



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**YÜKSEK SÜKROZ İÇERİKLİ DİYETLE
BESLENMİŞ BEYİN KAYNAKLI
NÖROTROFİK FAKTÖR HETEROZİGOT
FARELERİN YAĞ DOKUSUNDA OKSİDATİF
STRESİN İNCELENMESİ**

Akın BODUR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**YÜKSEK SÜKROZ İÇERİKLİ DİYETLE
BESLENMİŞ BEYİN KAYNAKLI
NÖROTROFİK FAKTÖR HETEROZİGOT
FARELERİN YAĞ DOKUSUNDA OKSİDATİF
STRESİN İNCELENMESİ**

Akın BODUR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

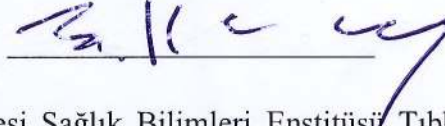
TRABZON-2017

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

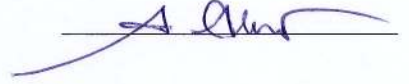
Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



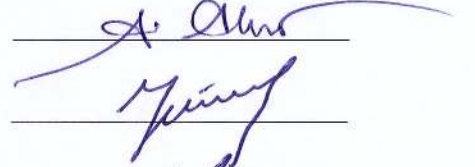
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Akın BODUR'un hazırladığı **“Yüksek Sukroz İçerikli Diyetle Beslenmiş Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör Heterozigot Farelerin Yağ Dokusunda Oksidatif Stresin İncelenmesi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ahmet ALVER



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

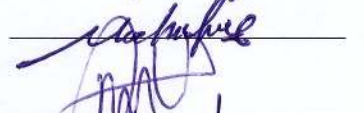
Prof. Dr. Ahmet ALVER



Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU



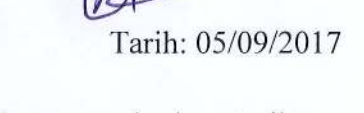
Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ



Prof. Dr. Birgül KURAL



Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih: 05/09/2017

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

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

Tarih: .././2017

Akın BODUR

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilimsel açıdan bana önemli katkı sağlayan, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösterici olan ve doktora eğitimime devam etmemde sürekli teşvik ve motive ederek eğitimimi tamamlamamı sağlayan danışman hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e öncelikle teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca doktora eğitimim boyunca bana katkı sağlayan başta Sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA ve Prof. Dr. Asım ÖREM olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Tezde kullanılan hayvanların teminini sağlayan, çalışma konusu hakkında bilgilerinden ve tecrübelerinden istifade ettiğim Sayın Doç. Dr. İsmail ABİDİN ve Doç. Dr. Selcen ABİDİN'e,

Lisans eğitimimin başından doktora aşamamın sonuna kadar aynı sıraları ve laboratuvarları paylaştığım, doktora çalışmamda çok büyük katkıları ve emeği olan değerli arkadaşım İmran İNCE'ye,

Deney hayvanlarının genotiplenmesi aşamasında, laboratuvarlarını kullanımımıza sunan Sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a ve asistanı Arş. Gör. İdris ER'e,

Doktora çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Ayşe ŞENTÜRK ve Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

KTÜ Farabi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda çalıştığım süre boyunca yardımlarını gördüğüm ve bilgilerinden faydalandığım tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma ve Acil Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım tüm personele,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde maddi kaynak sağlayan TÜBİTAK'a,

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Akın BODUR

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. BDNF ve Genel Özellikleri	6
4.1.1. BDNF'nin Enerji Metabolizması ile İlişkisi	8
4.2. Yağ Dokusu	10
4.2.1. Beyaz Yağ Dokusu	11
4.3. Adipokinler	13
4.3.1. Leptin	13
4.3.2. Adiponektin	14
4.3.3. Rezistin	14
4.4. Yağ Dokusu ve Obezite	15
4.5. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Obezite	16
4.5.1. Malondialdehit (MDA)	19
4.5.2. 4-Hidroksinonenal (4-HNE)	20
4.5.3. 3-Nitrotirozin (3-NT)	21
4.5.4. Antioksidan Enzimler	21
4.5.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	21
4.5.4.2. Katalaz (CAT)	22
4.5.4.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	22
4.6. Sukroz, Fruktöz Metabolizması ve Oksidatif Stres	23
4.7. Sukroz İçerikli Diyetler ve Obezite	25

5. GEREÇ ve YÖNTEM	27
5.1. Gereçler	27
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	27
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	29
5.1.3. Kullanılan Ticari Kitler	30
5.2. Yöntemler	31
5.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Uygulanan Prosedür	31
5.2.2. Farelerin Genotipinin Belirlenmesi	31
5.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	33
5.2.2.2. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	33
5.2.3. Deney Grupları	33
5.2.4. Serum Glukoz ve Triasilgliserol Seviyesinin Ölçümü	34
5.2.5. Serumda İnsülin Seviyesinin Ölçümü	35
5.2.6. Serumda Adiponektin Seviyesinin Ölçümü	35
5.2.7. Serumda Leptin Seviyesinin Ölçümü	36
5.2.8. Serumda Rezistin Seviyesinin Ölçümü	37
5.2.9. Serumda BDNF Seviyesinin Ölçümü	37
5.2.10. Serumda 4-HNE Seviyesinin Ölçümü	38
5.2.11. Serumda 3-NT Seviyesinin Ölçümü	39
5.2.12. Yağ Dokularında Protein İzolasyonu	39
5.2.13. Protein Miktar Tayini	40
5.2.14. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü	41
5.2.15. GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü	43
5.2.16. CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü	45
5.2.17. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	47
5.3. Gen Ekspresyonu Analizleri	49
5.3.1. Total RNA İzolasyonunda Kullanılan DEPC'li Suyun Hazırlanışı	49
5.3.2. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu	49
5.3.3. Total RNA İzolasyonu Sonucu Elde Edilen RNA Miktarının Belirlenmesi	51

5.3.4. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	51
5.3.5. RT-PCR Analizleri	52
5.3.6. Gen Ekspresyonu Çalışmalarının Analizi	56
5.4. İstatistiksel Analizler	57
6. BULGULAR	58
6.1. Farelerin Genotiplenmesi, Yağ Dokularının Görünümleri ve Haftalık Ağırlık Değişimleri	58
6.2. Serum BDNF Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	62
6.3. Serum Leptin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	63
6.4. Serum Adiponektin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	64
6.5. Serum Rezistin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	65
6.6. Serum 3-Nitrotirozin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	66
6.7. Serum 4-Hidroksinonenal Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	67
6.8. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda MDA Ölçümüne Ait Bulgular	68
6.9. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda SOD Aktivitesi Ölçümüne Ait Bulgular	69
6.10. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda CAT Aktivitesi Ölçümüne Ait Bulgular	70
6.11. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda GPx Aktivitesi Ölçümüne Ait Bulgular	72
6.12. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokularda Ölçülen SOD2, GPx3 ve CAT Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	73
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	82
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	100
9. KAYNAKLAR	102
10. EKLER	118
10.1. Beslenme süresince kullanılan standart yemin (D12450J) içeriği	118
10.2. Beslenme süresince kullanılan yüksek sukrozlu yemin (D12450B) içeriği	119
11. ETİK KURUL ONAYI	120
12. ÖZGEÇMİŞ	121

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler	27
Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları	29
Tablo 3. Kullanılan ticari kitler, üretici firmaları ve ürün kodları	30
Tablo 4. Genotiplemede kullanılan primer dizileri	32
Tablo 5. Genotiplemede uygulanan PCR prosedürü	32
Tablo 6. Genotipleme için PCR’de karışımların içeriği ve miktarları	32
Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları	42
Tablo 8. CAT aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları	45
Tablo 9. MDA seviyelerinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımı	47
Tablo 10. cDNA sentezi için hazırlanan karışımın içerdiği reaktifler ve miktarları	51
Tablo 11. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	53
Tablo 12. RT-PCR çalışmasında bir reaksiyon için kullanılan reaktifler	53
Tablo 13. RT-PCR çalışmasında uygulanan yöntem	54
Tablo 14. Farelerin başlangıç ve son ağırlıklarının ile glukoz, TAG, insülin konsantrasyonları ve HOMA-IR skorlarının gruplardaki dağılımı	61
Tablo 15. Serum BDNF seviyelerine ait değerler	63
Tablo 16. Serum leptin seviyelerine ait değerler	64
Tablo 17. Serum adiponektin seviyelerine ait değerler	65
Tablo 18. Serum rezistin seviyelerine ait değerler	65
Tablo 19. Serum 3-NT seviyelerine ait değerler	66
Tablo 20. Serum 4-HNE seviyelerine ait değerler	67
Tablo 21. Epididimal yağ dokudaki MDA seviyelerine ait değerler	68
Tablo 22. Subkutan yağ dokudaki MDA seviyelerine değerler	69
Tablo 23. Epididimal yağ dokudaki SOD aktivitelerine ait değerler	70
Tablo 24. Subkutan yağ dokudaki SOD aktivitelerinin değerler	70
Tablo 25. Epididimal yağ dokudaki CAT aktivitelerine değerler	71
Tablo 26. Subkutan yağ dokudaki CAT aktivitelerine ait değerler	71
Tablo 27. Epididimal yağ dokuda GPx aktivitelerine ait değerler	72
Tablo 28. Subkutan yağ dokuda GPx aktivitelerine ait değerler	73

Tablo 29.	Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal yağ dokudaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler	79
Tablo 30.	Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun subkutan yağ dokudaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler	80
Tablo 31	BHF’lerde yüksek sukrozun epididimal yağ dokularındaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler	80
Tablo 32.	BHF’lerde yüksek sukrozun subkutan yağ dokularındaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler	80
Tablo 33.	Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal yağ dokularındaki gen ekspresyonu zerine BDNF eksikliğinin etkisini gösteren değerler	81
Tablo 34.	Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin subkutan yağ dokularındaki gen ekspresyonu zerine BDNF eksikliğinin etkisini gösteren değerler	81
Tablo 35.	Standart WT (kontrol) grubuna göre diğer gruplardaki anlamlı değişimler	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. BDNF'nin üretimi ve salınımı için önerilen mekanizma	7
Şekil 2. Yağ dokusundan sentezlenen ve salgılanan bazı faktörler	12
Şekil 3. SOD, CAT ve GPx'in koruyucu özelliklerini gösterdiği reaksiyonlar	22
Şekil 4. Karaciğerde fruktoz metabolizması	24
Şekil 5. İnsülin standart grafiği	35
Şekil 6. Adiponektin standart grafiği	36
Şekil 7. Leptin standart grafiği	36
Şekil 8. Rezistin standart grafiği	37
Şekil 9. BDNF standart grafiği	38
Şekil 10. 4-HNE standart grafiği	38
Şekil 11. 3-NT standart grafiği	39
Şekil 12. Epididimal yağ dokularında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği	40
Şekil 13. Subkutan yağ dokularında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği	41
Şekil 14. Epididimal yağ dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	43
Şekil 15. Subkutan yağ dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	43
Şekil 16. Epididimal yağ dokularında GPx aktivesinin ölçüldüğü kitin kontrol grafiği	44
Şekil 17. Subkutan yağ dokularında GPx aktivesinin ölçüldüğü kitin kontrol grafiği	44
Şekil 18. Epididimal yağ dokularında CAT aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	46
Şekil 19. Subkutan yağ dokularında CAT aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	46
Şekil 20. Epididimal yağ dokularından elde edilen protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	48

Şekil 21.	Subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	48
Şekil 22.	Bir pleytin RT-PCR’da çalışılması sonucunda elde edilen tipik amplifikasyon grafiği	55
Şekil 23.	Bir pleytin RT-PCR’da çalışılması sonucunda elde edilen tipik erime eğrisi grafiği	55
Şekil 24.	PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	58
Şekil 25.	Dekapitasyon sonrası farelerin subkutan yağ dokularının görünümleri	59
Şekil 26.	Dekapitasyon sonrası farelerin epididimal yağ dokularının görünümleri	59
Şekil 27.	Standart ve sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip ve heterozigot farelerin ağırlıklarının değişim grafiği	60
Şekil 28.	Serum BDNF seviyelerinin gruplara göre dağılımı	62
Şekil 29.	Serum leptin seviyelerinin gruplara göre dağılımı	63
Şekil 30.	Serum adiponektin seviyelerinin gruplara göre dağılımı	64
Şekil 31.	Serum rezistin seviyelerinin gruplara göre dağılımı	65
Şekil 32.	Serum 3-NT seviyelerinin gruplara göre dağılımı	66
Şekil 33.	Serum 4-HNE seviyelerinin gruplara göre dağılımı	67
Şekil 34.	Epididimal ve subkutan yağ dokularında MDA seviyelerinin gruplara göre dağılımı	68
Şekil 35.	Epididimal ve subkutan yağ dokularında SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı	69
Şekil 36.	Epididimal ve subkutan yağ dokularında CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı	71
Şekil 37.	Epididimal ve subkutan yağ dokularında GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı	72
Şekil 38.	Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun SOD2 ekspresyonu üzerine etkisi	74
Şekil 39.	BHF’lerde yüksek sukrozun SOD2 ekspresyonu üzerine etkisi	74
Şekil 40.	Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin SOD2 ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisi	75

Şekil 41.	Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun GPx3 ekspresyonu üzerine etkisi	76
Şekil 42.	BHF’lerde yüksek sukrozun GPx3 ekspresyonu üzerine etkisi	76
Şekil 43.	Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin GPx3 ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisi	77
Şekil 44.	Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun CAT ekspresyonu üzerine etkisi	78
Şekil 45.	BHF’lerde yüksek sukrozun CAT ekspresyonu üzerine etkisi	78
Şekil 46.	Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin CAT ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisi	79



SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

3-NT	3-Nitrotirozin
4-HNE	4-Hidroksinonenal
BCA	Bisinkoninik Asit
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BHF	BDNF Heterozigot Fare
BYD	Beyaz Yağ Dokusu
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNL	De Novo Lipogenez
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GPx 3	Glutasyon Peroksidaz 3
HOMA-IR	Homeostatik Model Değerlendirme-İnsülin Direnci
mBDNF	Olgun Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
MDA	Malondialdehit
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
O₂⁻	Süperoksit Radikali
OS	Oksidatif Stres
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ProBDNF	Öncül Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
RNA	Ribo nükleik asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOD 2	Süperoksit Dismutaz 2
TAG	Triaçilgliserol
TrkB	Tropomiyozin-ilişkili Kinaz B

Simgeler

α	Alfa
μ	Mikro
γ	Gama
U	Ünite

Formüller

CuCl_2	Bakır (II) Klorür
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
H_3PO_4	Fosforik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
Na_2HPO_4	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaHCO_3	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit

1. ÖZET

Yüksek Sukroz İçerikli Diyetle Beslenmiş Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör Heterozigot Farelerin Yağ Dokusunda Oksidatif Stresin İncelenmesi

Sukroz içerikli gıdaların aşırı tüketiminin insülin direnci, hiperglisemi ve obezite gibi metabolik bozukluklara yol açtığı bilinmektedir. Obezitede yağ dokusundaki oksidan-antioksidan dengenin bozulmasıyla oksidatif stres (OS) artar ve adipositlerin fonksiyonu bozulur. Yağ dokularının heterojenliğinden dolayı adipokin profilleri farklıdır ve bunların fonksiyonları OS ile değişir. BDNF beyin, karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi enerji metabolizmasıyla ilişkili dokularda sentezlenen bir nörotrofindir. BDNF, nöronlarda çeşitli yollarla OS'yi azaltır. Çalışmamızda yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen transgenik farelerin epididimal ve subkutan yağ dokularındaki OS üzerine BDNF'nin etkisi incelendi. Standart ve yüksek sukroz içerikli diyetlerle dört ay beslenen wild tip ve BDNF (+/-) farelerden dört grup oluşturuldu. Serum 4-hidroksinonenal (4-HNE), 3-nitrotirozin (3-NT), leptin, rezistin, adiponektin, insülin ve BDNF seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Subkutan ve epididimal yağ dokudan elde edilen protein fraksiyonlarda SOD, CAT, GPx aktiviteleri ile MDA seviyesi ölçüldü. Bu dokularda SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonları SYBR Green I boyası kullanılarak RT-PCR'da belirlendi. Yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen transgenik farelerde serum leptin, 4-HNE ve 3-NT seviyeleri yüksek iken BDNF ve adiponektin seviyeleri düşük bulundu. Yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen transgenik farelerin subkutan yağ dokularında MDA seviyesi düşük bulundu. Tüm transgenik farelerin subkutan yağ dokularındaki SOD, CAT ve GPx aktiviteleri yüksek bulundu. Her iki tür diyet ile beslenen transgenik farelerin epididimal yağ dokusunda SOD2 ekspresyonları düşük bulundu. Her iki tür diyetle beslenen transgenik farelerin subkutan yağ dokularındaki CAT ekspresyonu düşük bulundu. Ancak aynı dokuda sadece standart diyetle beslenen transgenik farelerin GPx3 ekspresyonu düşük bulundu ($p<0.05$). Epididimal yağ dokudaki OS'ye karşı BDNF'nin koruyucu etkisinin olabileceği ancak subkutan yağ dokudaki verilerimizin bu değerlendirme için yetersiz kaldığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Epididimal Yağ Doku, Protein İzolasyonu, RT-PCR, Subkutan Yağ Doku

2. SUMMARY

Investigation of Oxidative Stress in Adipose Tissue of Brain Derived Neurotrophic Factor Heterozygous Mice Fed by High Sucrose Diet

It has known that overconsumption of sucrose content diets lead to metabolic dysfunctions such as insulin resistance, hyperglycemia and obesity. Oxidative stress increases with disruption of oxidant-antioxidant balance in adipose tissue. Adipose tissues have different adipokine profile because of its heterogeneity and these functions have change with oxidative stress. BDNF is a neurotrophin that synthesize in energy metabolism related regions such as liver, muscle, brain and adipose tissue. BDNF reduces oxidative stress in neurons by some pathways. In our study, BDNF's effects were investigated on oxidative stress in epididymal and subcutaneous adipose tissues of sucrose content diet fed transgenic mice. Four groups were constituted with standard and high sucrose contained diet fed wild type and BDNF (+/-) mice for four months. Serum 4-HNE, 3-NT, leptin, resistin, adiponectin, insulin and BDNF levels were measured by ELISA method. SOD, CAT, GPx activities and MDA levels were measured in protein fractions that obtained from subcutaneous and epididymal adipose tissues. In these tissues SOD2, GPx3 and CAT expressions were determined by using SYBR Green I dye in RT-PCR. While leptin, 4-HNE and 3-NT levels were found high, adiponectin and BDNF levels were found low in high sucrose diet fed transgenic mice. MDA levels were found low in subcutaneous adipose tissue of high sucrose diet fed transgenic mice. SOD, CAT and GPx activities were found high in subcutaneous adipose tissues of all transgenic mice. SOD2 expressions were found low in epididymal adipose tissue of both of two types of diet fed transgenic mice. CAT expressions were found low in subcutaneous adipose tissue of both of two types of diet fed transgenic mice. However, only GPx3 expressions were found low in that tissue of standard diet fed transgenic mice ($p < 0.05$). It can be mentioned that BDNF may have a protective effect against oxidative stress in epididymal adipose tissue but our data were insufficient in subcutaneous adipose tissue for that evaluation.

Key Words: Antioxidant, Epididymal Adipose Tissue, Protein Isolation, RT-PCR, Subcutaneous Adipose Tissue

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Sukroz, glukoz ve fruktozun anomerik karbonları üzerinden α -(1→2) glikozid bağı aracılığıyla birleşmesi sonucu oluşan bir disakkarittir. Sukrozun içeriğinde bulunan bu monosakkaritler, insan ve hayvanların enerji metabolizması tarafından kullanılan temel kaynaklardır. Glukoz, tüm canlı türlerinde bulunan glikoliz yolunun ana substratı olması nedeniyle canlılık için esastır. Ayrıca beyin, renal medulla gibi dokuların doğrudan kullanabildiği tek enerji kaynağı olması yönünden çok önemlidir. Glukozun aksine fruktoz, insan vücudundaki tüm hücreler tarafından doğrudan enerji kaynağı olarak kullanılamaz. Karaciğer, bağırsak ve böbreklerde fruktoz öncelikle glukoz, laktat veya yağ asitlerine çevrilerek bu dokularda ihtiyaca göre kullanılır (1).

Fruktoz, memelilerin standart diyetinde bulunan ve tüketimi son yıllarda sukroz ve yüksek fruktozlu mısır şurubu katkılı gıdaların (% 55 fruktoz, % 45 glukoz) tüketimine bağlı olarak önemli derecede artan bir monosakkarittir. Fruktoz içerikli gıdaların aşırı tüketiminin insülin direnci, hiperglisemi, hipertrigliseridemi, obezite ve hipertansiyon gibi metabolik bozukluklara doğrudan yol açtığı bilinmektedir. Fruktozun hangi metabolik yolda kullanıldığı, fruktoz içerikli diyetle maruz kalma süresi ve diyetteki fruktozun oranı bahsedilen metabolik bozuklukların şiddetinde belirleyicidir. Ayrıca fruktozun metabolik akıbetini belirlemesinden ötürü bireyler arasındaki fruktoz emilim kapasitesi, endokrin ve genetik farklılıklar bahsedilen metabolik bozuklukların gelişiminde önemlidir. Fruktoz, diğer monosakkaritlerden farklı olarak doyumluk hissi vermez ve beyindeki iştaha duyarlı bölgelerin aktivitesini de azaltarak sonuçta kilo artışına sebebiyet verir. Fruktoz bağımlı kilo artışından dolayı yağ dokusu büyür ve bu dokuda OS artar. Fruktoz kaynaklı obezitenin yanı sıra diğer metabolik bozukluklara bağlı olarak ta sistemik OS indüklenebilir (2, 3). Ancak bu etkilerin tümüne doğrudan fruktozun bizzat kendisinin neden olduğu konusu tartışmalıdır (4, 5).

Obezite, yağ dokusunda gelişen OS ve düşük dereceli inflamasyon ile karakterize olan metabolik bozukluktur. Obezitede yağ dokusundaki oksidan-antioksidan dengenin bozulmasıyla OS artar. Yağ dokusunun genişlemesiyle artan hipertrofik ve hiperplazik adipositler, OS'nin artmasına sebep olan başlıca unsurlardır. Hipertrofik adipositler, artan OS ile beraber gelişen bölgesel inflamasyonu indükleyerek yağ dokusunun fonksiyonunu bozar. Yağ dokusunun yerleşim farklılığından dolayı, vücudun farklı

bölgelerindeki yağ dokularının sentezleyip salgıladığı adipokinlerin profilinde ve miktarında farklılıklar görülür. Obeziteye bağlı olarak beyaz yağ dokuda (BYD) artan OS'in bazı adipokinlerin düzensiz sentezlenmesine yol açtığı ve bu durumun çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir (6-8). Yağ dokusunda inflamatuvar hücrelerin birikmesi insülin direnci ve tip 2 diyabete yol açar. Yağ dokusunun genişlemesiyle beraber BYD'de gelişen OS ile adiponektin ve rezistin gibi adipokinlerin sentezindeki bozukluklar da insülin direncinin gelişmesine katkı sağlar (6, 9, 10).

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) sinir sisteminin gelişimi ve korunmasında rolü olan ve nöronların yanı sıra beyin, karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi enerji metabolizmasıyla ilişkili dokularda sentezlenen bir nörotrofik faktördür. BDNF, nöronlarda antioksidan enzimlerin aktivitesini artırır. BDNF'nin reseptörü olan tropomiyozin-ilişkili kinaz B (TrkB)'nin aktivasyonu nöronal biyoenerjetik, glukoz taşınmasını ve mitokondriyal biyogenezi uyarak destekler ve OS'yi azaltır. BDNF'nin Alzheimer ve Huntington hastalığı ve depresyon gibi nörolojik bozuklukların patogenezi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (11). Son yıllarda enerji metabolizması ile ilgili araştırmalar, BDNF'nin merkezi sinir sistemi yoluyla iştahın kontrolü ve enerji sarfiyatını artırması üzerine odaklanmıştır. Ancak BDNF'nin ve reseptörü olan TrkB'nin sentezlendiği ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayan beyaz yağ dokusu üzerine bu bağlamda yapılan araştırmalar sınırlıdır. Çalışmamızda *in vivo* olarak BDNF'nin epididimal ve subkutan yağ dokudaki oksidan-antioksidan dengeye, yüksek sukroz kullanımına bağlı bu dokulardaki OS'ye ve bazı serum adipokin seviyelerine etkisi transgenik hayvan modellerinde araştırıldı. Bunun yanı sıra BDNF (+/-) farelerde diyetle bağlı olarak, adipokin salgılama profili bakımından farklı olan epididimal ve subkutan yağ dokularında bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu da bu dokulardaki oksidan-antioksidan durumu değerlendirme bakımından belirlendi. Bu bağlamda, çalışmada vücut ağırlığı ve enerji metabolizması ile yakından ilişkili olan BDNF'nin, yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen farelerin yerleşim ve karakteristik özellikleri farklı olan iki ayrı yağ dokusundaki OS üzerine etkisi transgenik hayvan modellerinde incelendi.

Çalışmamızda başlangıç ağırlıkları 10-15 g olan, 5 haftalık erkek C57BL/6J ırkı farelerin genotipleri klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle belirlendikten sonra, fareler wild tip (BDNF (+/+)) ve heterozigot (BDNF (+/-)) olarak tanımlandı ve dört gruba ayrıldı. Wild tip ve heterozigot fareler ikiye grup halinde standart ve yüksek sukroz içerikli diyetlerle (diyet içerikleri için Bkz. Ek 1 ve Ek 2) dört ay süreyle beslendikten sonra dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Farelerin subkutan ve epididimal yağ dokularından protein fraksiyonları ayrıldıktan sonra antioksidan durumu incelemek için bu fraksiyonlarda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ve oksidan durumu incelemek amacıyla malondialdehit (MDA) seviyeleri ölçüldü. Subkutan ve epididimal yağ dokularında yapılan total RNA izolasyonunu takiben elde edilen cDNA'lar kullanılarak Real Time-PCR (RT-PCR) yöntemi ile reaktif oksijen türlerinin artışına en ciddi katkıda bulunan SOD2, obez farelerin yağ dokusunda seçici olarak azaldığı gösterilen GPx3 izoenzimi ve obezite kökenli metabolik bozukluklarda savunma görevi olduğu bilinen CAT enzimlerinin gen ekspresyonları belirlendi (12, 13). Serumlarda OS belirteçlerinden olan 3-NT ile 4-HNE ve OS ile ilişkili olduğu bilinen adipokinlerden leptin, adiponektin ve rezistin enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) kitleriyle belirlendi. Ayrıca serum BDNF seviyeleri, transgenik hayvanlarda BDNF eksikliğini deneysel olarak gösterebilmek için ELISA kitleriyle belirlendi. Deney hayvanlarının genel metabolik durumunu incelemek için serum triaçilgliserol (TAG) ve glukoz seviyeleri otoanalizörde ve serum insülin seviyeleri ticari olarak satın alınan ELISA kitiyle ölçüldü. Bu kapsamda çalışmamızda, yüksek sukroz kullanımı ile indüklenen obezitede BDNF eksikliğinin farklı yerleşimli yağ dokularındaki OS üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

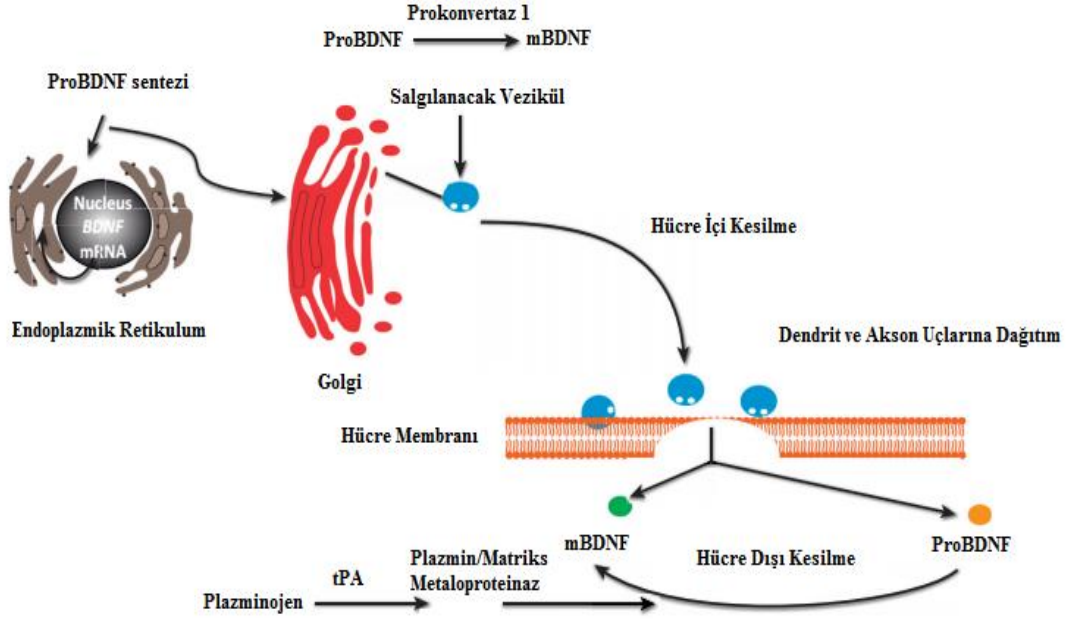
4. GENEL BİLGİLER

4.1. BDNF ve Genel Özellikleri

Nörotrofinler, periferel sinir sisteminden kültürü yapılmış nöronların farklılaşması ve hayatta kalmasını desteklenmesine dayalı işlevlerinin keşfedilmesiyle ilk kez ortaya konulmuştur. Sinir büyüme faktörünün (NGF) duyu ve sempatik nöronların hayatta kalması ve büyümesini desteklemesi üzerine etkilerinin keşfi 1950'lerin başında gerçekleşmiştir (14). 1982 yılında nörotrofin ailesinin tanımlanan ikinci üyesi olan BDNF'nin, dorsal kök ganglion nöronlarının hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiş ve ardından domuz beyininden saflaştırılmıştır (15).

