hours and within-person variation over 1 year. *Clin Chem* 49: 650–652.
72. Halberg N, Schraw TD, Wang ZV (2009). Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes* 58: 1961–1970.
73. Turer AT, Khera A, Ayers CR (2011). Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. *Diabetologia* 54: 2515–2524.

74. Ahmadi Rendi T (2015). Retroperitoneal yağ dokusu denervasyonunu takiben diyetle obez yapılmış sıçanlarda leptin sentezi ve serum leptin seviyelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
75. Ohashi K, Shibata R, Murohara T, Ouchi N (2014). Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends Endocrinol Metab* 25: 348-55.
76. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, Lujan J, Tebar FJ, Zamora S (2006). Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. *Int J Obes* 30: 899–905.
77. Tahergorabi Z, Rashidi B, Khazaei M (2013). Ghrelin does not alter aortic intima-media thickness and adipose tissue characteristics in control and obese mice. *Iran J Basic Med Sci* 16: 942–945.
78. Shi H, Song CK, Giordano A, Cinti S, Bartness TJ (2004). Sensory or sympathetic white adipose tissue denervation differentially affects depot growth and cellularity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 1028-37.
79. Frasson D, Boschini RP, Chaves VE, Santos ME, Paula Gomes S, Valentim RR, Garófalo MA, Navegantes LC, Migliorini RH, Kettelhut Ido C (2012). The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats. *Metab* 61:1473-85.
80. Rezai-Zadeh K, Yu S, Jiang Y, Laque A, Schwartzburg C, Morrison CD, Derbenev AV, Zsombok A, Münzberg H (2014). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab* 3: 681-93.
81. Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L (2000). The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity and energy balance. *Nutr* 16:903-908.
82. Foster MT, Bartness TJ (2006). Sympathetic but not sensory denervation stimulates whiteadipocyte proliferation. *Am J Physiol* 291:1630-1637
83. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A (2008). Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 409: 623-633

84. Zaman MQ, Leray V, Bloc'h JL, Thorin C, Ouguerram K, Nguyen P (2011). Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high-fat or high-fructose diets. *British J Nutr* 106: 206-210.
85. Fu L, Isobe K, Zeng Q, Suzukawa K, Takekoshi K, Kawakami Y (2007). Beta-adrenoceptor agonists downregulate adiponectin, but upregulate adiponectin receptor 2 and tumor necrosis factor- α expression in adipocytes. *Eur J Pharmacol* 569:155–162
86. Liu XX, Liu KY, Li P, Han S, Peng XD, Shen L (2014). Adiponectin is expressed in the pancreas of high-fat-diet-fed mice and protects pancreatic endothelial function during the development of type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 40: 363–372.

9.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 : "Retroperitoneal Yağ Dokusu Denevre Edilmiş Sıçanlarda Retroperitoneal ve Epididimal Yağ Dokularından Salgılanan Adipokin Profillerinin İncelenmesi"			
Çalışmacılar : Doç.Dr.Ahmet ALVER, Doç.Dr.Sinan CANPOLAT, Arş.Gör.Cemil KAHRAMAN			
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya			
Etik Kurul Dosya No 2013/ 29	Etik Kurul Toplantı Tarihi 28.05.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/09	Etik Kurul Karar No 06
Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Etem ALHAN'ın başkanlığında; "Retroperitoneal Yağ Dokusu Denevre Edilmiş Sıçanlarda Retroperitoneal ve Epididimal Yağ Dokularından Salgılanan Adipokin Profillerinin İncelenmesi" başlığını taşıyan çalışmanın, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (28.05.2013) Prof. Dr. Yavuz ÖZÖRAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı			

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Neslihan SAĞLAM
Doğum Tarihi	05.10.1988
Doğum Yeri	Kelkit / TÜRKİYE
Telefon	0537 798 25 78
Medeni Hali	Bekar
E-posta	neslihans.saglam@hotmail.com
Adres	KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya AbD, Trabzon

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans	KTÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2012-
Lisans	KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2005

Yabancı Dil	İngilizce
--------------------	-----------