BDNF merkezi ve periferel sinir sisteminin gelişimi, korunması ve plastisitesinde önemli rol oynayan bir nörotrofik faktördür. BDNF kök hücrelerden nöronların farklılaşmasını destekler, sinaptogenezi artırır ve apoptozu durdurabilir (16). BDNF'nin mRNA'sı endoplazmik retikulumda 32 kDa'luk öncül BDNF (proBDNF)'ye dönüştürülür. ProBDNF Golgi'ye taşınır ve protein konvertaz 1 enzimi aracılığıyla 14 kDa'luk olgun BDNF (mBDNF) oluşacak şekilde hücre içi proteolitik kesime uğrar. mBDNF ise granüller halinde aksonal ve dendritik uç bölgelere salınır. Nöronların aktivitesine bağlı olarak proBDNF ve mBDNF hücre dışına salgılanabilir. Ayrıca hücre dışında proBDNF, doku-tip plazminojen aktivatör veya metaloproteinazlar ile mBDNF'ye dönüştürülebilir (11, 16).

BDNF'nin ekspresyonu ve salınımı uyarıcı sinaptik aktivite ve özellikle nöropeptitler ve hormonlar tarafından uyarılır. Glutamat, uyarıcı sinapslardan salınarak sinaptik membran üzerinde bulunan reseptörüne bağlanır ve bunun sonucunda α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit, N-metil D-aspartat reseptörleri ve voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanalları yoluyla Na^{+} ve Ca^{+2} 'un alımı gerçekleşir. Kalsiyum iyonu Ca^{+2} -kalmodulin bağımlı protein kinazlar, protein kinaz C ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yollarını aktive ederek cAMP response element-binding protein ve nükleer faktör kappa-B (NF-kB) transkripsiyon faktörleri üzerinden BDNF sentezini indükler (11, 17). BDNF'nin üretimi ve salınımı Şekil-1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. BDNF'nin üretimi ve salınımı için önerilen mekanizma (Marosi'den, 11)

BDNF, fonksiyonel açıdan farklı olan p75 nörotrofin reseptör (p75NTR) ve TrkB'ye bağlanabilir. ProBDNF tercihen p75NTR'ye bağlanarak etki gösterir. p75NTR 4 adet sisteince zengin motife sahip hücre dışı domainin yanı sıra birer adet transmembran ve sitoplazmik domain de içerir ancak katalitik motif içermez. p75NTR çeşitli proteinlerle etkileşerek, sinaptik plastisite gibi nöronların hayatta kalmasını düzenleyen ve farklılaşmasını sağlayan sinyallerin iletimini sağlar (17, 18). p75NTR'nin nöroblast hücre serilerinde proapoptotik, primer nöron kültürlerinde antiapoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. p75NTR tümör nekroz faktör süperalesinin bir üyesi olup depresyon, Alzheimer hastalığı ve şizofreni gibi nörolojik bozukluklarla ilişkilidir (17, 19).

mBDNF'nin TrkB'ye bağlanması ile bu reseptörün dimerizasyonu ve otofosforilasyonu sağlanır. TrkB reseptörünün dimerizasyonu bazı adaptör proteinlerin bir araya toplanmasını indükler. Sonuçta TrkB'nin tirozin kinaz aktivitesini uyararak mBDNF fosfolipaz C- γ , fosfaditil inositol-3 kinaz ve MAPK sinyal yolları üzerinden nöronların gelişimine ve farklılaşmasına, sinaptik plastisiteye, hücrenin korunmasına ve hücrel metabolizmanın dengesine katkı sağlar (20). BDNF başlıca nöronlarda sentezlenmesine rağmen BDNF ve reseptörü olan TrkB'nin iskelet kası, kalp, karaciğer ve yağ dokusunda da sentezlendiği bilinmektedir (11, 21).

4.1.1 BDNF'nin Enerji Metabolizması ile İlişkisi

BDNF'nin TrkB'ye bağlanması fosfatidil inositol-3 kinaz ve Akt kinaz yolunu aktive eder. Akt, mTOR'u aktive ederek nöronal glukoz taşıyıcısı 3 (GLUT3) ve monokarboksilik asit 2 taşıyıcısının (MCT2) sentezini uyarır. Sonuçta hücre içine glukoz ve laktat alımı artar. BDNF, transient reseptör potansiyel Ca^{+2} kanalları vasıtasıyla hücreye Ca^{+2} alımını indükler. Ca^{+2} iyonları, Ca^{+2} /kalmodülin-bağımlı protein kinaz (CaMK) üzerinden cAMP response element-binding protein (CREB)'nin aktivasyonunu sağlar. CREB ise peroksizom proliferatör reseptör γ koaktivatör-1 α (PGC-1 α)'nin ekspresyonunu artırır. Nöronlarda PGC-1 α mitokondri sayısını artırır. Bu sayede nöronlara daha fazla ATP ve NAD^{+} sağlanır. NAD^{+} bağımlı bir deasetilaz olan sirtuin-1, forkhead box 3A (FOXO3a) transkripsiyon faktörünü aktive eder. FOXO3a'nın aktive olması mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) diğer ismiyle SOD2 enziminin sentezini artırır. Dolayısıyla BDNF TrkB'ye bağlanarak OS'ye karşı nöron hücrelerini korur (11). Bu sinyal yolları nöroplastisiteyi artırır ve nöronları çeşitli stres türlerine karşı korur. BDNF'nin sinaptik aktivite indüklü sentezi yoluyla TrkB'nin aktivasyonunun mitokondriyal biyogenezi ve Bcl2 ile SOD2 sentezini uyarması üzerinden, egzersizin sinaptik plastisite ve nöronal stres direnci üzerine yararlı etkilerine katkı sağlayabileceği ileri sürülmüştür (16).

BDNF (-/-) fareler, sinir sistemi gelişimindeki bozukluklar sebebiyle doğumdan sonra ölmektedirler. Ancak BDNF (+/-) fareler hayatta kalabilir ve hatta üreyebilirler. BDNF (+/-) farelerin wild-tip akrabalarından anksiyete, lokomotor aktivite, davranış gibi nöronal fonksiyonlarla beraber son zamanlarda hiperfajik, obez ve diyabetik karaktere yatkınlık açısından da farklılık gösterdikleri belirlenmiştir (22, 23). Farelerin hipokampal bölge ve ön beyinlerinde BDNF eksikliğinin obezite ve anksiyete gelişimini tetiklediği gözlenmiştir. Sinir sistemindeki BDNF sinyalizasyonunun enerji metabolizması üzerindeki etkisinin iştahı baskılamadaki tek yol olduğu bilinmesine rağmen, son çalışmalar enerji metabolizmasındaki nöroendokrin yollar ve organlar üzerine BDNF'nin düzenleyici etkilerinin daha fazla olabileceğini göstermiştir. BDNF'nin pankreas β hücreleri, hepatosit ve iskelet kasları gibi glukoz metabolizması ile ilişkili dokuları etkilediği de gösterilmiştir (11, 21). Gotoh ve arkadaşları, ratların beyinlerine BDNF infüzyonunun portal vendeki glukagon seviyelerini düşürdüğünü belirlemişlerdir (24). BDNF heterozigot farelerde (BHF) kilo alımının arttığı ve

farelerin yarısında yeme davranışındaki bozuklukların obeziteye yol açtığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, bu farelerde leptin direncinin geliştiğini ve insülin seviyelerinin arttığı da gözlemlenmiştir (25).

BDNF ve TrkB'nin iskelet kası hücrelerinde sentezlendiği bilinmektedir (17). İnsanlarda *in vivo* olarak BDNF mRNA ekspresyonunun egzersiz sonrasında arttığı ama bu kas türevli BDNF'nin dolaşıma salınmadığı ve ayrıca elektriksel uyarılan C2C12 hücre serilerinde BDNF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra bahsedilen çalışmada, BDNF'nin iskelet kasında AMPK fosforilasyonu üzerinden yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı ancak kas türevli BDNF'nin kan dolaşımında görülmediği *in vivo* ve *ex vivo* metotlarla gösterilmiştir (26). BDNF'nin bazı metabolik etkileri, periferik dokuların enerji tüketimindeki değişiklikler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Farelerde BDNF'nin hipotalamik enjeksiyonunun UCP-1 ekspresyonunu arttırdığı, ayrıca farelerin kahverengi yağ dokusunda termogenezin ve metabolik hızın artmasıyla toplam enerji tüketiminin arttığı bildirilmiştir (27). Farelerin hipotalamusunda TrkB'nin delesyonunun kilo alımına, artan adipositeye ve glukoz homeostazında bozulmaya yol açmasına rağmen arka beyinde TrkB'nin azalmasının hiperfajiye yol açtığı ancak toplam vücut ağırlığının bu değişimlerden etkilenmediği gösterilmiştir (28). Hayvan çalışmalarına paralel olarak insanlarda kalıtsal BDNF eksikliğinin obeziteye neden olduğu ve hatta genom çalışmaları da BDNF polimorfizmi ile obezite arasında bağlantı olduğunu göstermiştir (29, 30). BDNF'nin Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı ve depresyon gibi nörolojik hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmaların sonucunda, BDNF'nin özellikle obezite gibi enerji metabolizması ile ilgili bozuklukların da temelinde rol alabileceği ileri sürülmüştür (11, 17).

BDNF yüksek miktarda sentezlendiği ve iştahın düzenlenmesiyle yakından ilişkili olduğu bilinen ventromedial hipotalamusa (VMH) da etki eder. Ayrıca BDNF leptin ve proopiomelanokortin sinyal yolu üzerinden enerji alımını düzenler. VMH'de BDNF ekspresyonunun besinsel durum ve melanokortin 4-reseptörü (MC4R) üzerinden düzenlendiği gösterilmiştir (31). Komori ve arkadaşları 8-10 haftalık C57BL/6J ırkı farelerde yaptıkları çalışmada, intraserebroventriküler leptin uygulanmasının VMH'de BDNF miktarını arttırdığını göstermişlerdir (32). Leptin aracılı BDNF sentezinin artışı tamamen açıklanamamış olup, buna dair öne sürülen iki mekanizma vardır: Birinci

mekanizma, leptin ve reseptörünün etkileşiminin doğrudan sinyal iletim kaskadını tetikleyerek BDNF'yi VMH'de indüklediğidir. İkinci mekanizma ise arkuat çekirdekte (ARC) melanokortinin öncülü olan α -melanosit uyarıcı hormonun (α -MSH) leptin aracılı üretiminin, VMH'de BDNF'yi MC4R üzerinden aktive etmesidir. ARC'de sentezlenen nöropeptit Y (NPY), çoğu genellikle BDNF tarafından aracılık edilen hipotalamik anoreksigenik sinyallere karşı denge oluşturan bir hormondur. NPY, hipotalamik çekirdekte bulunan Y1 ve Y2 reseptörlerine bağlanarak oreksigenik cevabı uyarır ve BDNF sentezini inhibe eder. Paraventriküler çekirdekte (PVN) iştah ve enerji tüketiminin düzenlenmesi de BDNF aracılı gerçekleşir (21). Ratlarda yapılan bir çalışmada, BDNF'nin PVN'ye enjeksiyonunun besin alımını inhibe ettiği, metabolik hızı arttırdığı ve bunun sonucunda hayvanların zayıfladığı gösterilmiştir (33).

Yeşil çay, yaban mersini ve *Ginkgo Biloba* gibi flavonoidlerin BDNF üretimini uyarması veya TrkB'yi aktive etmesi metabolik ve beyin ile ilişkili bozuklukların tedavisinde potansiyel teşkil etmektedir. Bazı fitokimyasallar OS, enerji eksikliği ve inflamasyona karşı aktifleşen savunma sistemleri üzerinden hücrel strese cevap oluşturan yolları etkinleştirir. Sağlıklı genç ratların hipokampuslarının farklı bölgelerinde yaban mersininin içerdiği flavonoidlerin proBDNF ve mBDNF her ikisinde BDNF ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir (34, 35).

4.2. Yağ Dokusu

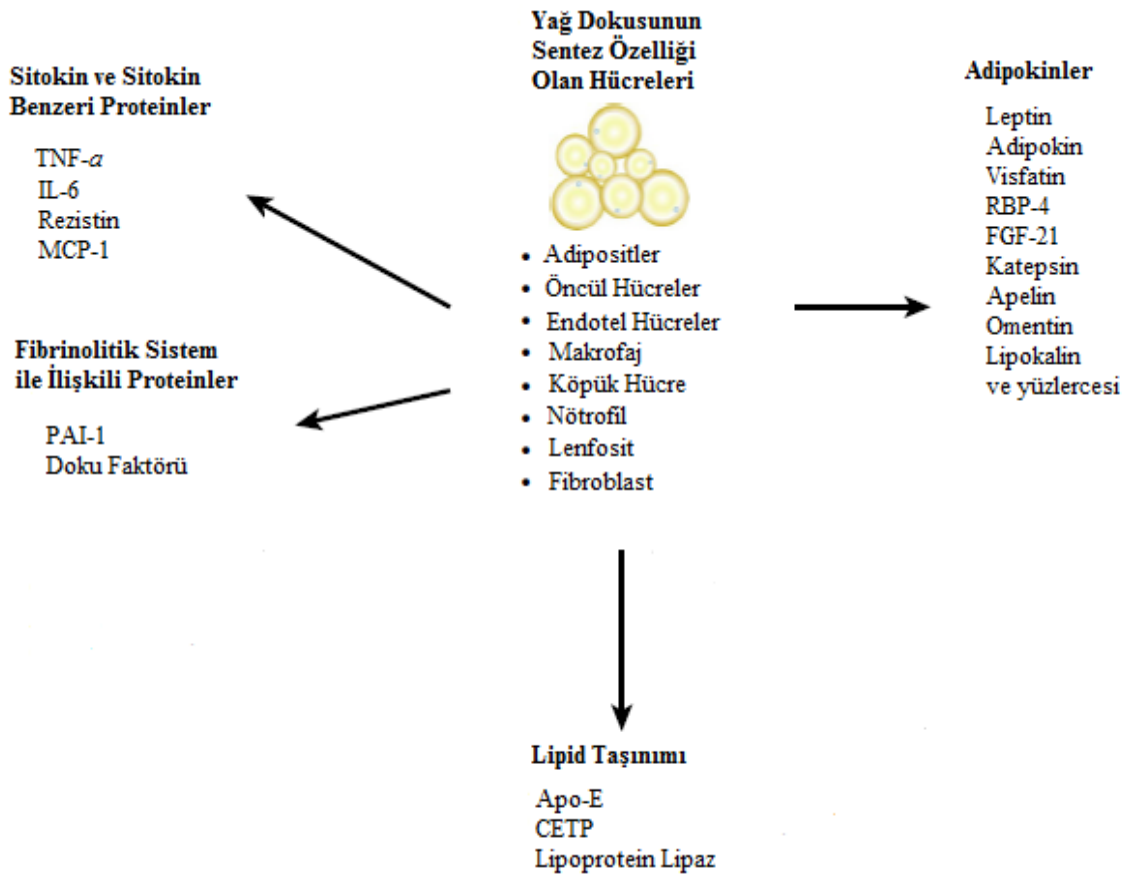
Yağ dokusu yapısı bakımından gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Bu dokudaki hücre tiplerinin yaklaşık üçte biri adiposit, geriye kalanlar ise stromal vasküler fraksiyondan oluşur. Stromal vasküler fraksiyonda endotel hücreler, fibroblast, makrofaj, monosit ve preadipositler gibi çeşitli hücreler bulunur (36). Hücreler kollajen fiberleri ve sayısız damarlardan oluşan ince bir ekstraselüler matriks tabakasıyla ayrılır. Yağ dokusu anjiyogenez, adipogenez, steroid metabolizması, immün cevap ve hemostaz gibi metabolik süreçlerde önemi olan heterojen bir dokudur (37).

Yağ dokusu hücre yapısı, yerleşimi, rengi, damarlanması ve fonksiyonuna bağlı olarak temelde beyaz ve kahverengi olmak üzere iki çeşittir. BYD vücudun başlıca enerji depolama bölgesidir. Kahverengi yağ dokusunda ise bol miktarda mitokondriye sahip hücreler bulunduğu için ısı üretimi ve enerji tüketimiyle özelleşmiş bir dokudur (37, 38).

4.2.1. Beyaz Yağ Dokusu

BYD'nin temel görevi adipositlerdeki yağ damlacıklarında TAG depolamak ve ihtiyaç halinde bu depolardan serbest yağ asitlerinin salınmasını sağlamaktır. Ayrıca metabolik düzenleme, glukokortikoid ve steroid hormon sentezi, kan basıncının düzenlenmesi gibi fonksiyonlara da katkı sağlar. BYD yerleşim bakımından subkutan ve viseral yağ doku şeklinde ikiye ayrılır. Subkutan yağ doku deri altında bulunur ve vücudu deri enfeksiyonlarına karşı korur, ısı düzenlenmesi ve yalıtımını sağlar. Viseral yağ doku ise karın içi bölgede iç organların çevresinde bulunur. Viseral yağ dokunun epididimal, inguinal, mezenterik, epikardiyal ve retroperitoneal gibi bölgesel farklılıklara dayanan çeşitleri vardır. Yağ dokusunun farklı çeşitlerinde, yağ hücresinin büyüklüğünün artışı (hipertrofi) ve preadipositlerin adipositlere dönüşerek adiposit sayısındaki artış (hiperplazi) ve bu artışların düzenlenmesi farklılık gösterir. Normal bireylerde morfolojik olarak viseral adipositler subkutan adipositlerden daha küçüktür (39). Yağ dokunun büyümesi, gelişimi ve homeostazında yağ dokunun damarlanması da etkilidir. Yağ dokusu boyutu kan akış kapasitesiyle doğrudan ilişkilidir. Gram doku başına viseral yağ dokudaki kan akışı, subkutan yağ dokuya göre daha yüksektir (40). Bölge olarak farklılık gösteren bu dokuların metabolizma üzerine etkisi, endokrin fonksiyonları, preadiposit karakteristiği, sentezleyip salgıladıkları proteinlerin profilleri ve yüksek yağlı beslenmeye cevap gibi fonksiyonlarının değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (37, 41). Viseral yağ doku insülin direnci gelişiminde toplam yağ ve subkutan yağ dokusuna nazaran daha fazla ilişkilidir. Viseral yağ doku subkutan yağ dokudan daha fazla lipolitik özellik gösterir ve plazma yağ asidi seviyesinin artışına daha fazla katkı sağlar. Subkutan yağ dokunun metabolik aktivitesi viseral yağ dokudan daha azdır ve dokular arasındaki bu farklılığın mitokondri içeriğindeki farklılıktan kaynaklandığı bilinmektedir (42). Epididimal adipositlerin mitokondri içeriği, subkutan adipositlere göre daha zengindir (43). İnsan ve kemirgenlerin beyaz yağ dokularındaki protein profillerinin de farklı olduğu gösterilmiştir (44, 45). C57BL/6J ırkı erkek farelerin farklı beyaz yağ dokularında yapılan kapsamlı çalışmada toplam protein içeriği, adiposit boyutları, çeşitli proteinlerin ekspresyon seviyeleri, depo kütleleri arasında farklılıklar gösterilmiştir. Aynı çalışmada epididimal yağ dokuların inguinal yağ dokuya göre geniş adipositler içerdiği ve bunların düşük protein içeriği, yüksek glukoz ve lipid metabolizması ile karakterize olduğu belirlenmiştir (46).

Viseral yağ doku tip 2 diyabet, obezite, kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik bozukluklarla daha yakından ilişkilidir. Hatta metabolik yönden özellikle mezenterik yağ dokunun salgıladığı proteinlerin portal dolaşım yoluyla karaciğere ulaşması nedeniyle diğer beyaz dokusu çeşitlerine göre daha önemli olduğu söylenmektedir. Aksine subkutan yağ dokusundan salınan protein ve lipidler inferior ve superior vena cavaya ulaşır (45-47). Ayrıca insanların viseral yağ dokusu subkutan yağ dokusuna kıyasla daha fazla proinflamatuvar özelliğe ve salgılama kapasitesine sahiptir (47). Yağ dokusundan sentezlenen bazı adipokinler ve faktörler Şekil-2’de verilmiştir.



Şekil 2. Yağ dokusundan sentezlenen ve salgılanan bazı faktörler (Fasshauer'den, 48)

4.3. Adipokinler

Yağ dokusu çeşitli metabolitlerin, lipidlerin ve biyolojik aktif peptitlerin diğer bir ifadeyle adipokinlerin sentezlendiği endokrin dokudur. Bu özellikler yağ dokusuna enerji metabolizmasını kontrol etme özelliği de kazandırmıştır. Bu düzenlenme adipositler ve yağ dokusundaki diğer hücrelerle veya beyin, karaciğer, kas gibi dokularda bulunan hücreler arasında endokrin, parakrin ve otokrin sinyallerle sağlanır (49). Adipokinlerin iştah ve doyunluğun düzenlenmesi, yağ dağılımı, insülin salınımı ve duyarlılığı, enerji tüketimi, endotel fonksiyon, inflamasyon, kan basıncı ve hemostaz gibi önemli metabolik olaylarda görevleri vardır (48). Leptin, adiponektin gibi adipokinler başlıca adipositlerde sentezlenir. Stromal vasküler fraksiyonda ise çoğunlukla tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) gibi inflamatuvar araçlar ve diğer interlökinlerin salınımı gerçekleşir (44).

4.3.1. Leptin

Leptin başlıca adipositler tarafından salgılanan 16 kDa ağırlığında peptit yapılı bir hormondur. Ayrıca eser miktarda stromal vasküler hücreler tarafından da salgılandığı söylenmektedir. Leptin hormonu denilince ilk akla gelen gıda alımını baskılayıcı ve kilo alımını azaltıcı özelliğidir. Ancak leptinin antiobezite hormonu olarak tanımlanması, obezitenin yaygın formunun yüksek leptin seviyeleri ve leptin direnci ile ilişkili olmasından dolayı sıkıntılıdır. Bu nedenle leptin, son yıllarda kilo kaybı sinyalizasyonundan ziyade enerji eksikliğinin sinyalizasyonundan sorumlu bir hormon olarak görülmektedir (37, 48). Dolaşımdaki leptin seviyesi yağ dokusu kütlesiyle paraleldir. Ancak açlığın başlangıcından hemen sonra leptin seviyesi azalır ve bu durum besinsel durumdaki ani değişimleri yansıtır. Leptin salgılanması yağ depolarına bağımlıdır ve visceral yağ dokusuna nazaran subkutan yağ dokusunda daha fazladır (37).

Leptin beyin, pankreas, karaciğer ve bağışıklık sisteminde etki gösterir. Ancak leptinin merkezi faaliyeti özellikle hipotalamus üzerinedir ve enerji homeostazı ile ilişkisi ve üreme fonksiyonları için önemi iyi şekilde karakterize edilebilmiştir. Düşük leptin seviyeleri aşırı beslenmeyi indükler ve enerji tüketimi, immünite, tiroid ve üreme hormonlarını baskılar. Metabolizma tarafından leptin seviyelerinin azaltılmasının, uzun süreli açlığa tedbir olarak enerji kullanımını kısıtlama ve enerji depolamayı arttırmaya yönelik bir adaptasyon olabileceği düşünülmektedir (50). Ayrıca leptinin damar tonusu

üzerine düzenleyici etkisi olduğu gösterilmiştir. OS durumunda, damara en fazla hasar veren moleküllerden biri olan peroksinitritin oluşumunda öncül olan nitrik oksit sentezinin leptin tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (51). Leptin, endotel hücrelerde ROS üretimini artırır (52). İnsan aort düz kas hücrelerinde, NADPH oksidazın protein kinaz C bağımlı aktivasyonu üzerinden ROS üretiminin artışında leptinin rolü olduğu gösterilmiştir (53).

4.3.2. Adiponektin

Adiponektin yağ dokusunda özellikle adipositlerde bol miktarda üretilen 30 kDa ağırlığında bir hormondur. Dolaşımında trimer, hekzamer ve yüksek molekül ağırlıklı olmak üzere başlıca üç formda bulunur. Birçok adipokinin aksine dolaşımdaki adiponektin seviyesi vücut kitle indeksi ile negatif yönde ilişkilidir ve obezlerde serumdaki miktarı azalır. Adiponektinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrozis özelliği sayesinde insülin direnci gibi metabolik hastalıklar üzerine faydalı etkiler gösterebileceği düşünülmektedir. Adiponektin yüksek glukoz veya okside LDL ile muamele edilmiş endotel hücrelerde O_2^- üretimini baskımlarken, gelişen OS yağ dokusunda adiponektin üretimini azaltır. Hipoadiponektinemi, insülin direncinden bağımsız alkolik olmayan steatohepatitin klinik özelliğidir. Adiponektin bu özelliğini yağ asidi yıkımını uyarması ve *de novo* lipogenezin (DNL) inhibisyonu üzerinden gösterir. Ayrıca adiponektin insülin gen ekspresiyonu ve insülin granüllerinin hücre dışına salınımının her ikisini de uyarak insülin salgılanmasını uyarır. Adiponektinin beyin üzerine etkisi ise enerji tüketimini arttırması ve kilo kaybını desteklemesi nedeniyle son yıllarda tedaviye yönelik bir hedef olarak gösterilmektedir (48, 49). Adiponektin eksikliği, damarda nitrik oksit azalmasına yol açar. Ayrıca lökosit adezyonu arttırır ve kronik vasküler inflamasyona neden olur (7). Obez insanlarda plazma adiponektin seviyelerinin OS belirteçlerinden olan MDA ile negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (8).

4.3.3. Rezistin

Rezistin ratlarda 114, insanlarda 108 amino asitlik peptit yapıda bir hormondur. Resistin, olgun adipositler ve makrofajlardan üretilen ve obezite ile insülin direnci arasında bağlantıyı oluşturabileceği düşünülen bir adipokindir. Rezistin proteini insanlar ve kemirgenlerde % 60 homoloji göstermektedir (7, 50). Kemirgenlerin aksine insan

adipositlerinde rezistin ekspresyonu düşüktür ve insan makrofajlarında ise fazladır. Obezitede ise rezistinin temel kaynağı olan makrofajlar BYD'ye infiltre olur ve sonuçta BYD bol miktarda rezistin içeren bir doku haline gelir. Kemirgenlerde rezistinin temel kaynağı BYD'dir ve ekspresyonu farklı yağ dokularında çeşitlilik göstermektedir. Rezistin üretimi beslenme ve obezite ile artarken PPAR γ ligandları ile azalır. Rezistin glukoz homeostazındaki rolü çeşitli hayvan modellerinde çalışılmıştır. Rezistin infüzyonu ve aşırı ekspresyonu, hepatik glukoz üretimi artışına bağlı olarak hiperglisemiye yol açar. Rezistin hipofiz bezindeki somatotrofik hücre fonksiyonlarını düzenleyerek merkezi sinir sisteminde anahtar rol oynar. Bu rolü sayesinde hipotalamik ve periferik insülin duyarlılığını, termogenezi ve beslenme davranışını etkiler (54, 55). İnsan koroner arter endotel hücrelerinde, rezistinin endotel nitrik oksit sentazı indükleyerek ROS üretimini arttırdığı ve p38 ile janus kinazı aktive ettiği gösterilmiştir. Sonuçta rezistinin OS üzerinde etkili olabileceği belirtilmiştir (56). Ayrıca 2015'te yayınlanan önemli bir derlemede, OS ve rezistin arasındaki ilişkinin obezite, inflamasyon ve ateroskleroz arasındaki etkileşimde erken ve merkezi patolojik bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (57).

4.4. Yağ Dokusu ve Obezite

Obezite, gelişmiş ve hızlı gelişen ülkelerde sedanter yaşam biçimine bağlı olarak dünya çapında yaklaşık 500 milyon yetişkin ve 40 milyon çocuğu etkileyen sosyoekonomik, metabolik, fizyolojik, hücrel ve moleküler yönü olan kronik bir sağlık problemidir (58). Vücutta aşırı ve anormal yağ dokusu birikimiyle karakterize olan obezitede, yağ dokusunun fizyopatolojik rolü ve ilişkili olduğu sağlık sorunları araştırmacıların bu konuya ilgisini önemli derecede çekmektedir. Bilim dünyasında yağ dokusunun sadece aşırı lipidleri depolayan inert bir doku olduğuna dair bakış açısı son yıllarda değişmiş olup, bu dokunun artık metabolik aktif bir doku olduğu kabul edilmiştir (38).

Yağ dokusunda temelde lipid metabolizması ile bağlantılı olan TAG depolama ve bu depolardan ihtiyaç halinde hidroliz ile açığa çıkan gliserol ve yağ asitlerinin kana verilmesi ve bunların enerji metabolizmasına katılmalarının yanı sıra adipositlerden özel fonksiyonları olan adipokinlerin salgılanması olayları gerçekleşir. Yağ dokusu enerji dengesinin ayarlanmasında nöroendokrin ve immün fonksiyonların düzenlenmesinde

aktif rol alan leptin, adiponektin, plazminojen aktivatör inhibitör-1, rezistin, visfatin, apelin gibi hormonal özellik gösteren adipokinlerin yanı sıra TNF- α , IL-6, monosit kemoatraktan protein-1 gibi proinflamatuvar sitokin ve kemokinleri de sentezleyip salgılar (37, 48). Bu protein yapılı moleküllerin yağ dokusunun genişlemesi ile dokudaki normal sentezlenme seviyeleri bozulur ve sonuçta obezitenin karakteristik özelliği olan düşük dereceli inflamatuvar durum ve adipositlerde fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Yağ dokusunda inflamasyon gelişimini anlamak için öncelikle yağ dokusunda farklı hücre tiplerinin bulunduğu ve bu hücreler arasında etkileşimlerin olduğu göz önüne alınmalıdır. Yağ dokusu adipositler, fibroblast, makrofaj ve preadipositleri içeren monosit stromal vasküler fraksiyonu gibi çeşitli hücre türlerini içerir ancak bu hücre türleri içinde bol bulunan ve metabolik olarak en etkin olan hücre türü visceral yağ doku için adipositlerdir (7). Normal durumda yağ dokusunda bulunan M2 makrofajlar, obezitede proinflamatuvar özellikteki M1 makrofajlara dönüşürler. Bu proinflamatuvar makrofajlar ölü adipositlerin çevresinde taç şeklinde birikirler. M1 makrofajların yağ dokusuna infiltrasyonu ile fibrosis, arteriyal bozukluklar ve insülin direnci gibi metabolik hastalıkların patolojisinde yer alan durumlara yol açar (59).

Yağ dokusunun genişlemesinin temel nedeni adipositlerin hiperplazi ve hiperfajiye uğramasıdır. Obezite, diğer bir deyişle adiposit hipertrofisi ve hiperplazisi makrofaj infiltrasyonu, endotel hücre aktivasyonu ve fibrözis ile de karakterizedir. Obezite ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, diyabet gibi metabolik komplikasyonların gelişimindeki merkezi rolün esasını özellikle beyaz yağ dokusundaki inflamatuvar durum oluşturmaktadır (48, 59).

Biyokimyasal açıdan obezite, enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlikten kaynaklanan patolojik bir durumdur. Metabolik enerjinin kaynakları olan karbohidrat, protein ve lipidlerin aşırı alımı obezitenin indüklenmesiyle yakından bağlantılıdır. Özellikle aşırı lipid alımı obezite şartlarının başlamasında önemli rol oynar (7, 48).

4.5. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Obezite

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlara sahip reaktifliği yüksek olan ve çevrelerindeki moleküllere bağlanarak modifikasyonlara sebep olabilen moleküllerdir. Yüksek konsantrasyonlardaki serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) lipid bileşenleri, karbohidratlar, proteinler ve DNA'yı hasara uğratar ve hücrenin normal

fonksiyonlarını bozar. Serbest radikallerin fizyolojik düşük konsantrasyonları normal hücre redoks durumu, hücre fonksiyonu ve intraselüler sinyalizasyon için gereklidir. Ancak patolojik durumlarda serbest radikaller aşırı üretilir ve sonuçta OS oluşur. Antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasından kaynaklanan OS'in MDA, 3-NT, 4-HNE, indirgenmiş glutatyon/yükseltgenmiş glutatyon ve protein karbonil gibi biyobelirteçlerle değerlendirilmesi çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. OS'nin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve obezite gibi patolojik süreçlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (60). Obezitenin sistemik OS'yi indükleyebileceği, daha da önemlisi OS'nin adipokinlerin düzensiz olarak üretilerek metabolik sendromun gelişimine katkı sağlayacağı belirlenmiştir (8).

Obezitede OS'ye katkı sağlayan birçok etken vardır. Bu etkenler arasında hiperglisemi, fazla kiloya bağlı artan kas aktivitesi, artan doku lipid düzeyi, yetersiz antioksidan savunma, kronik inflamasyon, endotel ROS üretimi ve hiperleptinemi gösterilebilir. Obez bireylerin durumuna bağlı olarak bu etkenlerden herhangi biri, diğerlerine göre OS'ye daha fazla katkı sağlayabilir (10).

Obezitede ROS üretiminin artışının temelde beş düzeyde olduğunu söyleyebiliriz (10, 60). Birincisi, obezite ile ilişkili OS'in artışın nedeni adipositler ve preadipositlerin proinflamatuvar sitokinlerin kaynağı olması nedeniyle, aşırı miktarda yağ dokusunun oluşumunun bizzat kendisi olabilir. Bu durumun sonucunda obezite, kronik inflamasyon durumu olarak da tanımlanır. Bunun dışında sitokinler ROS ve RNS'nin sentezini uyarırlar. Bu nedenle OS'nin artışı sitokin konsantrasyonunun artışına bağlı da olabilir. İkincisi, yağ dokusunun anjiotensin II salgılama kapasitesi vardır. Anjiotensin II NADPH oksidaz aktivitesini artırır. NADPH oksidaz ise adipositlerdeki başlıca ROS üretim kaynağıdır. Üçüncüsü, obezite mekanik yükü artırır ve miyokardiyal metabolizmayı hızlandırır. Sonuçta O₂ tüketimi artar. Mitokondriyal solunumda O₂ tüketiminin artması ROS üretimine neden olur. Üretilen elektronların kaybı elektron taşıma sisteminde O₂⁻ radikallerinin oluşumu ile sonuçlanır. Dördüncüsü, aşırı yağ birikimi yağ hücrelerinde oluşan basınçtan dolayı hücresel hasara neden olabilir. Hücresel hasar inflamasyon ile birlikte TNF- α 'nın aşırı üretimine yol açar. Böylece dokularda ROS oluşumu artar. Beşincisi, obezitede ROS oluşumunun diğer mekanizması diyet üzerinden olabilir. Aşırı gıda tüketimi oksijen metabolizmasını değiştirebilir ve oluşan aşırı O₂⁻ yıkım reaksiyonlarına karşı savunmasız olan yağ

depolarını etkiler (10, 60). Diğer taraftan elektron taşıma sistemi üzerine yüksek TAG'ın etkisi başka bir mekanizma olarak önerilmiştir. Hücre içi TAG'ın yüksek olması adenin nükleotidlerinin translokasyonunu inhibe eder ve O_2^- gelişimi desteklenir. Obezite uzun süre devam ederse antioksidan kaynaklar tükenebilir ve SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri azalabilir (8, 61).

Obezitede beyaz yağ dokusunda üretilen ROS'ların en önemli kaynaklarından biri NADPH oksidaz enzimidir. Memeli hücrelerinde NADPH oksidazın katalitik alt birimi için 7 izoform tanımlanmıştır. Bu izoformlardan biri olan NADPH oksidaz 4, aşırı glukoz ve palmitat seviyelerine bağlı olarak adipositlerde artar. Serbest yağ asitleri tarafından NADPH oksidaz aktivasyonunun moleküler mekanizması diaçilgliserol sentezinin uyarılması ile bağlantılıdır. Bu da protein kinaz C aktivasyonu ile bağlantılıdır ve NADPH oksidazın aktivasyonuna yol açar. ROS üretimi için önemli olabilecek diğer enzim nitrik oksit (NO) sentazdır. Patolojik durumlarda NO sentazın kofaktörü olan tetrahidrobiopterin veya L-Arginin düzeyi çok düşükse NO sentaz, NO yerine O_2^- üretir (10).

Obezite ile beraber genellikle diyabet gelişimi de gözlenebilir. Obezitede serbest yağ asitlerinin artışı oksidasyona duyarlı olan pankreatik hücrelere toksik etkiye bulunarak insülin salınımındaki değişiklikleri indükler ve diyabet gelişimine yol açabilir. Diyabet insülin direnci ve hiperglisemi ile karakterize olan patolojik bir durumdur. Hiperglisemi sonucu protein, lipid ve nükleik asitlerin glikozillenmesi sonucunda ileri glikozilasyon son ürünleri oluşur. Artan ileri glikozilasyon son ürünleri NF- κ B üzerinden adezyon moleküllerinin sentezini artırır ve ROS üretimi artar. Bunun yanı sıra hücre içinde glukoz seviyelerinin artışı poliolsu yolunu uyarır ve aşırı miktarda sorbitol oluşur. Aşırı sorbitol, p38, MAPK ve jun kinaz gibi OS ile ilişkili genleri aktive ederek oksidatif hasarın artmasına yol açar (62).

Aşırı kalori alımıyla adipositlerin lipid yükü artar ve adipositlerdeki mitokondrilerin substrat yükü artar. Sonuçta elektron taşıma sisteminin aktivitesi ve ROS üretimi artar. ROS hücresel lipidleri okside ederek lipid hidroperoksitlerinin üretimine neden olarak reaktif lipid aldehytlerinin üretimine yol açar. Bunlar hücre içi proteinleri, DNA, RNA, karbohidratları ve diğer lipidleri modifiye eder. Oksidatif fosforilasyondaki metabolik dengesizlik mitokondriyal bozukluk ile sonuçlanır.

Özellikle obezite ve tip 2 diyabet gibi patolojik durumlarda NAD^+/NADH , AMP/ATP oranı veya asetil CoA seviyeleri gibi mitokondriyal aktivite sinyalleri bozulabilir. ROS'un hücre içi seviyelerinin yüksekliği hücre hasara neden olmasına rağmen, makul düzeydeki ROS üretimi hücre homeostazının sürdürülmesinde önemlidir. ROS, hücre hasara yol açmadan preadiposit farklılaşmasını devam ettirmede oksidatif bir ortam yaratarak hücre homeostazının korunmasını da sağlayabilir. Klasik olarak mitokondriyal bozukluk, enerji talebine karşı oksidatif fosforilasyon üzerinden yeterli ATP miktarının üretiminde ve sürdürülmesinde mitokondrinin yetersizliği olarak tanımlanabilir. Aşırı besin tüketimi ROS oluşumuna ve seramid gibi toksik etkiye sahip lipidlerin üretimine yol açar. Ayrıca genetik faktörler ve ER stresi de mitokondriyal bozukluğa katkı sağlar. Mitokondri düzeyindeki değişimler ek lipid birikimiyle sonuçlanır ve insülin direncinin sürekliliği yönünden potansiyel risk oluşturur. Adiposit hücre homeostazı mitokondri ve ER arasındaki fonksiyonel ilişkiye de bağlıdır. Bu ilişki metabolik dengesizlik durumunda bozulabilir. Mitokondri dış membranı ile ER spesifik olarak birbirine bağlıdır. Bu bağlantılar mitokondri dış membranındaki lipid ve proteinler ile ER proteinleri arasında doğrudan bağlantı sağlar. ER yüksek strese maruz kalırsa mitokondriye Ca^{+2} sinyali aktarılır ve bu da ATP üretimi ve/veya hücre apoptoz ile sonuçlanabilir. Nihayetinde mitokondriyal bozukluğa katkı sağlanır. Obezite durumunda iskelet kaslarına ait mitokondriler de yüksek lipid yükü ile çevrelenir. β -oksidasyon ve TCA devri aktivitesi arasındaki kopukluk mitokondriyal lipid-indüklü OS'yi ve kas insülin direncini artırır. Kısaca kaslardaki TAG artışı, obezlerde görülen insülin direncinin asıl etkenidir diyebiliriz. Ayrıca seramid gibi toksik lipid türevleri insülin direncinin aday aracı olarak gösterilmektedir. $\text{TNF-}\alpha$, glukokortikoidler ve diyabetik ajanlar palmitoil CoA üzerinden seramid seviyesini artırır. Çünkü adipositlerdeki fonksiyon bozukluğunun temelinde, bu hücrede aşırı seramid sentezinin gerçekleşmesi yatmaktadır (63).

4.5.1. Malondialdehit (MDA)

Linoleik asit, araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin O_2 ile reaksiyonu çeşitli peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına yol açar. Lipid peroksidasyonunun birincil ürünü lipid hidroperoksitleridir. Lipid peroksidasyonu sürecinde MDA, 4-HNE, propanal, hekzanal gibi aldehitler ikincil oksidasyon ürünleri şeklinde meydana gelir.

Elektrofilik yapısından dolayı oldukça reaktif bir molekül olan MDA, OS biyobelirteci olarak sık kullanılan aldehit formunda bir üründür. MDA'nın enzimatik yoldan oluşumu belirlenmesine rağmen, enzimatik olmayan yollarla oluşumu hakkında varsayımlar mevcuttur. MDA lipid peroksidasyonu ürünlerinin en mutajenik olanlarından biridir. Fizyolojik pH'da MDA enolat anyonu olarak bulunur ve düşük kimyasal reaktivite gösterir. MDA seviyesini belirlemede, MDA'nın tiyobarbitürik asit ile türevlendirilmesi temeline dayanan yöntemler sıklıkla kullanılır (64). Doku MDA'nın proteinlerle reaksiyonu sonucu oluşan ürünler ateroskleroz, diyabet, Parkinson hastalığı ve obezite gibi patolojik durumlarla yakından ilişkilidir (65, 66). Literatürde yüksek sukroz içerikli solüsyonlarla beslenen kemirgenlerin karaciğer ve beyin doku homojenatlarındaki MDA seviyesinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (67, 68).

4.5.2. 4-Hidroksinonenal (4-HNE)

ω -6 çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyon ürünü olan 4-HNE, proteinlerle reaksiyona girerek bu proteinlerin fonksiyonlarını değiştirir. 4-HNE ile modifikasyona uğramış proteinlerin doku veya kandaki seviyesi, OS'in değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (69).

4-HNE üç tane fonksiyon grup içeren, dolayısıyla reaktivitesi yüksek olan bir moleküldür. C=C ve C=O grupları arasındaki konjugasyon, üçüncü karbon atomuna kısmi pozitif yük kazandırır. Bu pozitif yük, dördüncü karbon atomuna bağlı hidroksil grubunun indüktif etkisi tarafından daha da artırılır. 4-HNE'nin lipofilik özellikleri hidrofilik özelliklerinden daha belirgindir. Bu nedenle 4-HNE, hücreler arası sıvıdan ziyade biyolojik membranların yapısında bulunma eğilimi gösterir (70).

4-HNE, yüksek reaktifliği sayesinde birçok makromolekül ile etkileşir ve bu molekül yüksek toksik etkisi nedeniyle patolojik durumlara yol açabilir. Ayrıca otofaji, hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine dolaylı olarak etki eder ve bu etkinin diğer ROS ve stres aktive sinyalizasyon mekanizmalarından çoğu zaman ayırt edilmesi zordur (71). Son zamanlardaki yaklaşımlar, düşük 4-HNE seviyelerinin hücreyi OS aracılı hücre hasarından koruduğuna ancak yüksek 4-HNE seviyelerinin genotoksik etkileri artırarak apoptoza veya şiddetli hücre hasarına yol açtığına yöneliktir (72).

4.5.3. 3-Nitrotirozin (3-NT)

Proteinlerdeki tirozin rezidüleri peroksinitrit, azot dioksit radikali gibi nitrik oksit türevli oksidanlar ile asidik şartlarda reaksiyona girerek 3-NT şeklinde değişikliğe uğrar. Tirozin, *in vivo* olarak peroksidaz veya hem/hemoproteinler aracılığıyla NO₂⁻'nin NO₂'ye H₂O₂ bağımlı oksidasyonu ile nitratlanabilir. 3-NT, proteinlerin fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açar (73).

OS'nin önemli belirteçlerinden olan 3-NT nörodejeneratif hastalıklar, inflamasyon, diyabet gibi bozukluklarla ilişkilidir. Bu gibi patolojik durumlarda 3-NT seviyeleri yükselir (74). Güncel oksidatif biyobelirteçlerin incelendiği kapsamlı bir çalışmada, 3-NT'nin C-reaktif protein gibi bilinen inflamasyon belirteçlerinden daha fazla bilgi verici olabileceği iddia edilmektedir. 3-NT ölçümünün NADPH oksidaz ve miyeloperoksidaz gibi ROS üretimine katkı sağlayan enzimlerin inhibitörlerini içeren ilaç tedavilerinin takibinde yararlı olabileceği de düşünülmektedir (75).

4.5.4. Antioksidan Enzimler

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) yol açtığı OS'ye karşı biyolojik sistemleri korur. Çalışmamızda ölçülen SOD, CAT ve GPx'in yapısı, izoenzimleri ve antioksidan özellikleri ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

4.5.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD (EC 1.15.1.1) iki süperoksit radikalının H₂O₂ ve moleküler oksijene dönüşümünü gerçekleştirir. SOD enziminin CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) ve ekstraselüler SOD (SOD3 veya EC-SOD) olmak üzere üç adet izoenzimi bulunur. SOD ailesi ROS'lara karşı ilk savunma hattını oluşturur (13). SOD1 sitozolde homodimer şeklinde, SOD2 ise mitokondri matriksinde yerleşik haldedir. SOD2, O₂⁻ radikallerinin büyük bölümü mitokondride üretildiği için önemlidir. EC-SOD tetramerik ve glikozillenmiş yapıdadır. EC-SOD C-terminal bölgesinde heparin bağlama bölgesi içermesinden dolayı heparin ve diğer glikozaminoglikanlara karşı afinite gösterir. EC-SOD reperfüzyona hasarına karşı koruması, damar genişlemesini arttırması ve hipertansiyonu azaltması bakımından önemlidir (76).

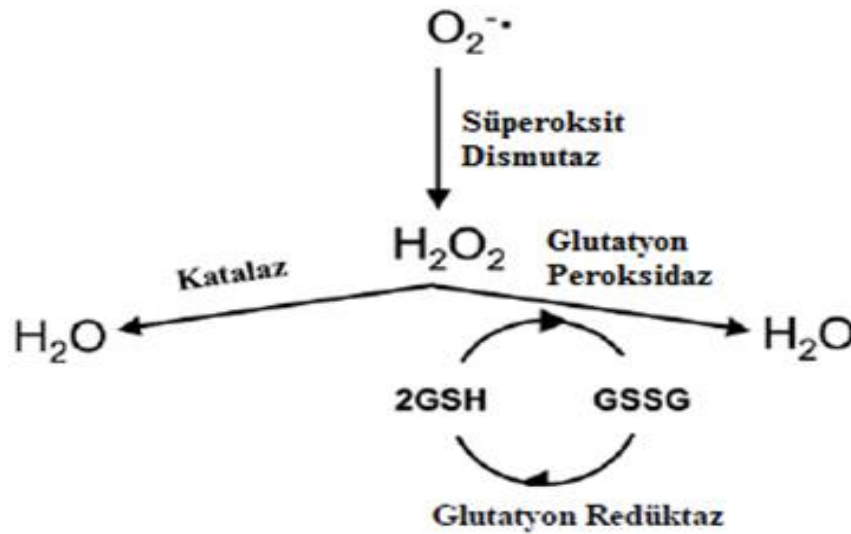
4.5.4.2. Katalaz (CAT)

CAT (EC 1.11.1.6), yapısında dört tane hem grubu içeren ve peroksizomlarda bulunan antioksidan özellikli bir enzimdir. Vücutta H_2O_2 'in fizyolojik seviyeleri aşılsa, bu reaktif molekül CAT tarafından elimine edilerek vücuttaki H_2O_2 konsantrasyonu kontrol edilir. CAT'ın bahsedilen klasik katalitik aktivitesine ek olarak peroksinitriti ayrıştırabilir, NO'yu NO_2 'ye okside edebilir. Ayrıca peroksidaz aktivitesi de gösterebilen bir enzimdir. Katalaz özellikle karaciğer, böbrek ve eritrositlerde yüksek aktivite gösterir (13, 77). Obezite kökenli metabolik bozukluklara karşı oluşan savunma mekanizmasında CAT'ın rolünün olduğu, tek nokta polimorfizmi çalışmalarında gösterilmiştir (13).

4.5.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

GPx (EC 1.11.1.9) yapısında selenyum bulunan ve dört alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Memelilerde GPx1-4 izoenzimleri, katalitik merkezlerinde selenosistein içerir. İnsanlarda ise sadece GPx6 bir selenoproteindir. GPx hidrojen peroksitli ortamda redükte glutatyonu okside glutatyona dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyon yardımıyla H_2O_2 'yi suya indirger. Okside glutatyon ise tekrar redükte glutatyona glutatyon redüktaz enzimi yardımıyla dönüştürülür (78).

SOD, CAT ve GPx enzimlerinin koruyucu özelliklerini gösterdiği reaksiyonlar toplu şekilde Şekil-3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. SOD, CAT ve GPx'in koruyucu özelliklerini gösterdiği reaksiyonlar (Aitken'den, 79)

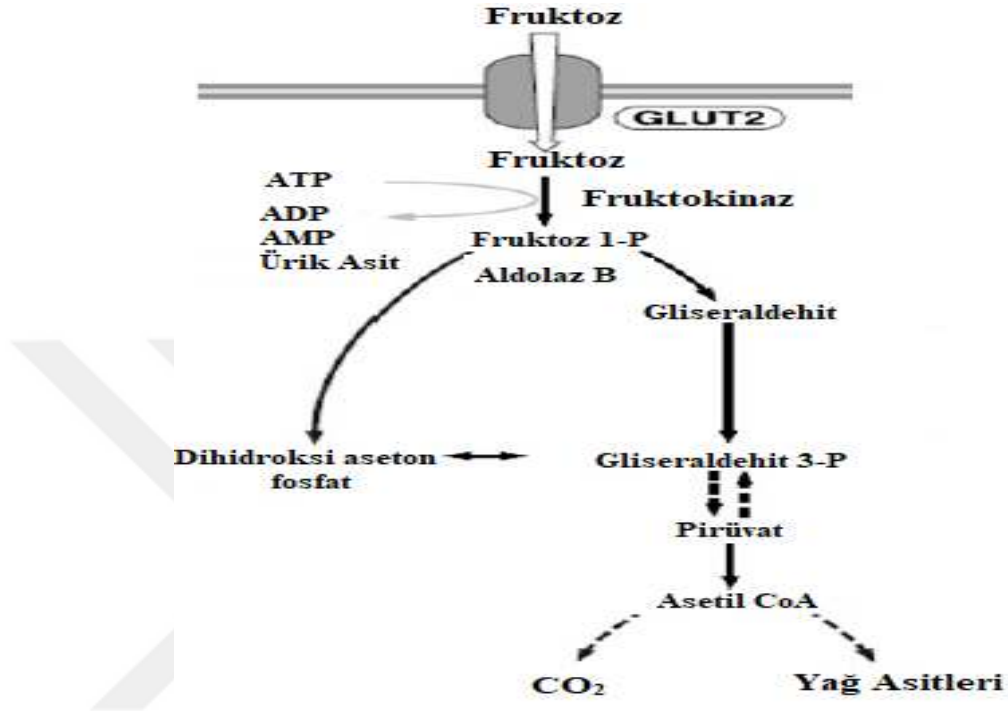
4.6. Sukroz, Fruktöz Metabolizması ve Oksidatif Stres

Sukroz, fruktoz ve glukozun anomerik karbonları üzerinden α -(1→2) glikozid bağı birleşmesi ile oluşan beyaz, kokusuz ve kristalize özellikli bir disakkarittir (80). Ağız yoluyla alınan sukroz α -amilaz tarafından hidrolizlenir ancak hidrolize sukroz burada kısa süre kalır ve ardından mideye geçer. Midede sukroz hidrolizi kayda değer değildir. Ardından sukroz, ince bağırsakta bulunan sukraz enzimi tarafından α -(1→2) glikozid bağının yıkımı gerçekleşir ve fruktoz ve glukoz monosakkaritleri açığa çıkar. Sukroz, metabolik etkisini bu monosakkaritler üzerinden gerçekleştirir (81).

Fruktoz, memelilerin standart diyetinde bulunan ve tüketimi son yıllarda sukroz ve yüksek fruktozlu mısır şurubunun tüketimine bağlı olarak önemli derecede artan bir monosakkarittir. Fruktoz içeren şekerlerin toksik olduğu hatta fruktozun lipogenezi destekleyerek hiperlipidemiye sebebiyet verdiği ve ayrıca glukoz homeostazını bozduğu belirtilmektedir (2). Glukozdan farklı olarak fruktoz, insanlardaki tüm hücreler tarafından doğrudan enerji kaynağı olarak kullanılamaz ve öncelikle karaciğer, bağırsak ve böbreklerde glukoz, laktat veya yağ asitlerine dönüştürülmeye gereksinim duyar. Yüksek termogenik etki, düşük glisemik indeks gibi olumlu yönlerine rağmen fruktozun glukoz ile beraber fazla alınması karaciğerde artan DNL ve bozulmuş kan lipid profili gibi metabolik değişikliklere yol açar. Fruktozun özellikle glukoz içeriğinin yüksek olduğu diyetlerle beraber fazla alınmasının, DNL yoluyla tip 2 diyabet, obezite gibi metabolik hastalıkların görülme riskini arttırdığı da söylenmektedir (2, 3).

Karaciğerde fruktoz DNL için hem substrat hem de DNL'yi indükleyici bir görev görür. Fruktoz hepatosite GLUT2 yardımıyla hızlı bir şekilde alınır ve insülinin bağımsız bir enzim olan fruktokinaz vasıtasıyla hızlı bir şekilde fruktoz 1-fosfata dönüştürülür. Fruktoz 1-fosfat, aldolaz B enzimiyle yavaş bir şekilde dihidroksi aseton fosfat ve gliseraldehite ayrılır. Bu fosfotriozlar glukoz, laktat veya yağ asitlerine dönüştürülerek DNL'ye substrat olabilir. Fizyolojik şartlarda, lipogenik yol bazal seviyede iken akut fruktoz alımından sonra çok aktif hale gelir ve glikolizin en önemli kontrol enzimi olan fosfofruktokinaz-1'in devre dışı kalmasından dolayı hepatositlere kontrolsüz şekilde alınır. Sonuçta, yüksek fruktozlu diyetlerle birlikte aşırı miktarda fruktoz glikolize girer ve hücre içi asetil CoA miktarı artar. Bu artış karaciğerin oksidatif kapasitesine bağlı olarak DNL'yi indükler. Fruktoz DNL'yi indükleyici

görevini ise sterol cevap element bağlanma protein 1c (SREBP1c) ve karbohidrat-duyarlı element bağlanma protein (ChREBP) transkripsiyon faktörlerini aktifleştirmesi üzerinden gerçekleştirir (82). Fruktozun karaciğerdeki metabolizması Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Karaciğerde fruktoz metabolizması (Tappy'den, 5)

Fruktozun özellikle glukoz içeriğinin yüksek olduğu diyetlerle beraber fazla alınmasının, DNL yoluyla metabolik hastalıkların görülme riskini arttırdığı da söylenmektedir. Metabolik açıdan fruktozu yıkan enzimler, ATP, sitrat veya hücrenin enerji durumunu gösteren sitozolik belirteçler tarafından düzenlenmezler ve bu enzimler ürün inhibisyonuna maruz kalmazlar. Sonuçta, hemen hemen diyetteki tüm fruktoz portal dolaşım vasıtasıyla hepatositlere alınır ve trioz fosfatlara dönüştürülür. Hepatositlerde oluşan büyük miktardaki trioz fosfat yükü laktik asit üretimi, glukoneogenez, glukoz üretimi, hepatik glikojen sentezi, DNL ve TAG salınımı gibi trioz fosfatlar ile ilişkili metabolik yolları aktifleştirir. Kilit rolde olan lipogenik enzimler yağ dokusunda bulunmasına karşın, yağ dokunun toplam DNL ne derece katkı sağladığı tartışmalıdır. Bazı kaynaklarda yağ dokusunda DNL'nin çok az önemi olduğu belirtilmesine rağmen özellikle yüksek miktarda karbohidrat emiliminden sonra bu dokunun önemli olabileceği belirtilmektedir. Dolaşımda fruktozun önemsiz seviyelerine bağlı olarak, yağ dokusunda DNL için potansiyel substrat glukozdur. Glukoz alımının

glikojen depolama ve glukoz oksidasyon kapasitesini aşması halinde glukoz, aynı miktarda fruktoz alımına kıyasla yağ dokuda DNL'yi daha fazla arttırabilir (3). Fruktoz tüketim miktarının dağılımı, fruktoz içerikli diyetle maruz kalma süresi ve diyetin içeriği ile de bağlantılıdır. Bunun yanı sıra bireyin fizyolojisi, fruktoz emilim kapasitesi farklılığı, enzimatik ve endokrin faktörleri de önemlidir. İnce bağırsağın glukoz için emilim kapasitesi yüksek olmasına karşın, fruktoza karşı kısıtlıdır. Bu nedenle glukoz ve fruktozun metabolizmalarını karşılaştırırken problemler yaşanmaktadır (1, 2). % 30 sukroz solüsyonu ile beslenen ratların karaciğer mitokondrilerinde ROS üretimi ve serbest yağ asitlerinin birikiminin arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada mitokondrinin OS ve hiperlipidemiye karşı iç mekanizma geliştirmesine rağmen, bunun redoks dengesizliği ile mücadelede yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır (68). Ayrıca aşırı karbohidrat içerikli diyet aldol redüktaz aktivitesini arttırarak hücre içi fruktoz miktarının da artmasına yol açar. Hücre içi fruktoz artışı ise ileri glikasyon son ürünlerinin artışına bağlı OS'yi de arttırır (83).

Fruktozun OS'yi temelde iki mekanizma üzerinden indüklediği bilinmektedir. İlki, akut fruktoz alımı hücrede enzimatik olmayan ve glukozun glikasyonundan yedi kat daha hızlı olan protein fruktolizasyonunu arttırmasıdır. Ayrıca fruktoz, glukozla kıyasla 100 kat daha fazla ROS oluşumuna katkı sağlar. İkincisi, fruktozun hepatositte fosforilasyonu hücrede AMP artışına yol açar ve ürik asit sentezi artar. Ürik asit ROS oluşumunu NADPH oksidaz 4 üzerinden uyarır. Bunların yanı sıra hepatik lipid metabolizmasının fruktoz indüklü bozukluğunun lipotoksisite, ER stresi ve mitokondriyal bozukluk gibi ROS artışına neden olan mekanizmaları da tetikleyebileceğine yönelik görüşler mevcuttur (82, 84).

4.7. Sukroz İçerikli Diyetler ve Obezite

Karbohidratlar, besinlerdeki enerji içeriğinin önemli kısmını oluştururlar. Karbohidratların temel bileşenleri olan fruktoz ve glukoz, doğada genellikle tek başlarına veya sukroz içeriğinde 1:1 oranında bulunurlar. Sukrozun aşırı tüketimi obezite gibi sağlık problemlerine neden olur (3). Fruktozun özellikle glukoz temelli öğünden sonra doyumluk hissini indükleyemediği ve yetersiz insülin ve leptin üretimi beraberinde artan enerji ihtiyacı sonucunda kilo alımını da arttırdığı gösterilmiştir (85).

Karbohidratlar, vücuda katı halde veya solüsyon halindeki içeceklerle beraber alınmaktadır. Yüksek karbohidrat içerikli solüsyonların katı haldekine kıyasla iştahı baskılamadığından kilo artışına daha fazla neden olmaktadır. Katı haldeki karbohidratlar, kolesistokinin salınımını arttırarak iştahı baskılar (86). Benzer şekilde sukroz içerikli solüsyonların da kilo artışına yol açtığı gösterilmiştir. Bu solüsyonlar çeşitli nöropeptitlerin ekspresyonunu değiştirir ve beyindeki iştahla ilişkili bölgeleri etkileyip melanokortin ve opioid sinyalizasyonunu modüle ederek kilo artışı sağlar (87, 88).

Katı ve sıvı karbohidratların enerji ve kilo alımından bağımsız olarak farklı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Sindirime maruz kalan sıvı karbohidratlar, katı karbohidratlara göre karaciğere daha hızlı geçerek, karaciğerdeki substrat yükünü kısa sürede arttırır. Böylece sıvı karbohidratlar, hepatik lipid birikimi ve DNL'nin aşırı artışına yol açabilir (89).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeler üretici firmaları ile Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Etüv	Galenkamp
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Logic 200 Imaging System
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo EC250-90
Elektroforez Tankı	Thermo EC300
Vorteks	IKA Vortex Genius 3
Mikropleyt	Greiner Bio-one
RT-PCR Cihazı	Roche LightCycler® 480 II
Santrifüj	Eppendorf
Manyetik Karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik Pipet, 10-100 µL	Socorex Acura 825
Otomatik Pipet, 100-1000 µL	Socorex Acura 825
Çoklu Kanallı Otomatik Pipet, 30-300 µL	Brand Transferpette
Çoklu Kanallı Otomatik Pipet, 10-100 µL	Brand Transferpette
Mikrodalga Fırın	Altus ALMD 171
pH metre	Hanna Instrument
Homojenizatör	Ultra-Turrax T25
Hassas Terazı	Mettler Toledo AB204-S
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Allegra 64R Centrifuge
DNA/RNAaz Free Pipet Uçları	ExPell, Axygen
DNA/RNAaz Free Mikrotüp, 1.5 mL	Axygen
DNA/RNAaz Free Mikrotüp, 0.2 mL	Nest Biotechnology
Derin Dondurucu, -80 °C	Thermo Electron Corporation
Mikropleyt Yıkayıcısı	BioTek ELx 50
Çalkalayıcı	Nüve SL 350

Tablo 1 (Devam). Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
İnkübatör	Shel Lab, Heraeus
Mikropleyt okuyucu	VERSA Max, Molecular Devices
Santrifüj	Eppendorf 5810
Termocycler	Applied Biosystems
Mikro Hacimli Spektrofotometre	NanoDrop 2000
Biyokimya Tüpleri	BD Vacutainer
Mikrosantrifüj	Thermo Micromax
Cam Deney Tüpleri	SH&GLASS
El Homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Havalandırılmalı Kafes Sistemi	RAIR IsoSystem
LightCycler 480 Kaplama Folyosu	Roche
LightCycler® 480 Multiwell Plate	Roche
Termomikser	Thermo Scientific Digital DryBath

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler üretici firmaları ile Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma
Agaroz	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
Sülfirik Asit	Merck
Ksantin	Sigma
Etilendiamintetraasetik Asit	Merck
Nitroblue Tetrazolium	Serva
Sığır Serum Albümin	Sigma
Amonyum Sülfat	Merck
Bakır (II) Klorür	Sigma
Ksantin Oksidaz	Sigma
Kloroform	Sigma
Metanol	Sigma
Hidrojen Peroksit	Merck
Tiyobarbitürik Asit	Sigma
1,1,3,3-tetrametoksipropan	Sigma
SOD Standardı	Sigma
Katalaz Standardı	Sigma
BDNF ve Neomisin Primerleri	Integrated DNA Technologies
Fosforik Asit	Sigma
Sodyum Klorür	Merck
Asetik Asit	Sigma
Etanol	Sigma
Amonyum Molibdat	Merck
<i>Thermus aquaticus</i> Polimeraz	BioLabs
Proteinaz K	Sigma
TriPure İzolasyon Reaktifi	Roche

5.1.3. Kullanılan Ticari Kitler

Tez çalışmasında kullanılan ticari ölçüm kitleri ve üretici firmaları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan ticari kitler, üretici firmaları ve ürün kodları

Ticari Kit	Üretici Firma	Ürün Kodu
Mouse/Rat Leptin ELISA kiti	R&D Systems	MOB00
Mouse Adiponektin ELISA kiti	R&D Systems	MRP300
Mouse Rezistin ELISA kiti	R&D Systems	MRSN00
Mouse BDNF ELISA kiti	Abnova	381238504
Mouse İnsülin ELISA kiti	Crystal Chem	16MAUM1388
Mouse 4-HNE ELISA kiti	Elabscience	E-EL-M2677
3-NT ELISA kiti	Elabscience	E-EL-0040
GPx Enzim Aktivitesi ölçüm kiti	Cayman Chemical	0485834
BCA Protein Miktar Tayini Kiti	Novagen, Merck Millipore	71285-3
GenElute™ Memeli Miniprep Kit	Sigma-Aldrich	RTN70
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
cDNA Sentez Kiti	Roche	04 896 866 001
SYBR Green I Master Kiti	Roche	04 707 516 001

5.2. Yöntemler

5.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Uygulanan Prosedür

KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na yapılan 2013/6 protokol no'lu (Bkz. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Belgesi) başvurunun onaylanmasından sonra 10-15 g ağırlığındaki beş haftalık erkek C57BL6/J ırkı wild tip (BDNF (+/+)) ve heterozigot (BDNF (+/-)) fareler barındırıldıkları ve üretildikleri KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

Deney hayvanlarının genotipleri belirlendikten sonra 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortam sağlanarak standart ve yüksek sukroz içerikli diyetlerle (sırasıyla D12450J ve D12450B kodlu, Research Diets Inc, New Brunswick, ABD) *ad libitum* olarak 4 ay boyunca beslenerek barındırıldı. Beslenme periyodunun sonunda tüm fareler dekapite edildikten sonra elde edilen serumlar, subkutan ve epididimal yağ dokuları deneysel çalışmalar yapılana dek -80 °C'de saklandı. Farelerin beslenme periyodunda kullanılan diyetlerin içerikleri Ek 1 ve Ek 2'de verilmiştir.

5.2.2. Farelerin Genotipinin Belirlenmesi

Genotipleme, farelerin kuyruk uçlarından alınan numuneler kullanılarak klasik PCR cihazı yardımıyla BDNF için Korte ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak yapıldı (23). Farelerin kuyruk uçlarından alınan doku numuneleri 1.5 mL'lik DNA/RNAaz içermeyen reaksiyon tüplerine konulduktan sonra 1 800 µL lizis tamponu (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0.1 mg/mL jelatin, % 0.45 nonidet P-40 ve % 45 Triton X-100 içeren) ve 200 µL proteinaz K (20 mg/mL) ile hazırlanan çözeltiden her bir örneğe 150 µL eklendi. Reaksiyon tüpleri 55 °C'ye ayarlanan termomikserde gece boyu inkübe edildi. Homojenatlar, proteinaz K'nın inhibe olması için 95 °C'de 45 dakika bekletildi. Homojenatlar aynı gün çalışılmadığında -20 °C'de saklandı.

PCR reaksiyonları için BDNF ve neomisin primerlerini içeren iki ayrı karışım hazırlandı ve her bir homojenattan PCR reaksiyon tüplerine 19 µL karışım, 1 µL homojenat eklendi. Tüm numuneler BDNF ve neomisin genleri için klasik PCR cihazında çalışıldı. Elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra fareler wild tip (BDNF (+/+)) ve heterozigot (BDNF (+/-)) şeklinde tanımlandı (Şekil 24).

BDNF ve neomisin hedef genlerine ait ileri ve geri primer dizileri Tablo 4’te gösterilmiştir. Uygulanan PCR protokolü Tablo 5’te, kullanılan karışımlar ve miktarları Tablo 6’te verilmiştir.

Tablo 4. Genotipleme için kullanılan primer dizileri

Hedef Gen	Primer Dizisi
Fare BDNF	İleri Primer: GAAGTGTCTATCCTTATGAATCGC Geri Primer: ACCATAAGGACGCGGACTTGTAC
Fare Neomisin	İleri Primer: GAAGTGTCTATCCTTATGAATCGC Geri Primer: GATTCGCAGCGCATCGCCTT

Tablo 5. Genotiplemede uygulanan PCR aşamaları

Aşamalar	Sıcaklık/süre
Ön denatürasyon	94 °C / 5 dakika
Denatürasyon	94 °C / 30 saniye
Yapışma	52 °C / 45 saniye
Uzama	72 °C / 1 dakika
Son uzama	72 °C / 7 dakika
Bekleme	10 °C / ∞

Tablo 6. Genotipleme için PCR’da yapılan karışımların içeriği ve miktarları

PCR Karışımlarının İçeriği	Hacim (µL)
Tampon (10X) fermantaz	2
Magnezyum klorür (25 mM)	1.2
DNTP (10 mM)	0.5
İleri primer	0.5
Geri primer	0.5
Deiyonize su	14.05
DNA	1
<i>Thermus aquaticus</i> Polimeraz (5 U/µL)	0.25

5.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

Tris-asetik asit-EDTA Elektroforez Tamponu: 242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O bir miktar saf suda çözüldü ve üzerine 57.1 mL asetik asit ilave edildi. Çözelti 1 M NaOH ile pH 8.5'a ayarlandı ve son hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan Tris-asetik asit-EDTA tamponu 50 kat seyreltildi ve hem elektroforez tamponu hazırlamada, hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

Etidyum Bromür Çözeltisi: 100 mg etidyum bromür 10 mL deiyonize suda çözülerek 10 mg/mL'lik stok çözelti elde edildi ve +4 °C'de saklandı. Tüm aşamalarda mutlaka eldiven ve koruyucu gözlük kullanılmalıdır.

% 2'lik Agaroz Jel Hazırlanması: 2 g agaroz 100 mL TAE tamponunda çözüldü ve karışımın mikrodalga fırında yaklaşık 50-60 saniye çözünmesi sağlandı. Elde edilen jele 4 µL etidyum bromür eklendi, iyice karıştırıldı. Hazırlanan agaroz jel kalıbına döküldü ve taraklar yerleştirildi. Jel tamamen donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi (Şekil 23).

5.2.2.2. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

PCR ürünlerinden 16 µL alındı ve 4 µL yükleme boyası ile karıştırıldı. Karışım elektroforez tankındaki jele zarar vermeden kuyucuklara yüklendikten sonra 100 volt 300 amperde numunelerin göçü sağlandı. PCR ürünlerinin göçü 20-25 dakika sağlandıktan sonra jel UV ışıktaki görüntülendi ve fotoğrafı çekildi.

Jel görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre sadece BDNF genine sahip olan fareler wild tip, hem BDNF hem de neomisin genine sahip fareler BDNF (+/-) olarak tanımlandı (Şekil 24).

5.2.3. Deney Grupları

BDNF wild tip ve BDNF (+/-) olarak tanımlanan farelerin her biri ayrı ayrı havalandırılan kafeslerde (RAIR IsoSystem, Delaware, USA) barındırıldı. Fareler *Research Diets* (New Brunswick, USA) firmasından satın alınan, içerikleri sırasıyla Ek 1 ve Ek 2'de verilen D12450J ve D12450B kodlu diyetler ile beslendi. Farelere diyetler ve su *ad libitum* olarak verildi. Çalışma grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Grup 1 (Standart WT, Kontrol, C57BL6/J wild tip fare; n=8); Standart diyet (D12450J; % 7 sukroz içeren) ile beslenen grup.

Grup 2 (Standart (+/-), C57BL6/J heterozigot fare; n=8); Standart diyet (D12450J; % 7 sukroz içeren) ile beslenen grup.

Grup 3 (Sukroz WT, C57BL6/J wild tip fare; n=8); Yüksek sukrozlu (D12450B; % 35 sukroz içeren) diyet ile beslenen grup.

Grup 4 (Sukroz (+/-), C57BL6/J heterozigot fare; n=8); Yüksek sukrozlu (D12450B; % 35 sukroz içeren) diyet ile beslenen grup.

Tüm gruplar standardizasyon amacıyla 15 gün süre ile D12450J kodlu standart fare diyeti ile beslendi. Farelerin başlangıç ağırlıkları belirlendikten sonra her grup ilgili diyetlerle dört ay beslendi ve dekapite edilmeden önce tartılarak son ağırlıkları da kaydedildi. Fareler dört aylık beslenme periyodu boyunca her iki haftada bir tartıldı.

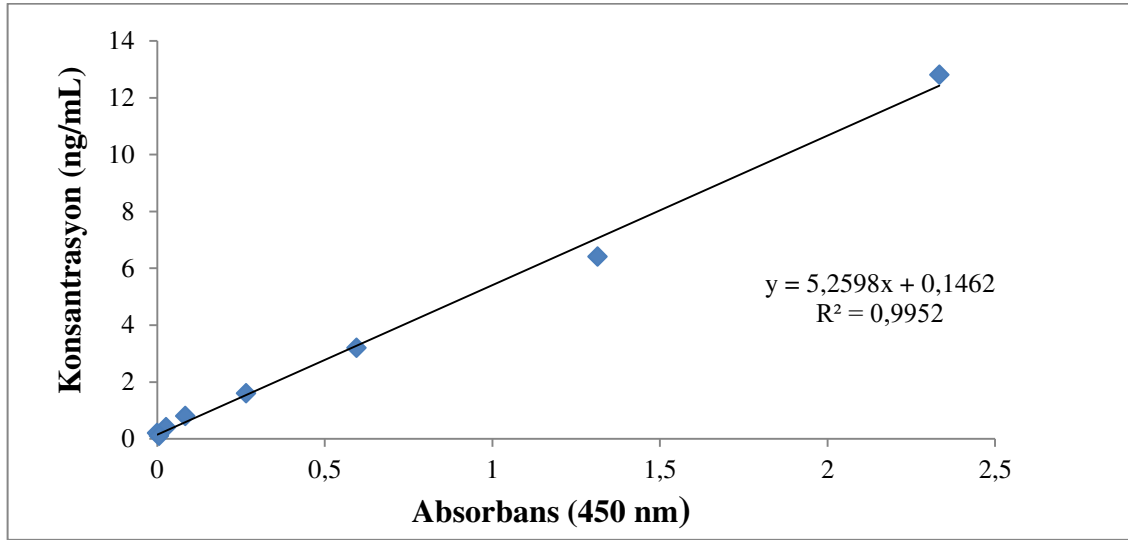
Tüm farelerin dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edilmesinden 12 saat önce kafeslerdeki tüm diyetler ve talaşlar alınarak deney hayvanlarının aç kalması sağlandı. Farelerin kanları biyokimya tüplerine alındı ve serumlar elde edilerek analiz sürelerine kadar -80 °C’de saklandı. Farelerin subkutan ve epididimal yağ dokuları çıkartıldıktan hemen sonra dokular sıvı azotta donduruldu ve ilgili ölçümler yapılana kadar -80 °C’de saklandı.

5.2.4. Serum Glukoz ve Triasilgliserol Seviyesinin Ölçümü

Açlık serum glukoz ve TAG konsantrasyonları Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı’nda mevcut olan Beckman Coulter Analyzer AU 5800 (Kaliforniya, ABD) markalı otoanalizörde ölçüldü. Bu otoanalizörde glukoz ölçümü hekzokinaz ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimleri yardımıyla gerçekleşen reaksiyonlar üzerinden sağlanır. TAG ölçümü ise lipaz enzimleri yardımıyla gerçekleştirilir. Serum glukoz ve TAG konsantrasyonları oto analizör tarafından mg/dL cinsinden hesaplandı.

5.2.5. Serum İnsülin Seviyesinin Ölçümü

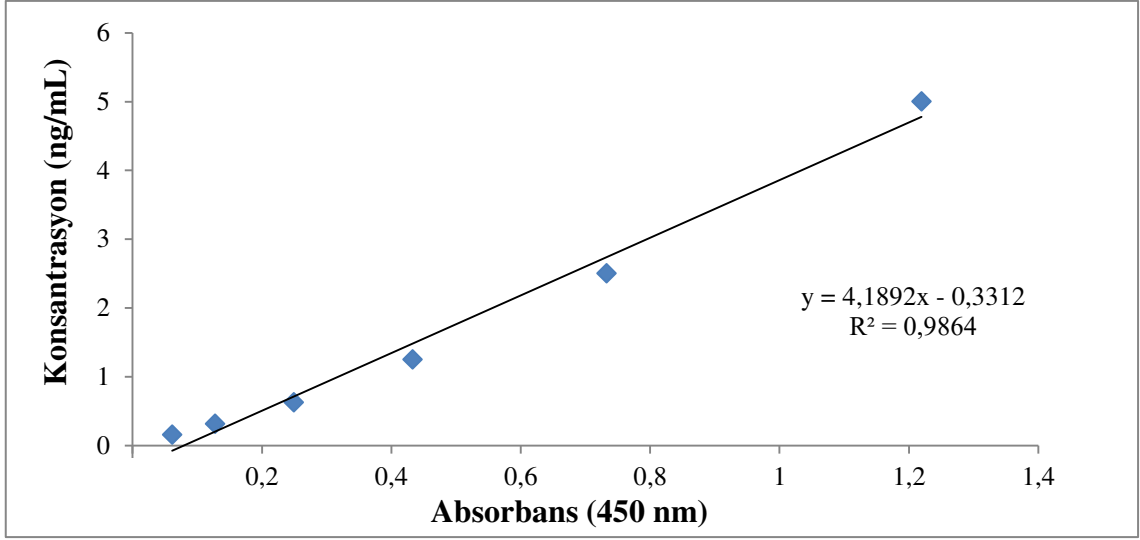
Açlık serum insülin ölçümünde Crystal Chem (Illinois, ABD) firmasının fareler için ürettiği 16MAUM1388 ürün kodlu, duyarlılığı yüksek insülin ELISA kiti kullanıldı. Serumda insülin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Numuneler 20 kat seyreltilti. Numune konsantrasyonları Şekil 5'teki standart grafiğine göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ayrıca farelerde insülin direncinin derecesini gösterebilmek için, açlık serum glukoz ve insülin konsantrasyonları kullanılarak homeostatik model değerlendirme (HOMA) yöntemiyle HOMA-IR skoru hesaplandı (Tablo 14) (90).



Şekil 5. İnsülin standart grafiği

5.2.6. Serum Adiponektin Seviyesinin Ölçümü

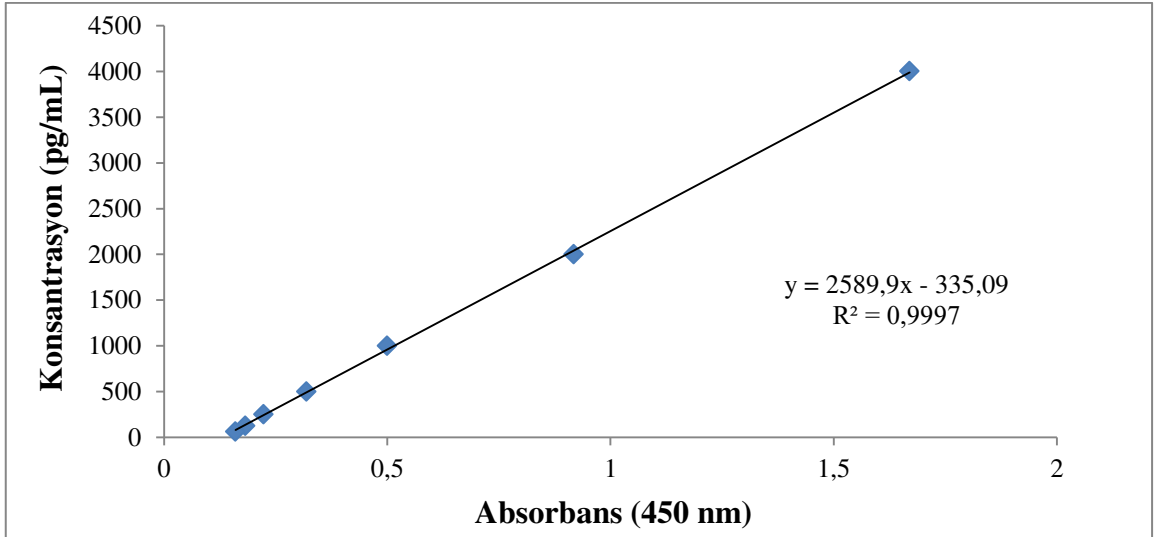
Serum adiponektin ölçümünde R&D Systems (Minneapolis, ABD) firmasının fareler için ürettiği MRP300 ürün kodlu adiponektin ELISA kiti kullanıldı. Serumda adiponektin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Numuneler 2000 kat seyreltilti. Numune konsantrasyonları Şekil 6'daki standart grafiğine göre µg/mL cinsinden hesaplandı.



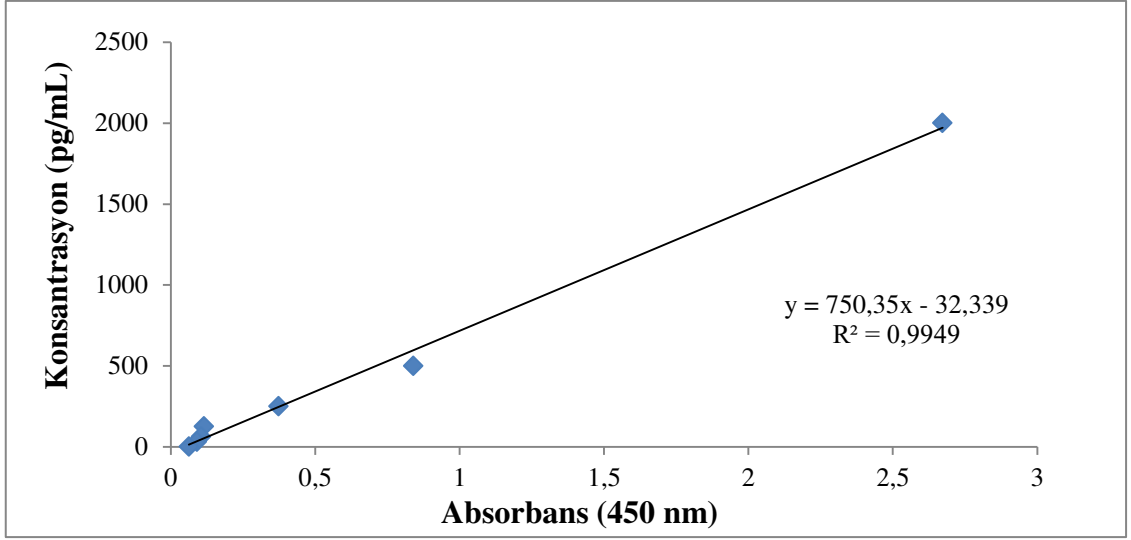
Şekil 6. Adiponektin standart grafiği

5.2.7. Serum Leptin Seviyesinin Ölçümü

Serum leptin ölçümünde R&D Systems (Minneapolis, ABD) firmasının fareler için ürettiği MOB00 ürün kodlu leptin ELISA kiti kullanıldı. Serumda leptin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Numuneler 20 kat seyreltildi. Numune konsantrasyonları Şekil 7’deki standart grafiğine göre ng/mL cinsinden hesaplandı.



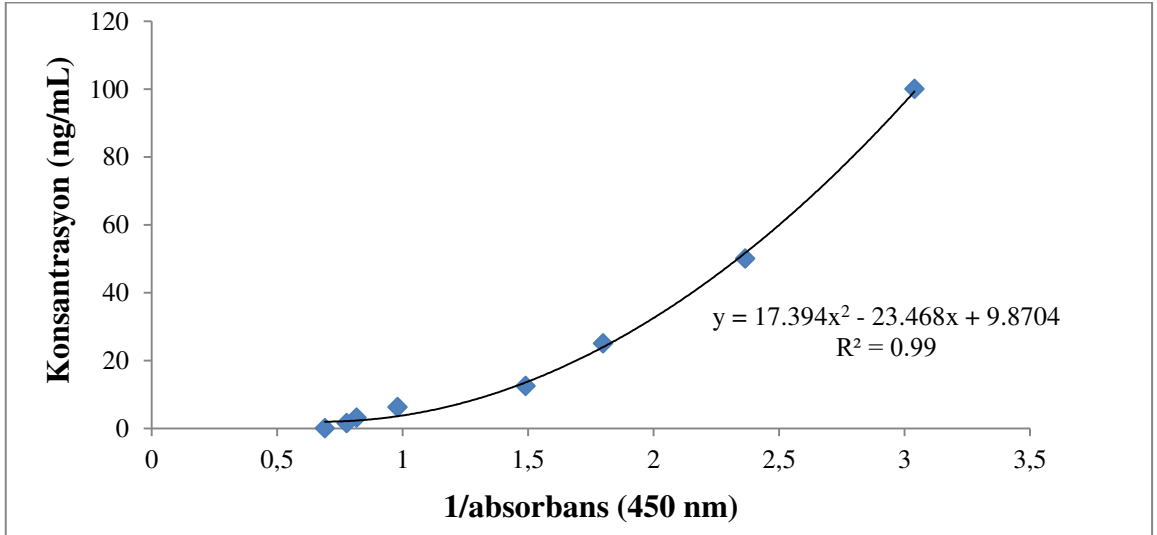
Şekil 7. Leptin standart grafiği



Şekil 9. BDNF standart grafiği

5.2.10. Serum 4-HNE Seviyesinin Ölçümü

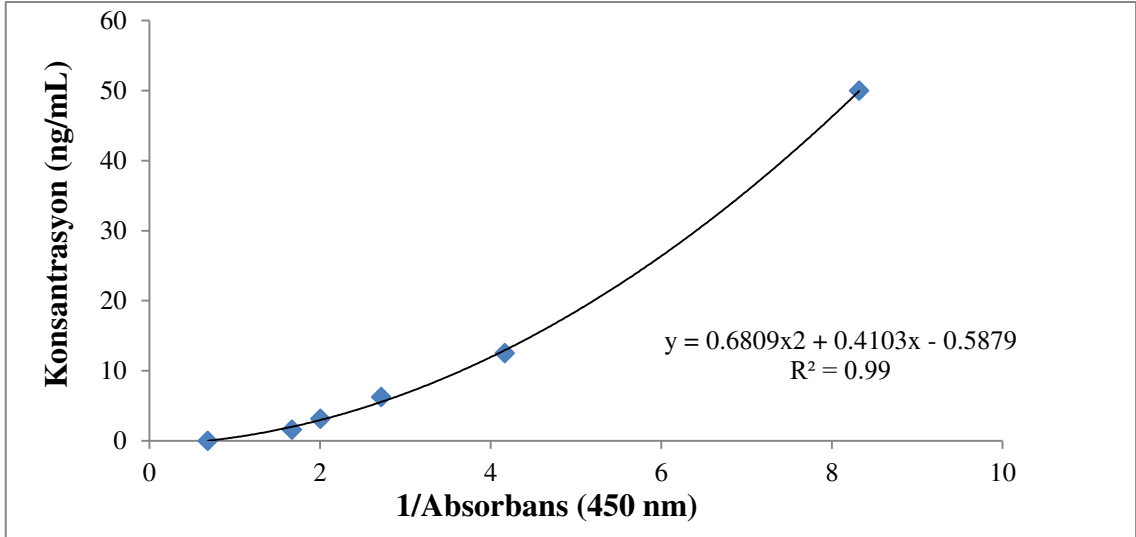
Serum 4-HNE ölçümünde Elabscience (Çin) firmasının fareler için ürettiği E-EL-M2677 ürün kodlu 4-HNE ELISA kiti kullanıldı. Serumda 4-HNE ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Numuneler 5 kat seyreltildi. Numune konsantrasyonları Şekil 10'daki standart grafiğine göre ng/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 10. 4-HNE standart grafiği

5.2.11. Serum 3-NT Seviyesinin Ölçümü

Serum 3-NT ölçümünde Elabscience (Çin) firmasının ürettiği E-EL-0040 ürün kodlu 3-NT yarışmalı ELISA kiti kullanıldı. Serumda 3-NT ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Numuneler 5 kat seyreltilti. Numune konsantrasyonları Şekil 11'deki standart grafiğine göre ng/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 11. 3-NT standart grafiği

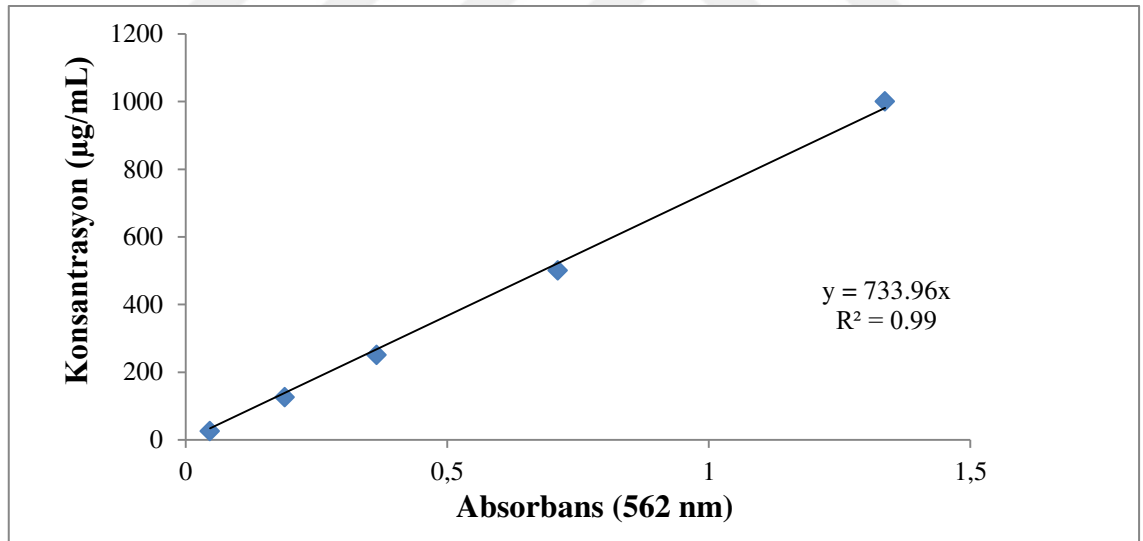
5.2.12. Yağ Dokularında Protein İzolasyonu

Yağ dokularında protein izolasyonu Bligh ve Dyer'in geliştirdiği yöntem göre yapıldı (91). Yaklaşık 100 mg subkutan ve epididimal yağ dokusu 200 µL soğuk izolasyon tamponu ve 750 µL kloroform-metanol (1:2) karışımı içeren deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya dek homojenize edildikten hemen sonra 1.5 mL'lik reaksiyon tüplerine konuldu. Homojenatlar yaklaşık 20 dakika buzda bekletildi ve reaksiyon tüplerine 250 µL kloroform ve 250 µL deiyonize su eklendi. +4 °C'de 800 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda reaksiyon tüplerinin üst kısmından protein faz elde edildi. Protein fazlarda protein tayini, SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ve MDA seviyeleri ölçüldü. Lipid fazlarda ise herhangi bir ölçüm yapılmadı. Yağ dokularının homojenizasyonunda kullanılan izolasyon tamponunun hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

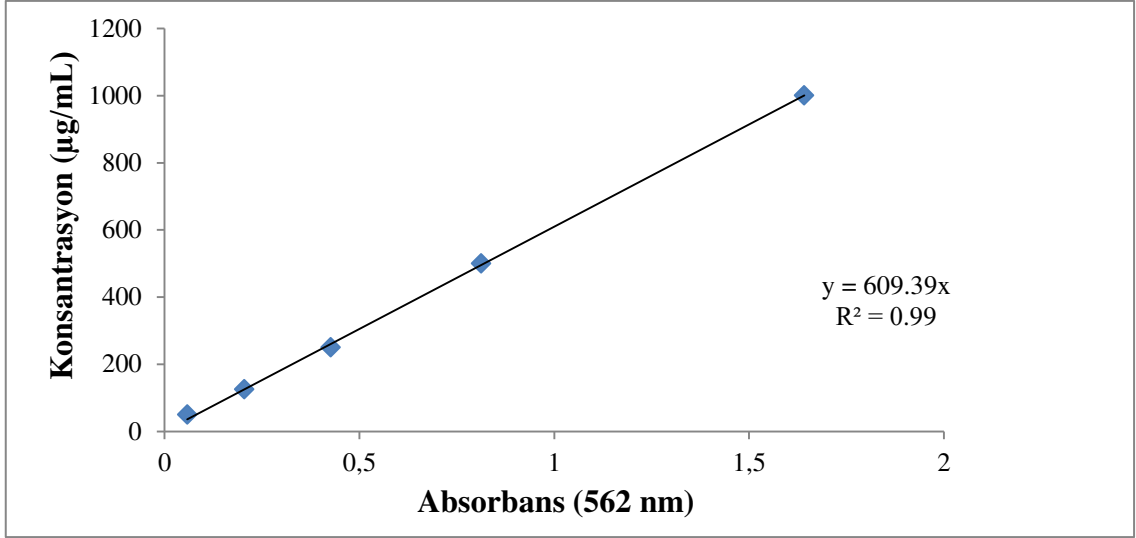
İzolasyon Tamponu: 3.03 g Tris, 4.38 g NaCl, 0,04 g EDTA ve 10 mg α -1 antitripsin bir miktar saf suda çözüldükten sonra karışımın pH'sı 1 M HCl ile 7.4'e ayarlandı. Son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

5.2.13. Protein Miktar Tayini

Subkutan ve epididimal yağ dokularından elde edilen fazlarda protein tayini, katalog numarası 71285-3 olan bisinkoninik asit (BCA) protein ölçüm kiti (Novagen, Merck Millipore, Almanya) protokolüne uygun olarak yapıldı. Kit prosedürünün esası Cu^{+2} 'nin alkali çözeltide bulunan protein tarafından Cu^{+1} 'e indirgenmesi olan Biüret reaksiyonuna ve oluşan Cu^{+1} 'in konsantrasyona bağımlı ölçümüne dayanır. BCA, indirgenmiş Cu ile şelat yapan renkli bir reaktiftir. Bu şelatlaşma sonucu oluşan mor kompleksin 562 nm'de ölçümü yoluyla protein miktarı belirlenmektedir. Çalışmada stok standart olarak 2 mg/mL'lik sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazların konsantrasyonları sırasıyla Şekil 12 ve Şekil 13'deki standart grafiklerine göre $\mu\text{g/mL}$ cinsinden hesaplandı.



Şekil 12. Epididimal yağ dokularında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği



Şekil 13. Subkutan yağ dokularında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği

5.2.14. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in (92) geliştirdiği yöntem modifiye edilerek belirlendi. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan $O_2^{\cdot -}$ 'lerinin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi sonucu oluşan mor renkli formazan molekülünün 560 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

SOD Reaktif Karışımı: 3.65 mg ksantin, 8.93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1.01 g Na_2CO_3 , 12 mg BSA tartıldı ve hacmi 156 mL'ye tamamlandı.

2 M $(NH_4)_2SO_4$ Çözeltisi: 2.64 g $(NH_4)_2SO_4$ 10 mL saf suda çözülde. Ksantin oksidaz enziminin hazırlanmasında kullanıldı.

0.8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi: 6.82 mg $CuCl_2$ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözülde. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3.3 U/ mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL' ye $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

150 µM Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi: 4.9 mg nitroblue tetrazolium 40 mL deiyonize suda çözülerek elde edildi. Nitroblue tetrazolium çözeltisi ışıktan korundu.

100 U/mL’lik stok SOD standardından 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 U/mL’ lik SOD standartları deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Epididimal ve subkutan yağ dokularında sırasıyla 4 ve 2 kat seyreltme yapıldı. SOD aktivitesi ölçümü Tablo 7’ye göre gerçekleştirildi.

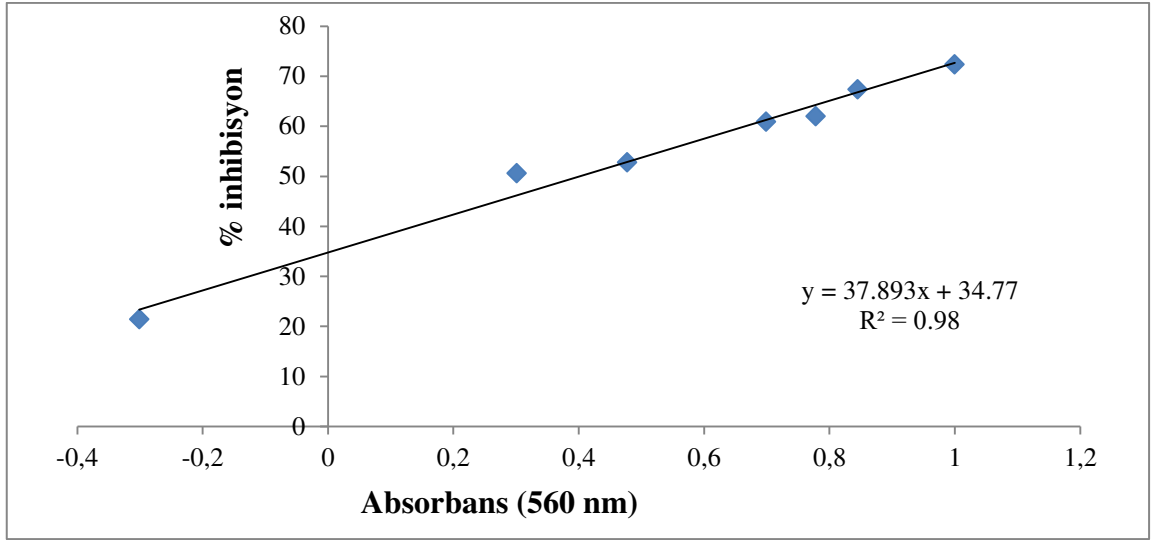
Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Numune, Standart, Kör	200
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitroblue Tetrazolium	204
Ksantin Oksidaz	20
25 °C’de 20 dk inkübasyon	
CuCl ₂	400
560 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

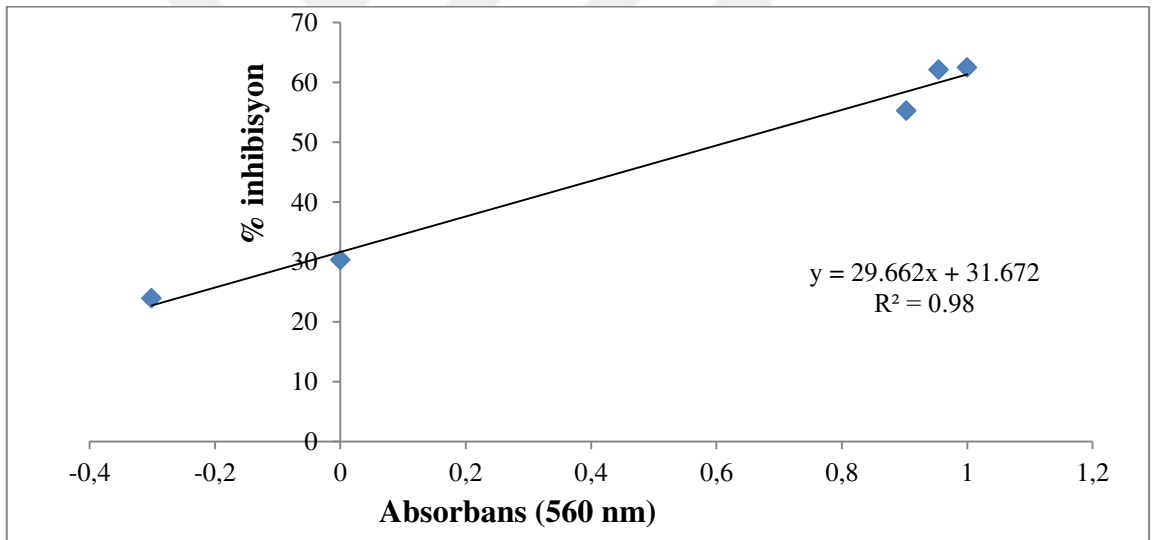
SOD aktivitesi hesabında kullanılan % inhibisyonu belirlemek için Eş. 1’deki formül kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = (Abs \text{ Kör} - Abs \text{ Numune}) \div (Abs \text{ Kör}) \times 100 \quad (1)$$

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek Şekil 14 ve 15’te gösterildiği gibi çizildi. Standart grafiğinde belirlenen denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD aktivitelerinin logaritmik değeri hesaplandıktan sonra bunların anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD aktiviteleri hesaplandı. Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazlarda toplam SOD aktiviteleri Şekil 14 ve Şekil 15’teki standart grafikler kullanılarak hesaplandı. Belirlenen SOD aktiviteleri, toplam protein miktarına bölünerek sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 14. Epididimal yağ dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

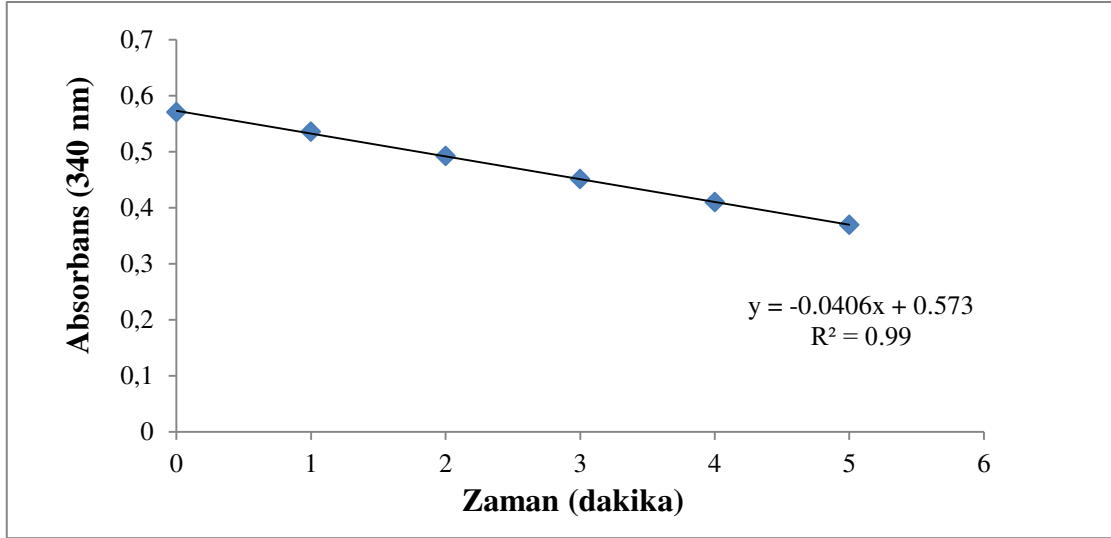


Şekil 15. Subkutan yağ dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

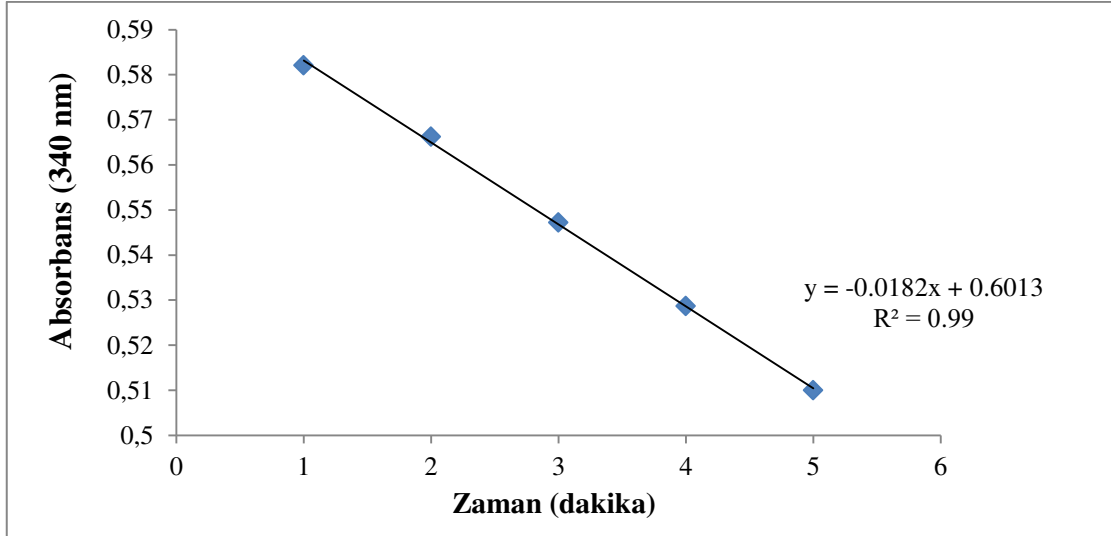
5.2.15. GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Epididimal ve subkutan yağ dokularında GPx aktiviteleri Cayman Chemical (Michigan, ABD) firmasının ürettiği 703102 numaralı kitin prosedürüne uygun olarak belirlendi. Bu kit ile GPx aktivitesi ölçümünün esası Paglia ve Valentine'nin geliştirdiği metoda dayanır (93). Bu metotta GPx ve glutatyon redüktaz enzimleri kullanılır. Numunede bulunan hidroperoksitlerin varlığında indirgenmiş glutatyon, GPx enzimiyle yükseltgenir. Bu yükseltgenmiş glutatyon, NADPH varlığında glutatyon redüktaz

enzimi ile indirgenmiş glutatyonla dönüştürülürken ayrıca NADP^+ elde edilir. NADPH'nin NADP^+ 'ya yükseltgenmesi sonucu 340 nm'deki absorbans düşüşü, GPx enzim aktivitesi ile orantılıdır. GPx aktiviteleri nmol/dakika/mg protein cinsinden hesaplandı. Epididimal ve subkutan yağ dokularında çalışılırken kullanılan kontrol numunesinin aktivitesindeki azalma Şekil 16 ve Şekil 17'deki grafiklerde verilmiştir.



Şekil 16. Epididimal yağ dokularında GPx aktivesinin ölçüldüğü kitin kontrol grafiği



Şekil 17. Subkutan yağ dokularında GPx aktivesinin ölçüldüğü kitin kontrol grafiği

5.2.16. CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü

CAT aktivitesi, amonyum molibdatın H_2O_2 ile oluşturduğu sarı renkli kompleksin verdiği absorbansın 405 nm’de ölçülmesi temeline dayanan yöntem modifiye edilerek ölçüldü (94). 10 mg CAT standardı 10 mL soğuk fosfat tamponunda çözülerek 160 kU/mL’lik stok CAT standardı elde edildi. Stok CAT standardından 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 kU/mL’lik CAT standartları oluşturuldu. Çalışmada kör olarak izolasyon tamponu kullanıldı. CAT aktivitesinin ölçümünde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

60 mM’lık Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu: 2.08 g Na_2HPO_4 ve 1.58 g KH_2PO_4 bir miktar saf suda çözüldü. pH’sı 7’ye ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 500 mL’ye tamamlandı.

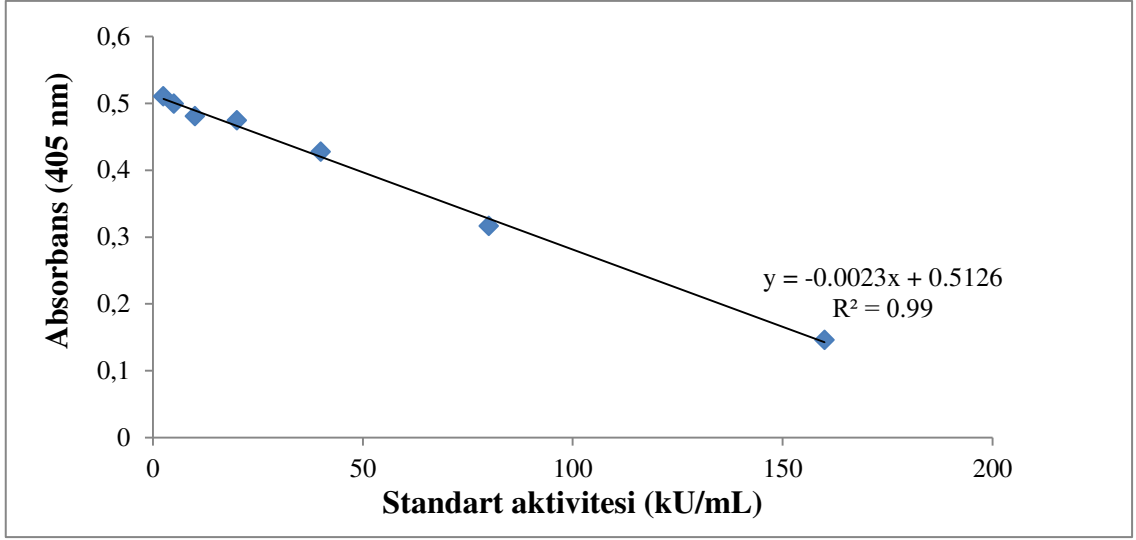
Amonyum Molibdat Çözeltisi: 10.01 g amonyum molibdat bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim 250 mL’ye tamamlandı.

Substrat Çözeltisi: 9.7 mM’lık H_2O_2 ’den 336 μ L alındı ve 50 mL fosfat tamponunda seyreltildi. Substrat çözeltisinin ışıktan korunmasına dikkat edildi.

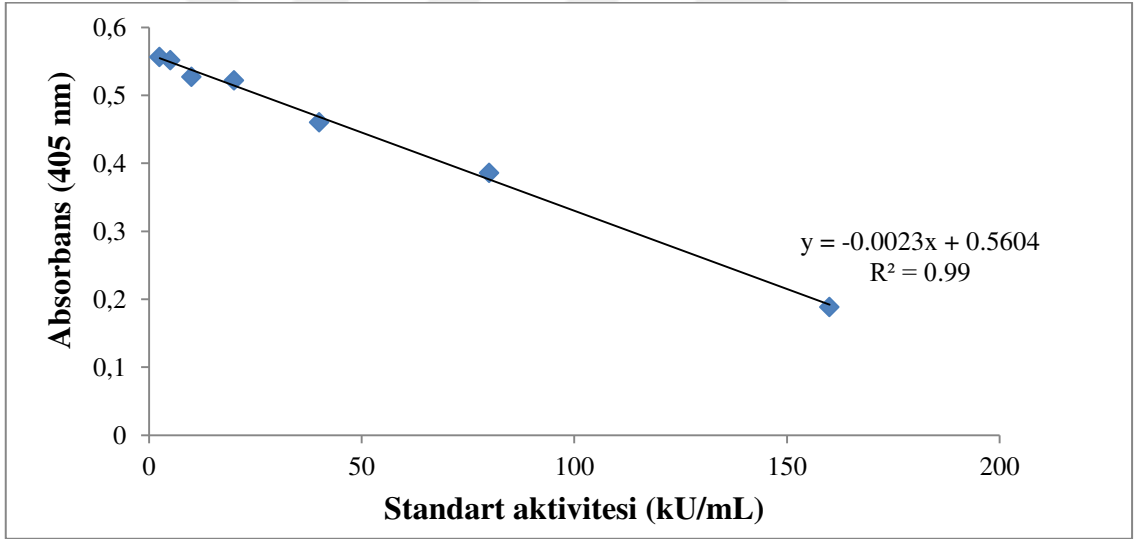
Tablo 8. CAT aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (μ L)
Numune, Standart, Kör	20
Substrat Çözeltisi	100
37 °C’de 60 saniye inkübasyon	
Amonyum Molibdat Çözeltisi	100
405 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazlarda CAT aktiviteleri Şekil 18 ve Şekil 19’daki standart grafikler kullanılarak hesaplandı.



Şekil 18. Epididimal yağ dokularında CAT aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği



Şekil 19. Subkutan yağ dokularında CAT aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

5.2.17. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesi, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan metot modifiye edilerek yapıldı (95). MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

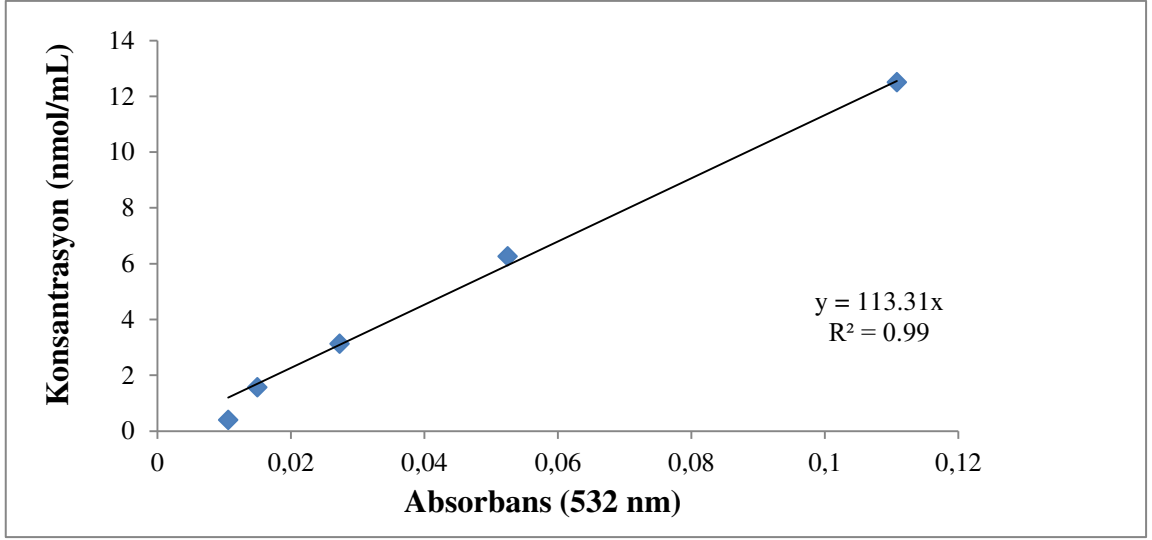
% 1'lik H_3PO_4 Çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL % 85'lik H_3PO_4 eklendi ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi: 0.67 g TBA 50 mL asetik asitte manyetik bar yardımıyla 30 °C'de yaklaşık 20 dakika karıştırıldı. TBA çözeltisi tamamen soğuduktan sonra üzerine 50 mL saf su ilave edildi ve iyice karıştırılarak çalışmada kullanılan nihai çözelti elde edildi.

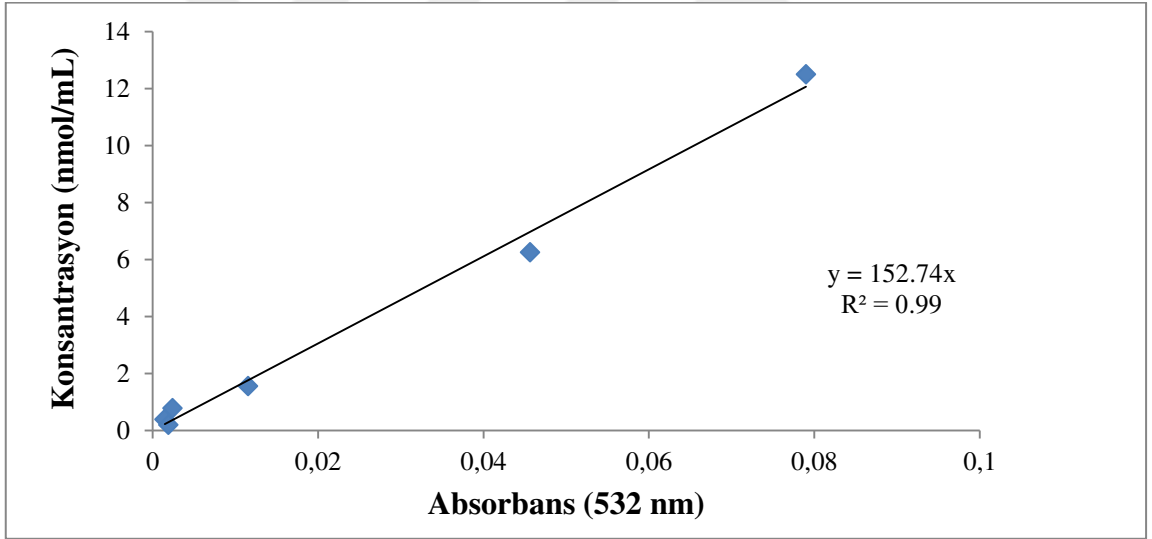
Standart çözeltiler: 82.5 µL tetrametoksiopropan 50 mL 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan 10000 nmol/mL'lik stok MDA standardından 100 nmol/mL'lik ara stok çözelti hazırlandı. Ara stok çözeltilerden 10 nmol/mL'lik çözelti elde edildi ve bu çözeltilerden seri seyreltmeler yapılarak 5, 2.5, 1.25, 0.63 ve 0.31 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 9'da, standart grafikleri Şekil 20, 21'de verilmiştir.

Tablo 9. MDA seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Protein faz, Standart, Kör	200
%1'lik H_3PO_4 Çözeltisi	1200
TBA Çözeltisi	400
100 °C'de 45 dakika inkübasyon	
532 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	



Şekil 20. Epididimal yağ dokularından elde edilen protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği



Şekil 21. Subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

5.3. Gen Ekspresyonu Analizleri

5.3.1. Total RNA İzolasyonunda Kullanılan Dietilpirokarbonat (DEPC)'li Suyun Hazırlanışı

% 97'lik stok DEPC'den % 0.1 (v/v)'lik 500 mL DEPC'li su hazırlandı ve 2 saat süresince 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve bunun ardından 20 dk otoklavlandı. Elde edilen çözeltinin bozulması ve ışıktan etkilenmesini engellemek için +4 °C'de koyu şişelerde saklandı. Epididimal ve subkutan yağ dokularının parçalanması ve tartımı sürecinde kullanılan tüm malzemeler distile su ve ardından dokulardan total RNA izolasyonu aşamasındaki muhtemel RNA kaybını azaltmak amacıyla DEPC'li su ile muamele edildikten sonra kullanıldı.

5.3.2. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu

Epididimal ve subkutan yağ dokularından total RNA izolasyonu Guan ve Yang'ın geliştirdiği yöntem (96) ile RNA izolasyon kiti (Roche, İsviçre) ve TN70 ürün kodlu GenElute™ Mammalian Total Miniprep Kiti'nin (Missouri, ABD) içeriğinde kullanılan malzemelerle aşağıda verilen aşamalarda gerçekleştirildi.

- 1.5 mL'lik RNAaz içermeyen reaksiyon tüpüne alınan yaklaşık 300 mg yağ dokusu üzerine 1 mL TriPure izolasyon reaktifi (Roche, İsviçre) eklendi ve el homojenizatörü yardımıyla 30 s boyunca homojenize edildi.
- Reaksiyon tüpleri 20 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 12 000 g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından üst kısımda kalan yağ tabakası atıldı. Orta kısımda kalan hafif pembe renkli tabaka RNAaz içermeyen başka bir reaksiyon tüpüne alındı.
- Yeni reaksiyon tüpüne alınan hafif pembe renkli tabakanın üzerine 200 µL kloroform eklendi ve 15 s boyunca kuvvetlice çalkalandı (Bu aşamada vorteksleme yapılmamalıdır).
- Elde edilen karışım oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Ardından karışım +4 °C'de 12 000 g'de 15 dk santrifüj edildi.
- Üstte kalan renksiz faz yeni reaksiyon tüpüne alındı ve bunun hacmi kadar % 70'lik etanol eklendi ve vortekslendi.

- Etanol içeren karışımın 700 µL'si kitin içeriğinde bulunan filtrasyon kolonuna yüklendi ve +4 °C'de 12 000 g'de 18 s santrifüj edildi. (Etanol içeren karışım 700 µL'den fazla ise, fazlalık kısım da ayrıca filtrasyon kolonuna eklenebilir ve aynı işlemlere tabi tutulabilir).

- Kolona 250 µL yıkama çözeltisi I (Kat. No. W3136) eklendi ve +4 °C'de 12 000 g'de 18 s santrifüj edildi.

- Kolona 80 µL DNaz stok çözeltiden elde edilen DNaz I çalışma çözeltisi eklendi, 15 dk inkübe edildi ve vortekslendi.

DNaz I Çözeltisi: 79254 ürün kodlu Qiagen firması (Almanya) menşei DNaz Seti'nin içeriğinde bulunan reaktiflerle hazırlandı. Liyofilize DNaz I 550 µL RNaz'dan arındırılmış su ile hafifçe karıştırılarak çözüldü.

DNaz Çalışma Çözeltisi: DNaz stok çözelti ile 79254 ürün kodlu kit içeriğinde bulunan RDD tamponunun 1:7 oranında karıştırılmasıyla elde edildi. Bu aşamada DNaz I'in fiziksel denatürasyona karşı duyarlı olmasından dolayı vorteksleme yapılmamalıdır.

- 250 µL yıkama çözeltisi I (Kat. No. W3136) eklendi ve +4 °C'de 12 000 g'de 18 s santrifüj edildi.

- Kolon kitin içeriğinde bulunan yeni toplama tüpüne konuldu.

- Kolona 500 µL yıkama çözeltisi II (Kat. No. W3261) eklendi ve +4 °C'de 12 000 g'de 18 s santrifüj edildi (Bu işlem iki kere tekrarlandı). Sıvı kısım atıldı.

- Boş kolona, kolonda kalan etanolün uzaklaştırılması için 12 000 g'de 2 dk santrifüj işlemi uygulandı.

- Kolon yeni reaksiyon tüpüne konulduktan sonra 60 °C'de ısıtılan elüsyon çözeltisinin 100 µL'si kolonun merkezine gelecek şekilde eklendi ve hafifçe vortekslendi.

- Kolon 60 °C'de 3 dk bekletildi, 12 000 g'de 2 dk santrifüjlendi.

- Elde edilen RNA numuneler iki ayrı RNaz/DNaz'dan yoksun reaksiyon tüplerine konuldu ve -80 °C'de saklandı.

5.3.3. Total RNA İzolasyonu Sonucu Elde Edilen RNA Miktarının Belirlenmesi

Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları ve RNA saflığının bir göstergesi olan A260/A280 oranı NanoDrop kullanılarak belirlendi. İzole edilen RNA'lar elüsyon çözeltisinde çözöldüğü için, ölçümde bu çözelti kör olarak kullanıldı. Total RNA numuneleri ng/μL cinsinden hesaplandı.

5.3.4. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi 04 896 866 001 ürün kodlu Roche (İsviçre) marka "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" kit prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA numuneler cDNA sentezi aşağıda verilen aşamaların sonucunda gerçekleştirildi.

- -80 °C'den çıkartılan total RNA numuneleri oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Total RNA numuneleri ısı bloğunda 65 °C'de 10 dk bekletildi.
- Total RNA'lar RNaz/DNaz'dan arındırılmış su ile seyreltilerek konsantrasyonu 100 ng/μL'ye ayarlandı.

cDNA sentezi için gerekli karışım, 1.5 mL'lik RNaz/DNaz'dan yoksun reaksiyon tüplerinde Tablo 11'de verilen reaktifler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 10. cDNA sentezi için hazırlanan karışımın içerdiği reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (μL)
Su	1
Tampon	4
RNaz İnhibitörü	0.5
dNTP Karışımı (10 mM)	2
Random Hekzamer Primer	2
Ters Transkriptaz (20 U/μL)	0.5

10 μL numunelerden elde edilen total RNA'ya hazırlanan karışımdan 10'ar μL eklendi. PCR cihazı 25 °C'de 10 dk, 55 °C'de 30 dk ve 85 °C'de 5 dk olacak şekilde ayarlandı, hazırlanan numuneler cihaza yüklendi ve reaksiyonların sonucunda total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Oluşan cDNA ürün konsantrasyonları (ng/μL)

ve saflığı NanoDrop'ta belirlendi. -80 °C'de gen ekspresyon analizlerinin yapılacağı ana kadar saklandı. Gen ekspresyon analizlerinden hemen önce cDNA numune konsantrasyonları 100 ng/μL'ye seyreltildi.

5.3.5. RT-PCR Analizleri

RT-PCR metodu, PCR döngüleri sürecinde meydana gelen ürün miktarı artışının, bu ürüne bağlanan floresan boyanın yaptığı ışımaya yardımıyla takip edilmesi temeline dayanır. Kantitatif RT-PCR her bir numune için her bir reaksiyondaki floresan sinyallerin sayısal değerlere dönüşümünü sağlar (97).

Gen ekspresyon analizleri SYBR Green floresan boyası içeren 04 707 516 001 ürün kodlu Roche (İsviçre) marka LightCycler® 480 SYBR Green I Master kiti ile LightCycler® 480 II RT-PCR (Roche, İsviçre) cihazında gerçekleştirildi. Bu sistemde cDNA ölçümünün temel basamakları aşağıdaki gibidir:

- Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon karışımı denatüre DNA, primerler ve SYBR Green boyası içerir. Bu aşamada bağlanmayan boya düşük şiddetli floresan ışımaya yapar ve bu düşük floresan sinyal analizler esnasında çıkartılır.
- Primerlerin bağlanmasından sonra daha fazla şekilde yeni sentezlenen cDNA'ya bağlanır. Bu bağlanma sonucunda SYBR Green I uyarılma aşamasına kadar ışık yayar.
- Uzama safhasında daha fazla boya yeni sentezlenen cDNA'ya bağlanır. Bu reaksiyon zincirleri devamlı izlenirse floresan artışı da eş zamanlı görülebilir. cDNA'nın denatürasyonu sonrasında boya molekülleri ayrılır ve floresan sinyali azalır.
- Her PCR döngüsünün uzama safhasının sonunda floresan ölçüm, amplifiye cDNA miktar artışının gözlenmesinde kullanılır.
- RT-PCR analizinde SYBR Green boyasının spesifik olmayan bağlanmalar gösterebileceği göz önünde bulundurularak, bu boyanın kullanıldığı çalışmaların sonunda erime eğrisi analizi de yapılarak kendi ürünümüzün çoğalıp çoğalmadığını izlemek mümkün olmaktadır. Erime eğrisi analizinde reaksiyon karışımının sıcaklığı 97 °C'ye yükseltilir. Bu durum DNA zincirlerinin ayrılmasına ve SYBR Green I floresan ışımalarının azalmasına tekabül eder. LightCycler® 480 II RT-PCR cihazı bu azalmayı izleyerek her bir hedef gen için eğrime eğrisi oluşturur.

Gen ekspresyonu analizlerinde kullanılan primerlerin dizileri Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 11. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Gen	Primer	Primer Dizisi
Fare SOD2	İleri primer	5’-AAT AAT GTT GTG TCG GGC GGC-3’
	Geri Primer	5’-TTG TAA CAT CTC CCT TGG CCA G-3’
Fare GPx3	İleri primer	5’-CAG TGG ATG GCT TGA AAT GTG G-3’
	Geri Primer	5’-GTG AGG GCT CCA TAC TCG TAG-3’
Fare CAT	İleri primer	5’-TCA GGG ATG CCA TAT TGT TTC C-3’
	Geri Primer	5’- AAT AGA CTG CCT CTC CAT CTG C-3’
Fare β -Aktin	İleri primer	5’-AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT G-3’
	Geri Primer	5’- ATC GTA CTC CTG CTT GCT GAT C-3’

RT-PCR çalışmasında 1.5 mL’lik RNaz/DNaz’dan arındırılmış reaksiyon tüplerinde her bir hedef gen (SOD2, GPx3 ve CAT) ve referans genin (β -aktin) her bir reaksiyonu için ayrı ayrı reaksiyon karışımları Tablo 13’te verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 12. RT-PCR çalışmasında bir reaksiyon için kullanılan reaktifler

Reaktifler	Hacim (μ L)
PCR Saflığında Su	3
İleri Primer	1
Geri Primer	1
Master Karışım (2x)	10
TOPLAM	15

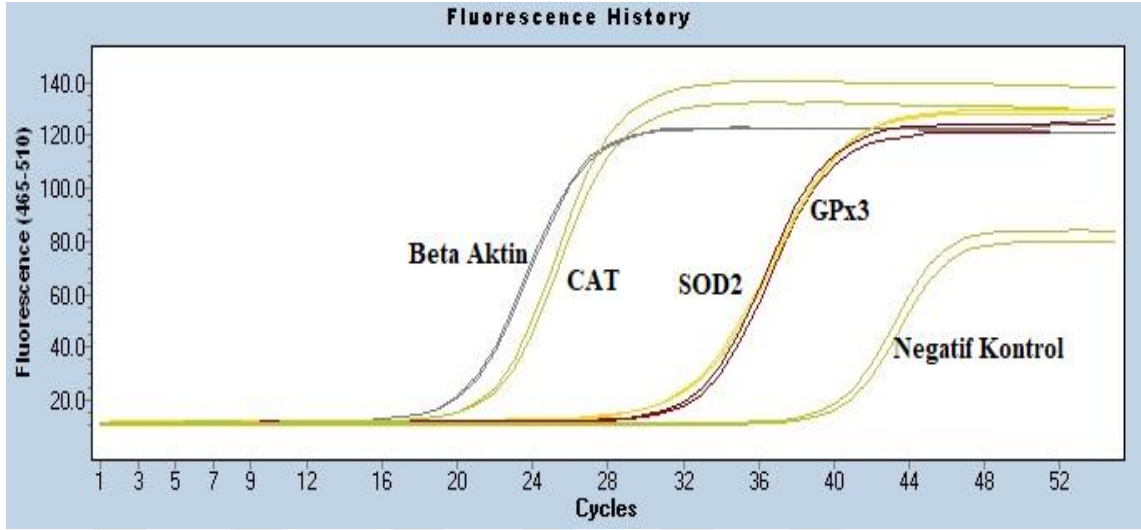
RT-PCR için özel olarak üretilmiş 96 kuyucuklu pleyt, her bir numunenin her bir hedef ve referans geni için iki reaksiyon olacak şekilde tasarlandı. Ayrıca negatif kontrol olarak PCR saflığında su kullanıldı ve böylece her pleytte 11 numune çalışıldı. Her kuyucuğa Tablo 13’te verilen 15 μ L’lik reaksiyon karışımından eklendi. Bu reaksiyon karışımları üzerine her bir numuneye ait seyreltilmiş epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen cDNA’lardan 5 μ L eklenerek reaksiyon hacmi 20 μ L’ye ayarlandı ve pleyt kaplama folyosu ile sıkıca kapatıldı. Kapatılan pleyt 1500 g’de 2 dk

santrifüj edildi. Pleyt, Tablo 14’te verilen protokole uygun olarak LightCycler® 480 II RT-PCR cihazı ayarlandıktan sonra cihaza yüklendi.

Tablo 13. RT-PCR çalışmasında uygulanan yöntem

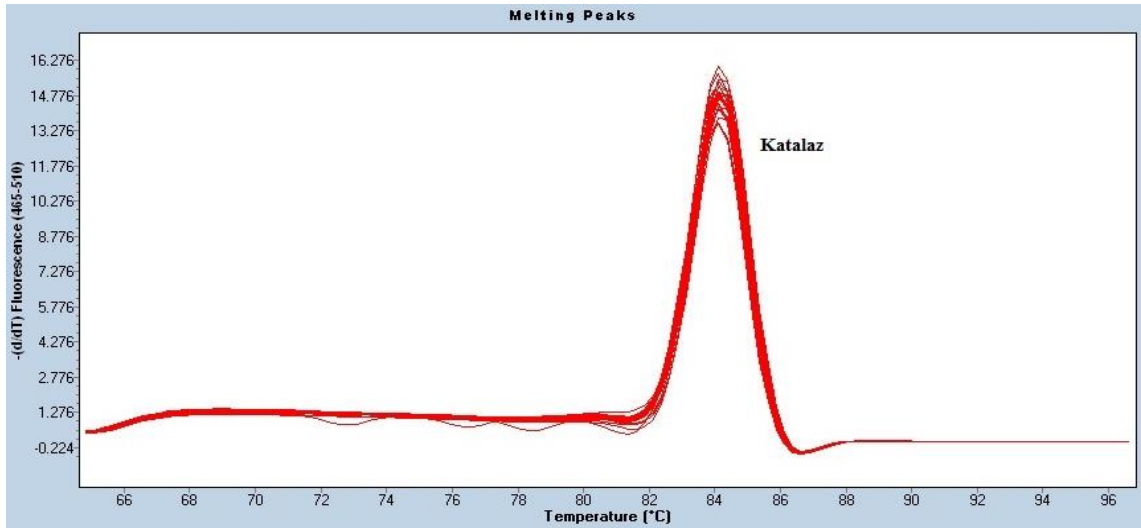
Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön İnkübasyon	1	Yok	
Amplifikasyon	55	Miktar Tayini	
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi	
Soğuma	1	Yok	
Hedef Sıcaklık [⁰C]	Elde Etme Modu	Süre [saat:dk:s]	Sıcaklık Artışı [⁰C/s]
Ön İnkübasyon			
95	Yok	00:08:00	4.4
Amplifikasyon			
95	Yok	00:00:10	4.4
58	Yok	00:00:15	2.2
72	Tek	00:00:20	4.4
Erime Eğrisi			
95	Yok	00:00:05	4.4
65	Yok	00:01:00	2.2
97	Sürekli	Yok	0.11
Soğuma			
40	Yok	00:00:30	1.5

RT-PCR çalışlarında elde edilen amplifikasyon grafiklerinden biri, örnek olarak Şekil 22’de gösterilmiştir.



Şekil 22. Bir pleytin RT-PCR’da çalışılması sonucunda elde edilen tipik amplifikasyon grafiği. Negatif kontrol olarak PCR saflığında su kullanıldı. (Beta Aktin: Mavi, CAT: Yeşil, SOD2: Sarı, GPx3: Kırmızı)

RT-PCR çalışlarında elde edilen erime eğrisi grafiklerinden biri, örnek olarak Şekil 23’de gösterilmiştir.



Şekil 23. Bir pleytin RT-PCR’da çalışılması sonucunda elde edilen tipik erime eğrisi grafiği

5.3.6. Gen Ekspresyonu Çalışmalarının Analizi

Gen ekspresyonu çalışmalarının analizinde rölatif miktar tayini metodu kullanıldı. Bu metot, konsantrasyonu bilinen standartlardan elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanımı gerektirmemektedir. Bunun yerine referans gen olarak kullanılan β -aktin housekeeping geni, hedef genlerle birlikte her bir numune için ayrı ayrı olmak üzere, aynı çalışmada amplifiye edilerek hedef ve referans genlere ait geçiş noktası (C_p) değerleri bulunur ve analizlerde bu değerler kullanılır (98). Ayrıca cihaz tarafından hesaplanan verimlilik değerinin 2 bulunmasından dolayı, rölatif tayin için Livak ve Schmittgen'in geliştirdiği $2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülüne göre gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi (99).

Epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonlarının değerlendirmesinde öncelikle standart WT grupları kontrol grubu olarak alındı ve standart (+/-) ile sukroz WT gruplarında ilgili genlerin ekspresyonları belirtilen kontrol grubu referans alınarak $2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülüne göre ayrı ayrı hesaplandı. Böylece standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun etkisini incelemek amacıyla, epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonlarının rölatif değişimi incelendi. Bununla birlikte BHF'lerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonu üzerine etkisini incelemek için, standart (+/-) grubu kontrol grubu alınarak sukroz (+/-) grubunun gen ekspresyonu rölatif olarak belirlendi. Ayrıca yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini incelemek için, sukroz WT grubu kontrol alınarak sukroz (+/-) grubunun gen ekspresyonu rölatif olarak belirlendi.

Yukarıda belirtildiği üzere BDNF eksikliği ve yüksek sukrozlu diyet temelinde ayrı ayrı değerlendirilen grupların rölatif gen ekspresyonunun hesaplanmasında kullanılan kontrol gruplarına ait numunelerin her bir geninde çalışılan iki reaksiyonun ortalama C_p değeri hesaplandı. Bu kontrol grubuna ait ortalama C_p değeri, değerlendirilen grupların rölatif gen ekspresyonunun hesaplanmasında kullanıldı.

BDNF eksikliği ve yüksek sukrozlu diyet temelinde ayrı ayrı değerlendirilen gruplarda ise bu gruplardaki her bir numunenin iki reaksiyon olarak çalışılan her bir genine ait C_p değerleri, $2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülü üzerinden rölatif hesap ile ikişer adet C_p değeri

elde edildi. Hesaplama aşamasının sonunda, $2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülüne göre elde edilen iki adet C_p değerinin ortalaması alındı ve her numunenin her bir genine ait olan bu ortalama C_p değerlerine göre istatistiksel analizler yapıldı. Rölatif miktar tayininde deney gruplarının ekspresyon seviyeleri belirlenen kontrol gruplarının ilgili gen ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak kat şeklinde göreceli olarak ifade edildi.

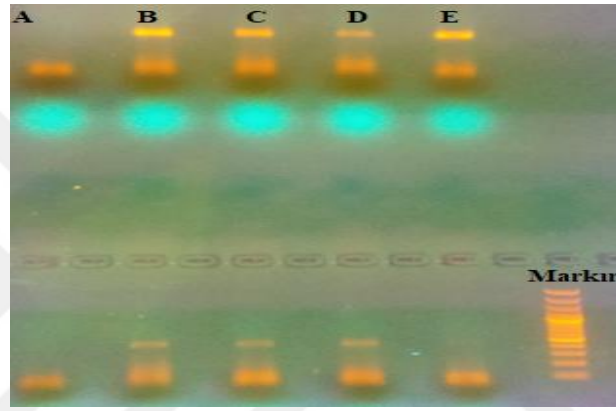
5.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın sonuçlarının normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla değişkenin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi ve ikili değişken için Mann-Whitney U testi uygulandı. Normal dağılıma uyan iki değişkenin değerlendirilmesinde Student-t (independent-t) testi uygulandı. Normal dağılıma uymayan değişkenlerden elde edilen değerler medyan-çeyrekler arası aralık (IQR), normal dağılıma uyan değişkenler ise aritmetik ortalama $\pm$ standart hata ($\bar{X} \pm SE$) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

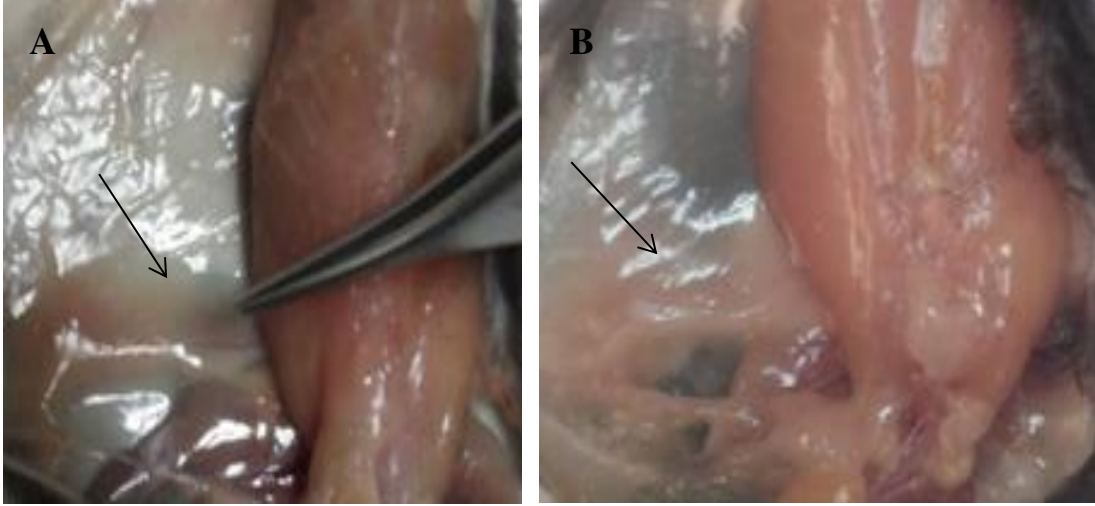
6.1. Farelerin Genotiplenmesi, Yağ Dokularının Görünümleri ve Haftalık Ağırlık Değişimleri ile İlgili Bulgular

Farelerin kuyruk uçlarından alınan örneklerden PCR ile BDNF için Kısım 5.2.1’de açıklanan yöntem kullanılarak genotipleme yapıldı. BDNF geninin her iki alleleline sahip olan fareler wild tip, BDNF ve neomisin geninin birer alleleline sahip fareler heterozigot olarak tanımlanmıştır. PCR yoluyla BDNF için gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezinin görüntüsü Şekil 24’te verilmiştir.

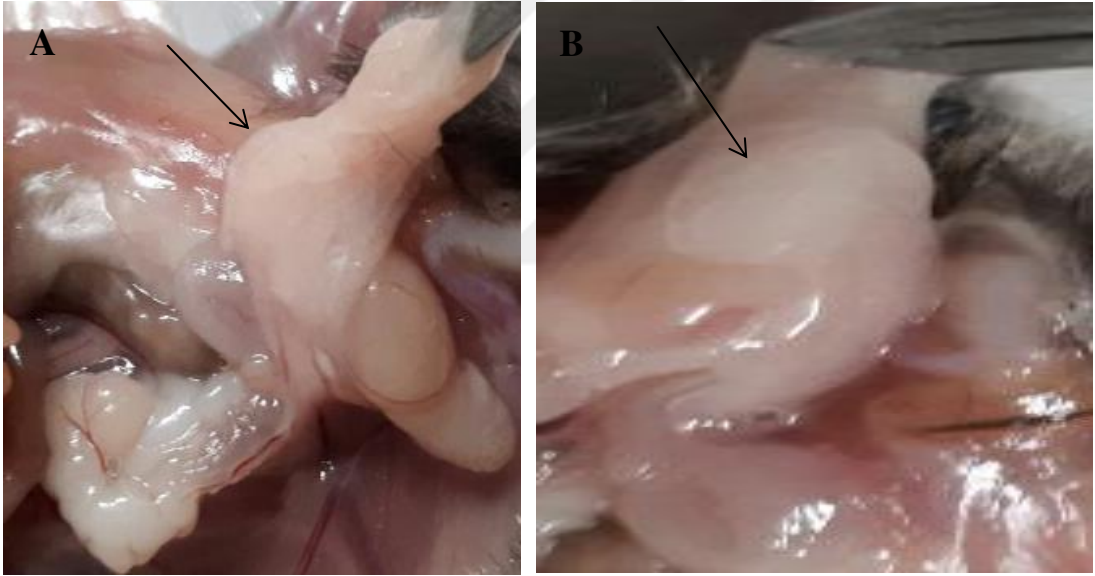


Şekil 24. PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Üst kısımda BDNF bantları, alt kısımda neomisin bantları görülmektedir. **A:** Negatif Kontrol, **B:** Pozitif Kontrol, **C-D:** BDNF (+/-), **E:** Wild tip

BDNF wild tip ve BDNF (+/-) fareler belirlendikten sonra farelerin her biri ayrı ayrı havalandırılan kafeslerde (RAIR IsoSystem, Seaford, DE, USA) barındırıldı. Fareler *Research Diets* (New Brunswick, USA) firmasından ticari olarak satın alınan D12450J ve D12450B kodlu yemler ile dört ay süreyle *ad libitum* olarak beslendi. Tüm gruplar adaptasyon amacıyla 15 gün süre ile D12450J kodlu yem ile beslendi. Dekapitasyon sonrası dokuların çıkarılması aşamasında, farelerin subkutan ve epididimal yağ dokularının görünümüyle sırasıyla Şekil 25 ve Şekil 26’da verilmiştir.

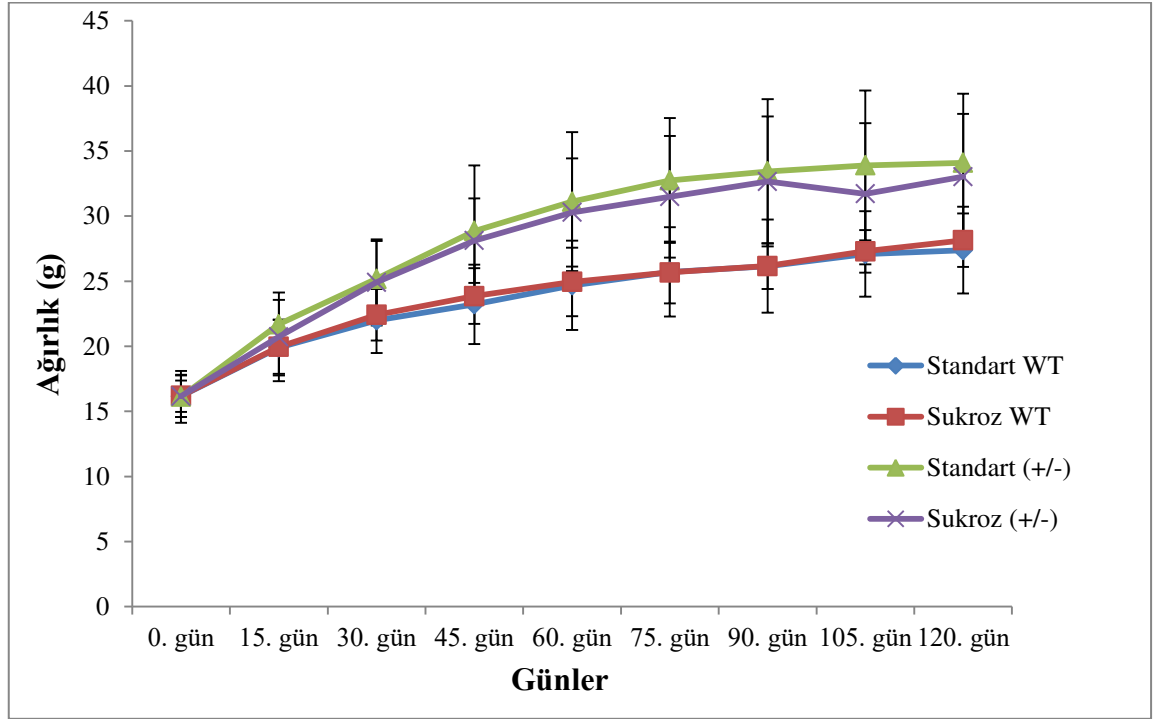


Şekil 25. Dekapitasyon sonrası farelerin subkutan yağ dokularının görünüşleri
A:Standart yem **B:** Yüksek sukroz içerikli yem ile beslendi.



Şekil 26. Dekapitasyon sonrası farelerin epididimal yağ dokularının görünüşleri
A: Standart yem **B:** Yüksek sukroz içerikli yem ile beslendi.

Farelerin beslenmeye başlanmadan ve beslenme periyodunun sonundaki ağırlıkları Tablo 14’te, 15 günlük aralıklarla yapılan tartımlardan elde edilen sonuçlar Şekil 27’de verilmiştir.



Şekil 27. Standart ve yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip ve heterozigot farelerin ağırlıklarının değişim grafiği

Deney gruplarına ait farelerin beslenme periyoduna başlamadan önceki ve beslenme periyodu sonundaki ağırlıklarının ortalama ve standart sapmaları ile serum glukoz, triaçilgliserol, insülin konsantrasyonları ve HOMA-IR değerlerinin medyan ve IQR değerleri Tablo 14’te verilmiştir.

Tablo 14. Farelerin başlangıç ve son ağırlıkları ile glukoz, TAG, insülin konsantrasyonları ve HOMA-IR skorlarının gruplardaki dağılımı

	Standart WT	Standart (+/-)	Sukroz WT	Sukroz (+/-)
Başlangıç ağırlığı (g)				
$\bar{X} \pm SD$	16.2 ± 1.7	16.7 ± 1.9	16.4 ± 1.7	16.9 ± 1.22
Medyan-IQR	15.9 – 2.4	16.4 – 3.6	16.8 – 2.6	16.6 – 2.2
Son ağırlık (g)				
$\bar{X} \pm SD$	26.3 ± 1.1	33.6 ± 5.5	27.8 ± 1.6	33.7 ± 3.6
Medyan-IQR	26.7 – 2.1	32.8 – 8.7 ^a	27.9 – 1.9 ^a	33.0 – 3.5 ^b
Glukoz (mg/dL)				
$\bar{X} \pm SD$	134.6 ± 41.6	186.0 ± 26.7	168 ± 27.8	212.5 ± 28.2
Medyan – IQR	130 – 65	180 – 55 ^a	160 – 40 ^a	212.5 – 55 ^{b,c}
İnsülin (ng/mL)				
$\bar{X} \pm SD$	4.1 ± 1.9	8.6 ± 3.1	9.1 ± 4.3	17.3 ± 4.2
Medyan - IQR	3.8 – 3.8	8.5 – 5.8 ^a	8.5 – 7.6 ^a	18.3 – 4.2 ^{a,b,c}
Triasilgliserol (mg/dL)				
$\bar{X} \pm SD$	86.1 ± 17.1	101.8 ± 21.8	82 ± 10.3	84 ± 8.4
Medyan - IQR	90 – 15	100 – 40	80 – 20	80 – 10
HOMA-IR Skoru *				
$\bar{X} \pm SD$	49.9 ± 23.4	96.8 ± 47.6	46.7 ± 21.8	159.8 ± 56.3
Medyan - IQR	42.7 – 47.3	84.0 – 71.1 ^a	45.1 – 42.7	151.5 - 71.5 ^b

* [(Glukoz (mmol/L)) x (İnsülin (mU/L)) / 22.5] formülüne göre hesaplandı.

^a: Standart WT grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

^b: Sukroz WT grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

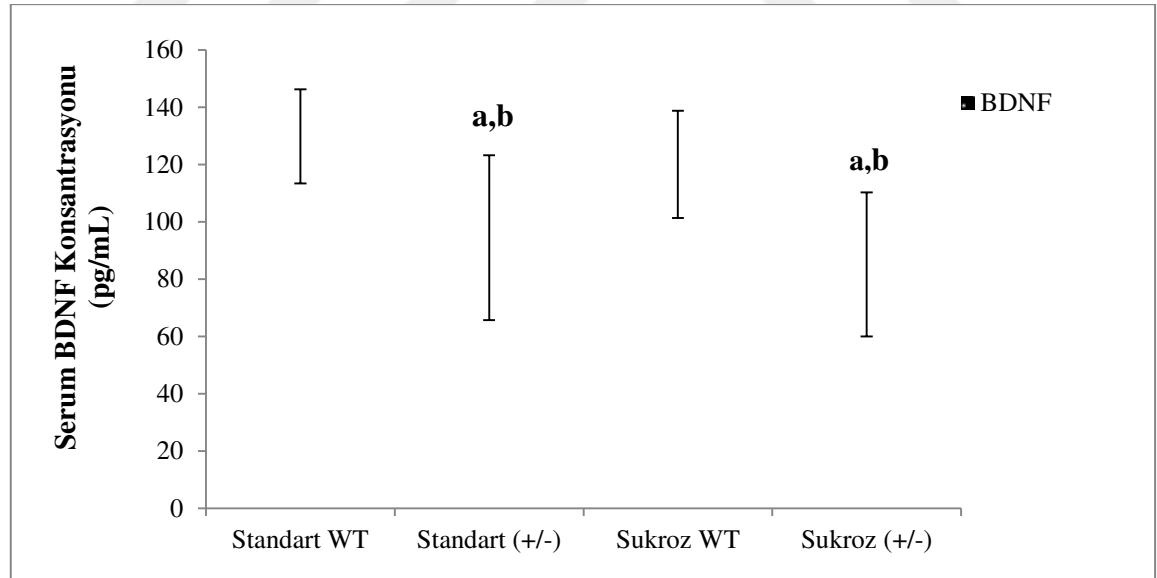
^c: Standart (+/-) grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

Beslenme periyodu sonunda standart (+/-) ve sukroz WT gruplarının son ağırlıklarının standart WT grubununkine göre anlamlı derecede arttığı belirlendi (sırasıyla p=0.001 ve p=0.019). Sukroz (+/-) grubunun son ağırlığının sukroz WT grubununkine göre anlamlı derecede arttığı belirlendi (p=0.001). Standart (+/-) ve sukroz WT gruplarının serum glukoz konsantrasyonunun standart WT grubununkine göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.003 ve p=0.029). Sukroz (+/-) grubunun serum glukoz konsantrasyonunun standart (+/-) ve sukroz WT gruplarınınunkine göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (sırasıyla p=0.013 ve p=0.004). Standart WT grubunun serum insülin konsantrasyonu standart (+/-) ve sukroz

WT gruplarınınkine göre anlamlı derecede düşük bulundu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.003$). Sukroz (+/-) grubunun serum insülin konsantrasyonunun standart (+/-) ve sukroz WT gruplarınınkine göre anlamlı derecede arttığı belirlendi (sırasıyla $p=0.000$ ve $p=0.001$). Gruplar arasında serum TAG konsantrasyonları açısından herhangi istatistiksel anlamlılık görülmedi. Standart (+/-) grubunun HOMA-IR skorunun standart WT grubununkine göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.010$). Sukroz (+/-) grubunun HOMA-IR skorunun sukroz WT grubununkine göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p=0.000$).

6.2. Serum BDNF Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

Standart (+/-) grubunun serum BDNF konsantrasyonunun standart WT grubununkine göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p=0.001$). Sukroz (+/-) grubunun serum BDNF konsantrasyonunun sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p=0.007$). Gruplardaki serum BDNF seviyelerinin ortalama ve standart sapma değerleri ile istatistiksel anlamlılık derecelerinin dağılımı Şekil 28 ve Tablo 15’te gösterilmiştir.



Şekil 28. Serum BDNF seviyelerinin gruplara göre dağılımı ^a: Standart WT grubuna göre $p=0.001$, ^b: Sukroz WT grubuna göre $p=0.007$ düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 15. Serum BDNF seviyelerine ait değerler (pg/mL)

	Ortalama $\pm$ SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	129.8 $\pm$ 16.4	131.7 - 30.7	119.4 – 140.2
Standart (+/-)	94.4 $\pm$ 28.2	93.8 - 49.8 ^a	78.5 – 110.3
Sukroz WT	120.0 $\pm$ 18.7	121.3 - 36.4	104.3 – 135.6
Sukroz (+/-)	85.1 $\pm$ 25.1	94.7 - 41.6 ^b	64.1 – 106.0

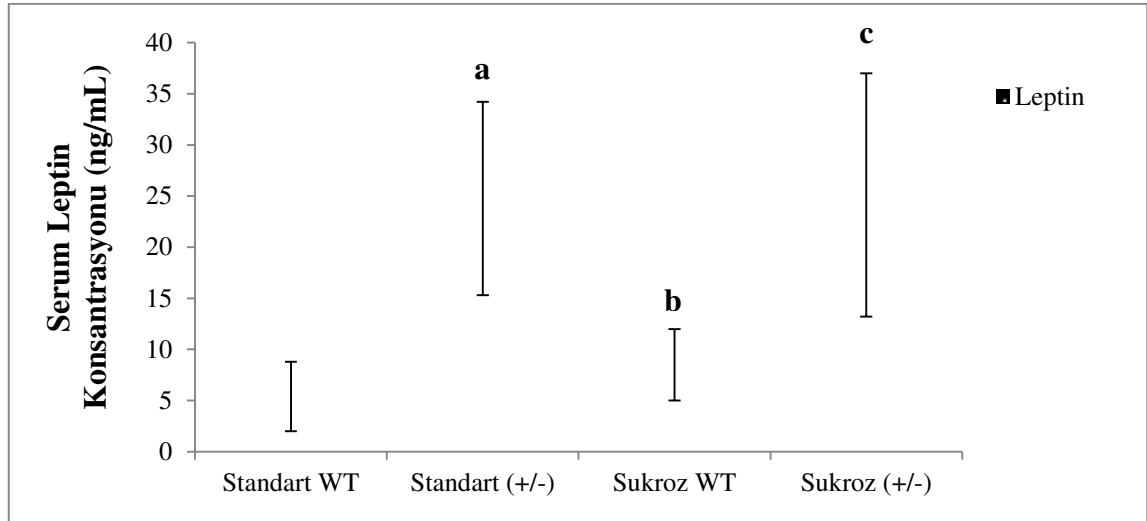
^a: Standart WT grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır.

^b: Sukroz WT grubuna göre p=0.07 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.3. Serum Leptin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

Standart WT grubunun serum leptin konsantrasyonunun standart (+/-) ve sukroz WT gruplarınıninkine göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.001, p=0.007). Sukroz (+/-) grubunun serum leptin konsantrasyonunun sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (p=0.001). Gruplardaki serum leptin seviyelerinin ortalama ve standart sapma değerleri ile istatistiksel anlamlılık derecelerinin dağılımı Şekil 29 ve Tablo 16’da gösterilmiştir.



Şekil 29. Serum leptin seviyelerinin gruplara göre dağılımı ^{a,b}: Standart WT grubuna göre sırasıyla p= 0.001 ve p=0.007, ^c: Sukroz WT grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 16. Serum leptin seviyelerine ait değerler (ng/mL)

	Ortalama $\pm$ SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	5.3 $\pm$ 3.4	5.9 - 5.8	3.28 – 7.4
Standart (+/-)	24.7 $\pm$ 9.5	25.1 - 16.0 ^a	18.4 – 31.1
Sukroz WT	8.5 $\pm$ 3.5	9.2 - 5.2 ^b	6.0 - 11.0
Sukroz (+/-)	25.1 $\pm$ 11.9	22.5 - 18.5 ^c	16.5 - 33.6

^a: Standart WT grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır.

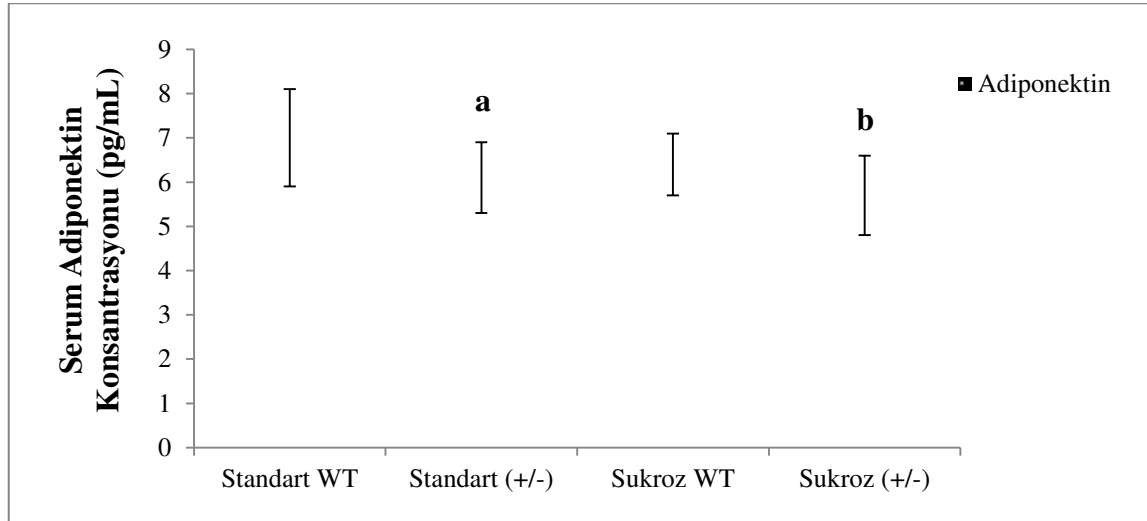
^b: Standart WT grubuna göre p=0.007 düzeyinde anlamlıdır.

^c: Sukroz WT grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.4. Serum Adiponektin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

Standart (+/-) grubunun serum adiponektin konsantrasyonunun standart WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (p=0.043). Sukroz (+/-) grubunun serum adiponektin konsantrasyonunun sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (p=0.035). Gruplardaki serum adiponektin seviyelerinin ortalama ve standart sapma değerleri ile istatistiksel anlamlılık derecelerinin dağılımı Şekil 30 ve Tablo 17’de gösterilmiştir.



Şekil 30. Serum adiponektin seviyelerinin gruplara göre dağılımı ^a: Standart WT grubuna göre p=0.043, ^b: Sukroz WT grubuna göre p=0.035 düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 17. Serum adiponektin seviyelerine ait değerler (µg/mL)

	Ortalama ± SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	7.0 ± 1.1	7.1 – 1.8	6.4 – 7.7
Standart (+/-)	6.1 ± 0.8	6.1 – 1.3 ^a	5.7 – 6.6
Sukroz WT	6.4 ± 0.7	6.3 – 1.6	5.9 – 6.9
Sukroz (+/-)	5.7 ± 0.9	5.4 – 0.8 ^b	5.0 – 6.3

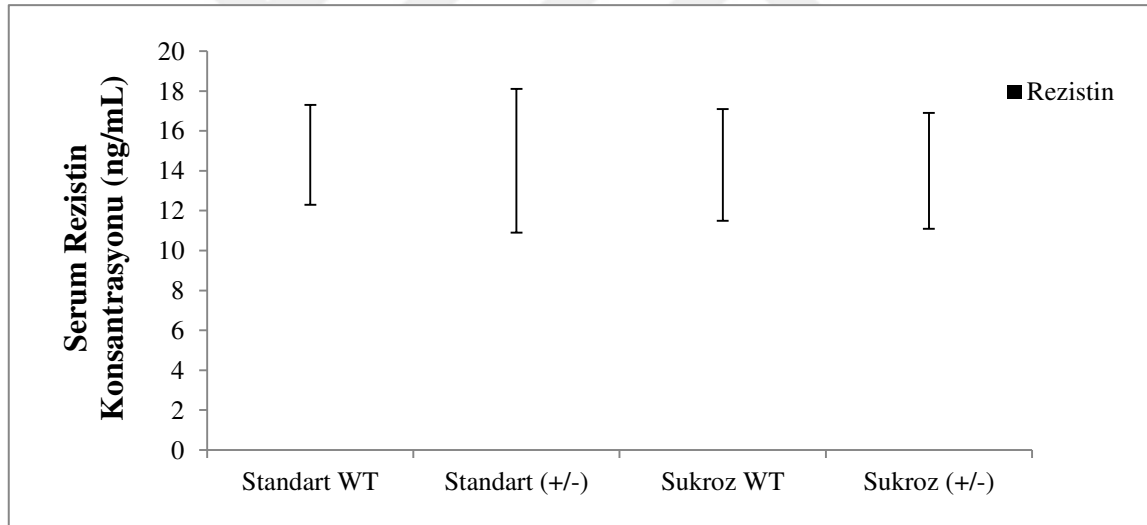
^a: Standart WT grubuna göre p=0.043 düzeyinde anlamlıdır.

^b: Sukroz WT grubuna göre p=0.035 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.5. Serum Rezistin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

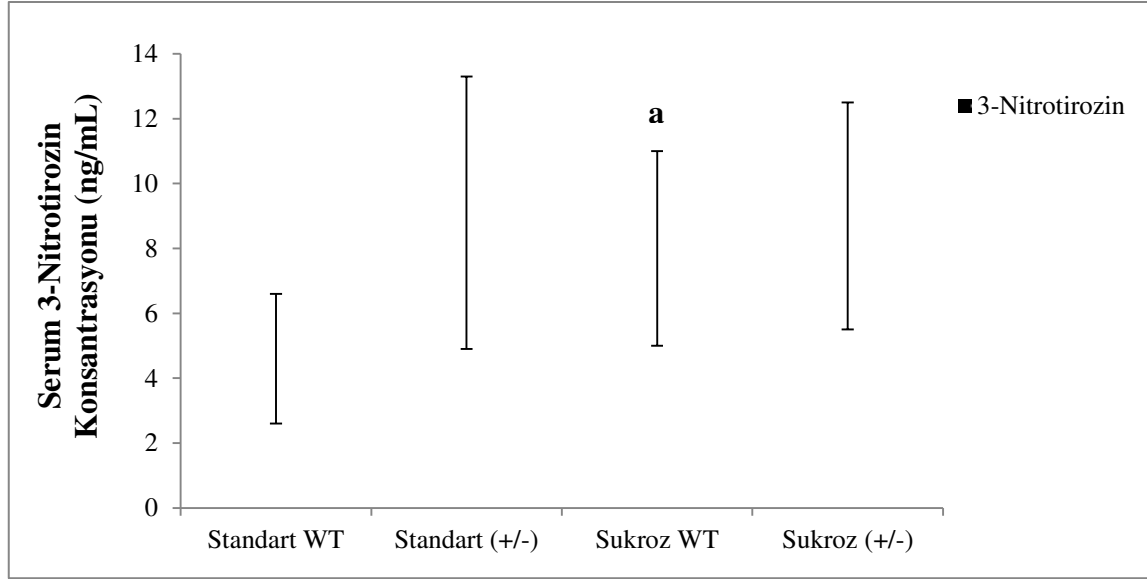
Serum rezistin konsantrasyonu bakımından gruplar arasında herhangi fark görülmedi. Gruplardaki serum rezistin seviyelerinin ortalama ve standart sapma dağılımı Şekil 31 ve Tablo 18’de gösterilmiştir.

**Şekil 31.** Serum rezistin seviyelerinin gruplara göre dağılımı**Tablo 18.** Serum rezistin seviyelerine ait değerler (ng/mL)

	Ortalama ± SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	14.8 ± 2.6	14.0 – 3.7	13.3 – 16.4
Standart (+/-)	14.5 ± 3.6	13.0 – 7.0	12.4 – 16.5
Sukroz WT	14.3 ± 2.8	13.7 – 3.1	12.3 – 16.0
Sukroz (+/-)	14.0 ± 2.9	14.8 – 5.6	11.9 – 16.1

6.6. Serum 3-Nitrotirozin Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

Sukroz WT grubunun serum 3-NT konsantrasyonunun standart WT grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.031$). Gruplardaki serum 3-NT seviyelerinin ortalama ve standart sapma dağılımı Şekil 32 ve Tablo 19’da gösterilmiştir.



Şekil 32. Serum 3-NT seviyelerinin gruplara göre dağılımı ^a: Standart WT grubuna göre $p=0.031$ düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 19. Serum 3-NT seviyelerine ait değerler (ng/mL)

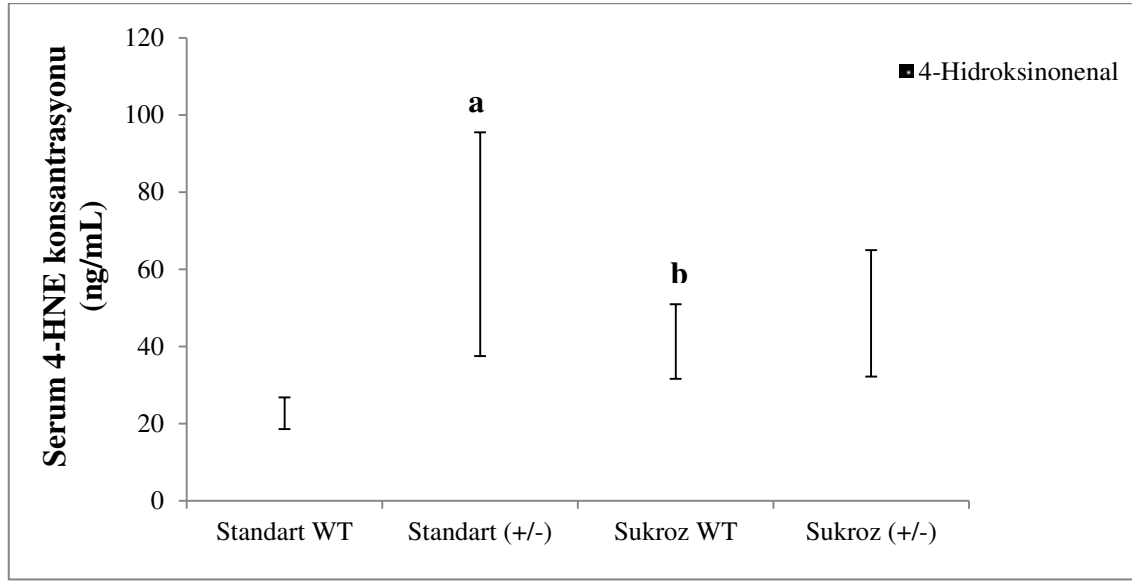
	Ortalama $\pm$ SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	4.6 $\pm$ 2.0	5.6 – 3.3	2.8 – 6.5
Standart (+/-)	9.1 $\pm$ 4.2	9.0 – 6.5	5.6 – 12.6
Sukroz WT	8.0 $\pm$ 3.0	6.9 – 5.2 ^a	5.7 – 10.3
Sukroz (+/-)	9.0 $\pm$ 3.5	9.4 – 6.7	6.0 – 11.9

^a: Standart WT grubuna göre $p=0.031$ düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.7. Serum 4-Hidroksinonenal Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

Standart (+/-) grubu ve sukroz WT gruplarının serum 4-HNE konsantrasyonunun standart WT grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.001$). Gruplardaki serum 4-hidroksinonenal seviyelerinin ortalama ve standart sapma değerleri ile istatistiksel anlamlılık derecelerinin dağılımı Şekil 33 ve Tablo 20’de gösterilmiştir.



Şekil 33. Serum 4-HNE seviyelerinin gruplara göre dağılımı ^{a,b}: Standart WT grubuna göre sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.001$ düzeyinde anlamlıdır.

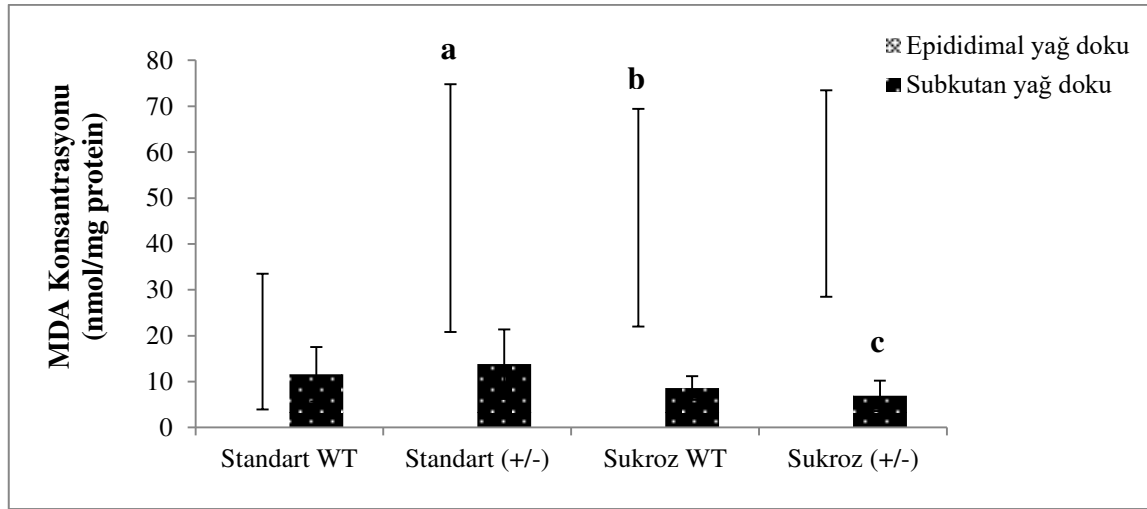
Tablo 20. Serum 4-HNE seviyelerine ait değerler (ng/mL)

	Ortalama ± SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	22.7 ± 4.1	22.4 – 7.2	18.9 – 26.4
Standart (+/-)	66.5 ± 29.0	75.4 – 52.1 ^a	44.2 – 88.8
Sukroz WT	41.3 ± 9.7	43.8 – 18.6 ^b	34.4 – 48.2
Sukroz (+/-)	48.6 ± 16.4	53.3 – 29.5	36.0 – 61.2

^{a,b}: Standart WT grubuna göre sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.000$ düzeyinde anlamlıdır. p ; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.8. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda MDA Ölçümüne Ait Bulgular

Epididimal yağ dokularından elde edilen protein fazlarda standart (+/-) ve sukroz WT gruplarının MDA konsantrasyonunun standart WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.032$ ve $p=0.019$). Subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazlarda standart (+/-) grubunun MDA konsantrasyonunun sukroz (+/-) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.017$). Gruplardaki epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazlarda ölçülen MDA seviyelerinin ortalama ve standart sapma dağılımı ile istatistiksel anlamlılık dereceleri Şekil 34, Tablo 21 ve 22’de gösterilmiştir.



Şekil 34. Epididimal ve subkutan yağ dokularında MDA seviyelerinin gruplara göre dağılımı ^{a,b}: Standart WT grubuna göre sırasıyla $p=0.032$ ve $p=0.019$, ^c: Standart (+/-) grubuna göre $p=0.017$ düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 21. Epididimal yağ dokudaki MDA seviyelerine ait değerler (nmol/mg protein)

	Ortalama $\pm$ SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	18.7 $\pm$ 11.2	11.9 – 21.0	4.8 – 32.5
Standart (+/-)	47.8 $\pm$ 20.4	37.7 – 38.3 ^a	22.6 – 73.1
Sukroz WT	45.7 $\pm$ 20.7	43.2 – 35.8 ^b	28.4 – 63.0
Sukroz (+/-)	51.0 $\pm$ 22.5	47.4 – 46.8	34.9 – 67.1

^{a,b}: Standart WT grubuna göre sırasıyla $p=0.032$ ve $p=0.019$ düzeyinde anlamlıdır. ^p: “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

Tablo 22. Subkutan yağ dokudaki MDA seviyelerine ait değerler (nmol/mg protein)

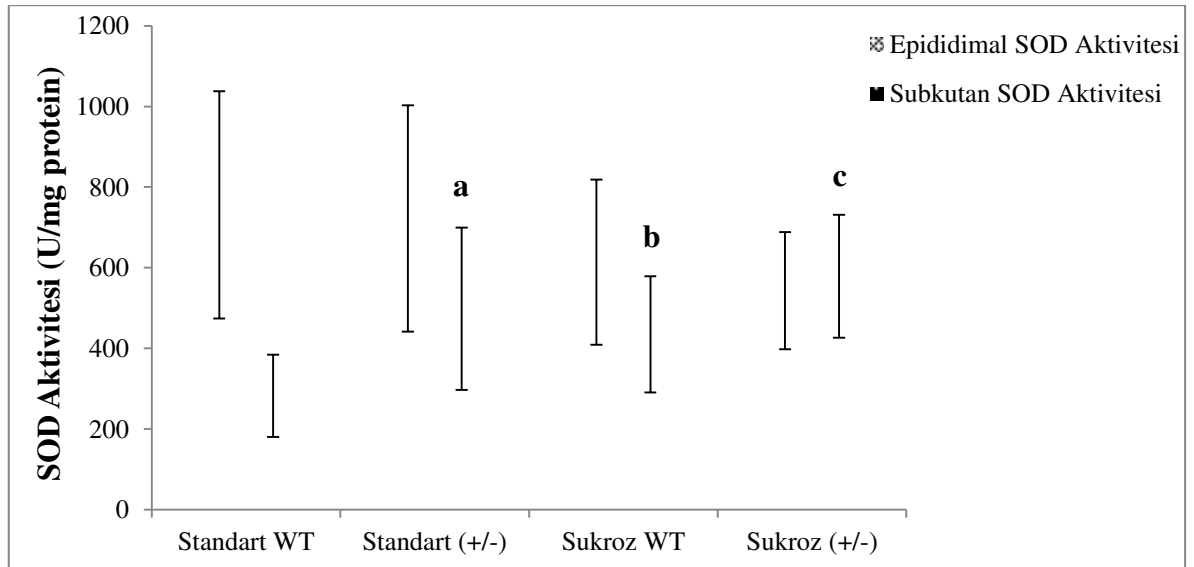
	Ortalama $\pm$ SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	11.6 $\pm$ 5.9	12.0 – 11.0	7.3 – 15.8
Standart (+/-)	13.8 $\pm$ 7.6	12.4 – 8.2	8.4 – 19.2
Sukroz WT	8.6 $\pm$ 2.6	8.3 – 5.3	6.7 – 10.5
Sukroz (+/-)	6.9 $\pm$ 3.3	7.7 – 5.2 ^a	4.3 – 9.4

^a: Standart (+/-) grubuna göre p=0.017 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.9. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda SOD Aktivitesi Ölçümüne Ait Bulgular

Epididimal yağ dokularında ölçülen SOD aktivitesi bakımından gruplar arasında herhangi bir fark görülmedi. Subkutan yağ dokuda standart (+/-) ve sukroz WT gruplarının SOD aktivitesinin standart WT grubuna ve sukroz (+/-) grubunun sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.019, p=0.029). Epididimal ve subkutan yağ dokularında ölçülen SOD aktivitelerinin ortalama ve standart sapma dağılımının ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 35, Tablo 23 ve 24’te gösterilmiştir.



Şekil 35. Epididimal ve subkutan yağ dokularında SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı ^{a,b}: Standart (+/-) ve sukroz WT grupları standart WT grubuna göre p=0.019, ^c: Sukroz (+/-) grubu sukroz WT grubuna göre p=0.029 düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 23. Epididimal yağ dokudaki SOD aktivitelerine ait değerler (U/mg protein)

	Ortalama ± SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	756.0 ± 281.6	749.9 - 411.7	539.5 - 972.5
Standart (+/-)	722.0 ± 280.5	776.5 – 428.1	506.5 – 937.6
Sukroz WT	613.9 ± 204.8	660.0 – 335	467.4 – 760.4
Sukroz (+/-)	543.5 ± 145,3	512.1 – 308.2	392.0 – 696.0

Tablo 24. Subkutan yağ dokudaki SOD aktivitelerine ait değerler (U/mg protein)

	Ortalama ± SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	282.3 ± 102.0	312.3 – 197.7	209.3 – 355.3
Standart (+/-)	498.4 ± 201.4	535.4 – 379.8 ^a	354.3 – 642.5
Sukroz WT	434.9 ± 143.9	385.1 – 254.3 ^a	332.0 – 537.9
Sukroz (+/-)	578.7 ± 152.6	545.8 – 259.0 ^b	469.5 – 687.8

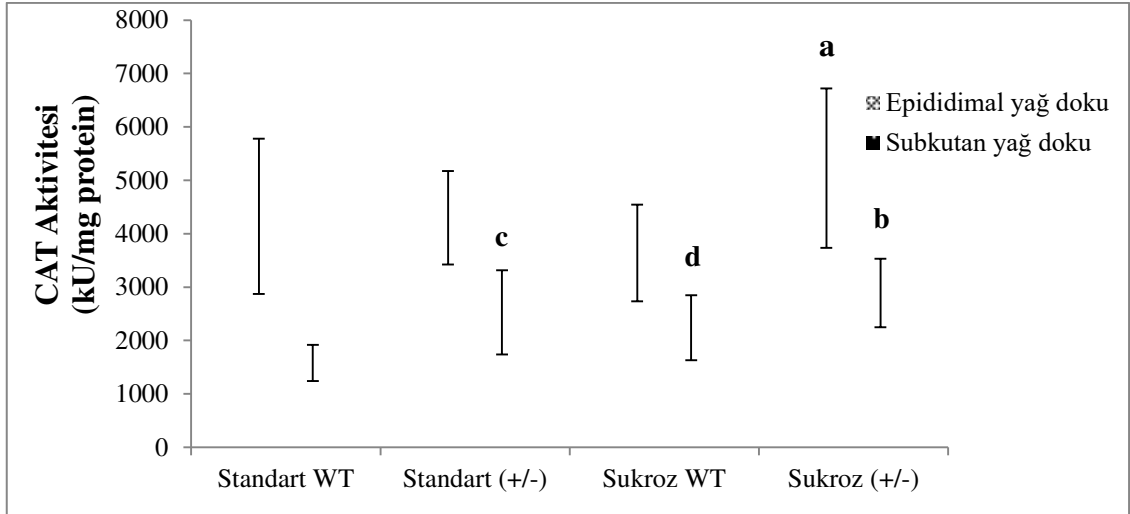
^a: Standart WT grubuna göre p=0.019 düzeyinde anlamlıdır.

^b: Sukroz WT grubuna göre p=0.029 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.10. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda CAT Aktivitesi Ölçümüne Ait Bulgular

Epididimal yağ dokularında sukroz (+/-) grubunun CAT aktivitesinin sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (p=0.019). Subkutan yağ dokuda standart (+/-) ve sukroz WT gruplarının CAT aktivitesinin standart WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.007 ve p=0.015). Ayrıca subkutan yağ dokuda sukroz (+/-) grubunun CAT aktivitesinin sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (p=0.043). Epididimal ve subkutan yağ dokularında ölçülen CAT aktivitelerinin ortalama ve standart sapma dağılımının ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 36, Tablo 25 ve 26’da gösterilmiştir.



Şekil 36. Epididimal ve subkutan yağ dokularında CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı ^{a,b}: Sukroz WT grubuna göre sırasıyla p=0.019 ve p=0.043, ^{c,d}: Standart WT grubuna göre sırasıyla p=0.007 ve p=0.015 düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 25. Epididimal yağ dokudaki CAT aktivitelere ait değerler (kU/mg protein)

	Ortalama ± SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	4326 ± 1453	4187 – 2429	3287.2 – 5366
Standart (+/-)	4297 ± 874	4389 – 1546	3489.2 – 5106
Sukroz WT	3639 ± 907	3666 – 1654	2989.9 – 4288
Sukroz (+/-)	5230 ± 1492	4808 – 2588 ^a	4163.1 – 6298

^a: Sukroz WT grubuna göre p=0.019 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

Tablo 26. Subkutan yağ dokudaki CAT aktivitelere ait değerler (kU/mg protein)

	Ortalama ± SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	1579 ± 340	1618 – 466	1335 – 1822
Standart (+/-)	2529 ± 788	2505 – 1536 ^a	1965 – 3093
Sukroz WT	2239 ± 607	2102 – 1017 ^b	1804 – 2673
Sukroz (+/-)	2890 ± 643	3009 – 931 ^c	2430 – 3350

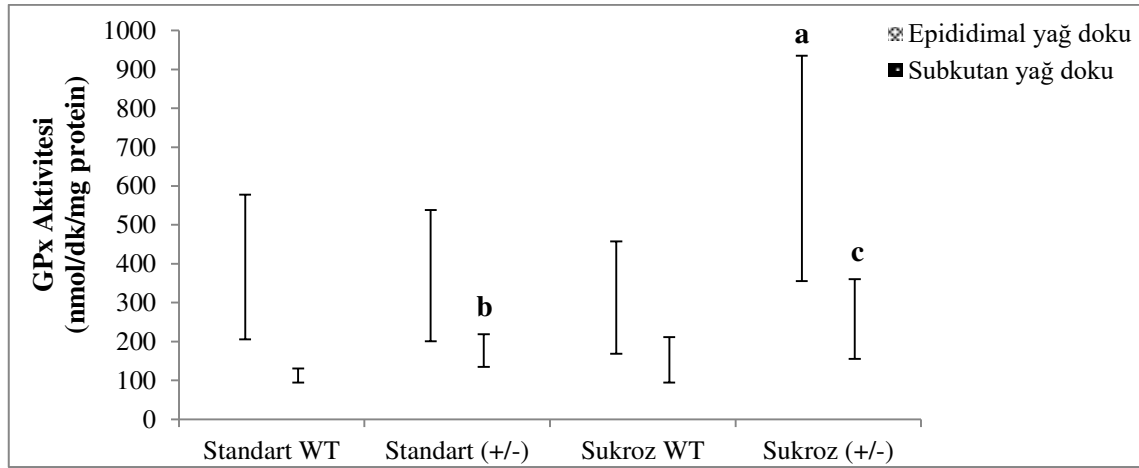
^{a,b}: Standart WT grubuna göre sırasıyla p=0.007 ve p=0.015 düzeyinde anlamlıdır.

^c: Sukroz WT grubuna göre p=0.043 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

6.11. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokuda GPx Aktivitesi Ölçümüne Ait Bulgular

Epididimal yağ dokularında sukroz (+/-) grubunun GPx aktivitesinin standart (+/-) ve sukroz WT gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.029$, $p=0.013$). Subkutan yağ dokuda standart (+/-) grubunun GPx aktivitesinin standart WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.001$). Aynı dokuda sukroz (+/-) grubunun GPx aktivitesinin sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.022$). Epididimal ve subkutan yağ dokularında ölçülen GPx aktivitelerinin ortalama ve standart sapma dağılımının ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 37, Tablo 27, 28’de gösterilmiştir.



Şekil 37. Epididimal ve subkutan yağ dokularında GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı ^a: Standart (+/-) ve sukroz WT gruplarına göre sırasıyla $p=0.029$ ve $p=0.01$, ^b: Standart WT grubuna göre $p=0.001$, ^c: Sukroz WT grubuna göre $p=0.022$ düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 27. Epididimal yağ dokuda GPx aktivitelerine ait değerler (nmol/dk/mg protein)

	Ortalama $\pm$ SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	391.6 $\pm$ 185.9	368.1 – 186.1	236.2 – 547.1
Standart (+/-)	369.2 $\pm$ 169.0	307.4 – 305.2	239.3 – 499.1
Sukroz WT	313.1 $\pm$ 144.2	324.9 – 235.2	202.3 – 423.9
Sukroz (+/-)	645.3 $\pm$ 290.2	662.5 – 591.6 ^a	437.7 – 852.9

^a: Standart (+/-) ve sukroz WT gruplarına göre sırasıyla $p=0.029$ ve $p=0.013$ düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

Tablo 28. Subkutan yağ dokuda GPx aktivitelerine ait değerler (nmol/dk/mg protein)

	Ortalama $\pm$ SD	Medyan-IQR	% 95 CI
Standart WT	112.6 $\pm$ 17.9	109.9 – 27.9	98.9 – 126.4
Standart (+/-)	176.9 $\pm$ 42.1	171.1 – 75.3 ^a	146.8 -206.9
Sukroz WT	152.9 $\pm$ 58.8	150.5 – 103.4	110.8 – 194.9
Sukroz (+/-)	258.0 $\pm$ 102.7	246.7 – 194.1 ^b	179.0 – 337.0

^a: Standart WT grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır.

^b: Sukroz WT grubuna göre p=0.022 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Mann Whitney U” testine göre belirlendi.

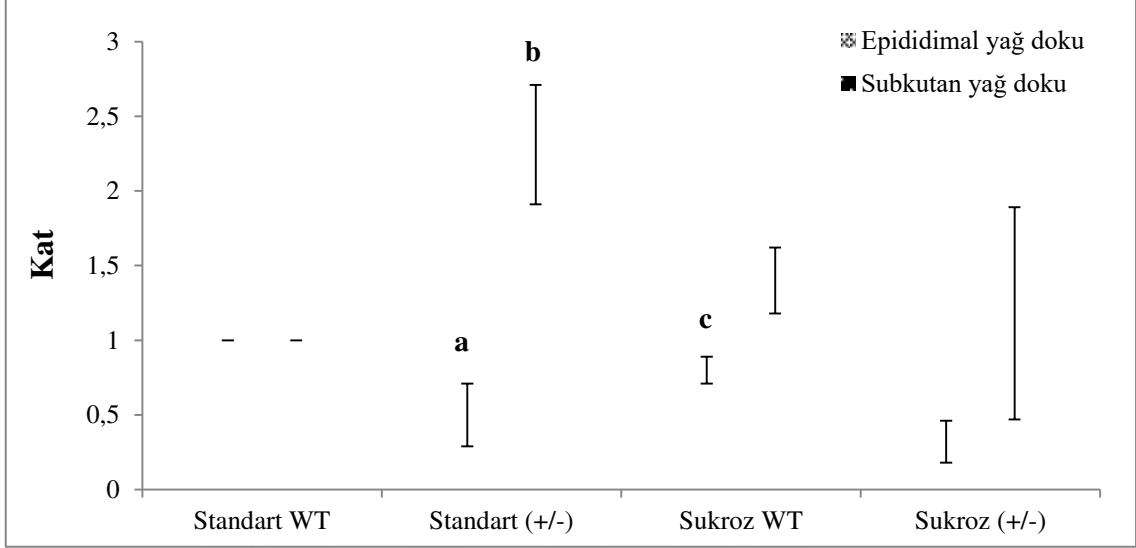
6.12. Epididimal ve Subkutan Yağ Dokularında Ölçülen SOD2, GPx3 ve CAT Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Epididimal ve subkutan yağ dokularında ölçülen SOD2, CAT ve GPx3 gen ekspresyonları kısım 5.3.6.’da belirtildiği üzere, BDNF eksikliğinin ve yüksek sukroz içerikli diyetin etkisini belirlemek amacıyla farklı kontrol grupları kullanılarak hesaplandı. Kullanılan kontrol grupları ve etkisi incelenen etken veya etkenler, aşağıda verilen tüm şekillerin açıklama kısmında verilmiştir.

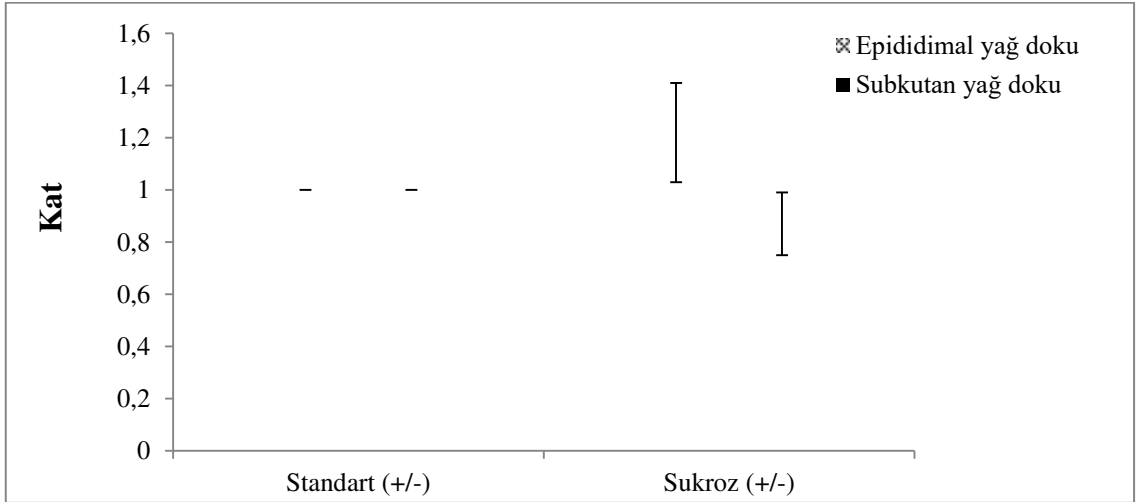
Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla, standart WT grupları kontrol olarak kullanıldı. BHF’lerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonu üzerine etkisini incelemek için, standart (+/-) grupları kontrol olarak kullanıldı. Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini incelemek için, sukroz WT grupları kontrol olarak kullanıldı.

Epididimal yağ dokularında standart (+/-) ve sukroz WT gruplarının SOD2 ekspresyonun standart WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.002, p=0.047). Bu dokuda sukroz (+/-) grubunun SOD2 ekspresyonu sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu (p=0.001). Subkutan yağ dokuda standart (+/-) grubunun SOD2 ekspresyonunun standart WT grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (p=0.006). Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal ve

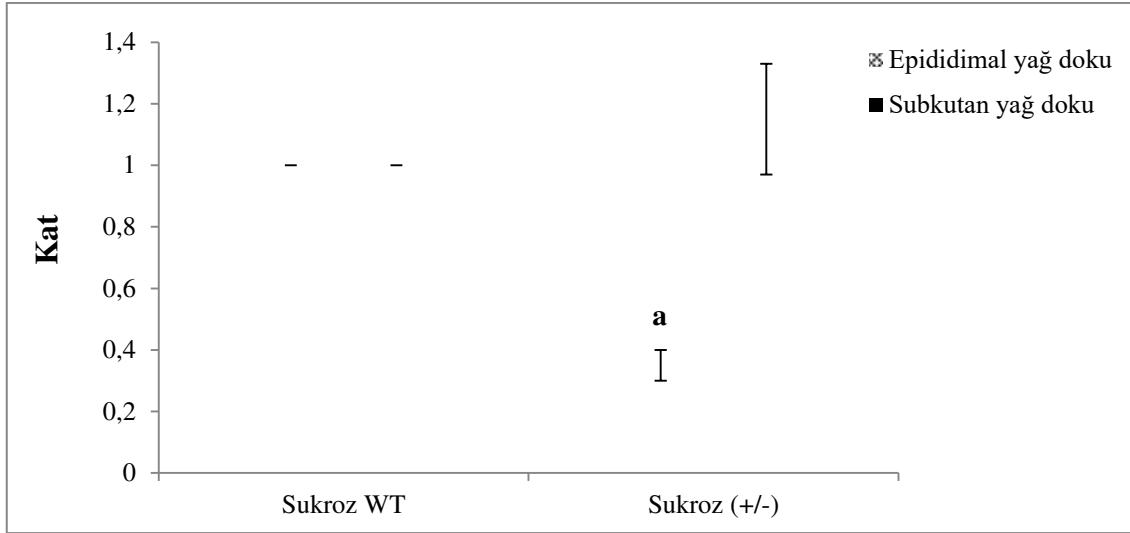
subkutan yağ dokularındaki SOD2 ekspresyonu üzerine etkisi ve $\bar{X} \pm SE$ dağılımının istatistiksel anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 38-40'da gösterilmiştir.



Şekil 38. Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2 ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik. ^{a,b,c}: Standart WT gruplarına göre sırasıyla $p=0.002$, $p=0.006$ ve $p=0.047$ düzeyinde anlamlıdır [Standart WT grubu kontrol olarak kullanıldı].

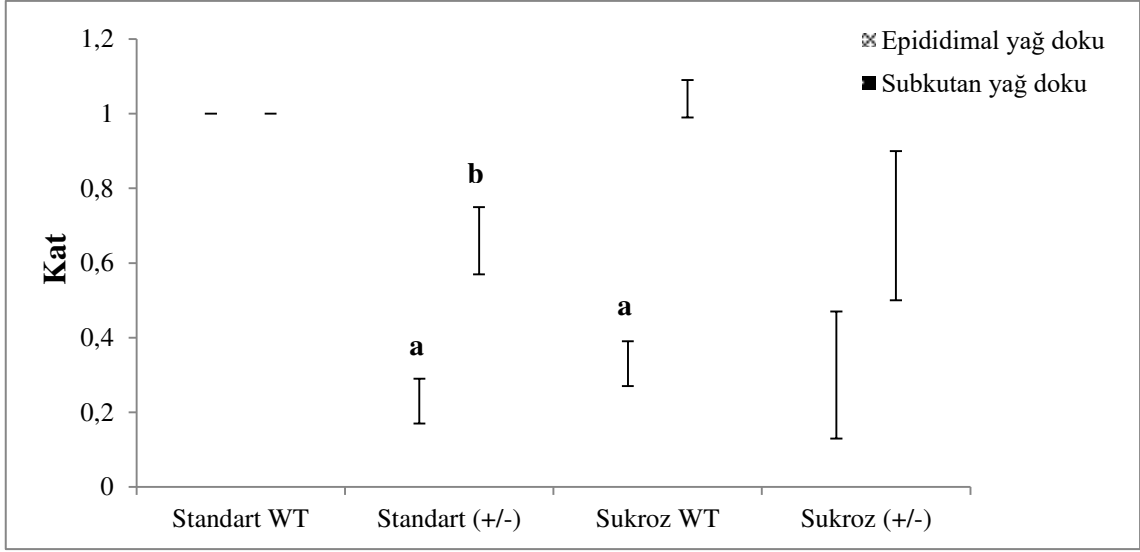


Şekil 39. BHF'lerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2 ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik [Standart (+/-) grupları kontrol olarak kullanıldı].

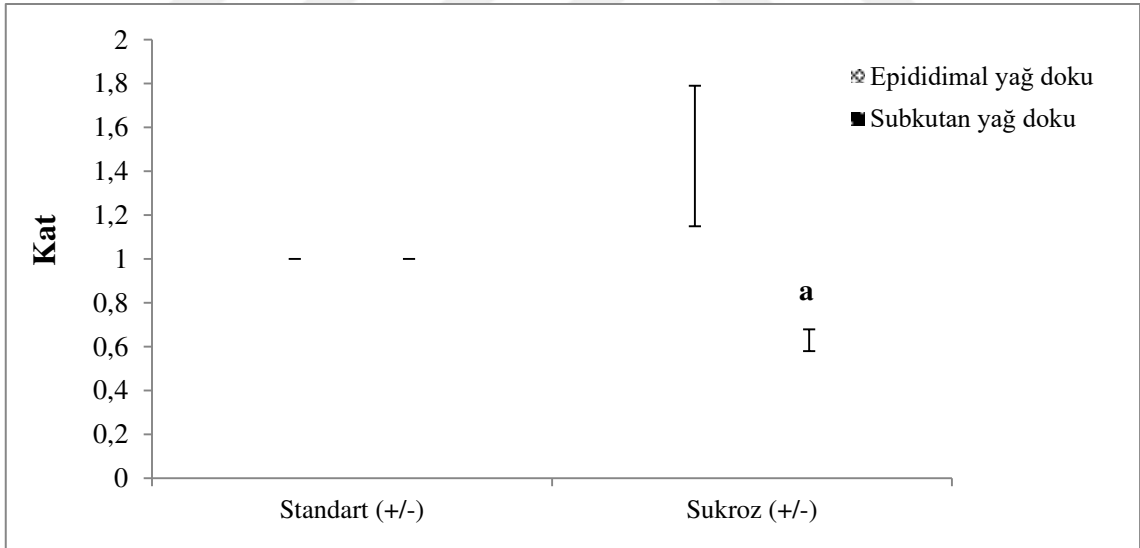


Şekil 40. Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal ve subkutan yağ dokulardaki SOD2 ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini gösteren grafik ^a: Sukroz WT grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır [Sukroz WT grupları kontrol olarak kullanıldı].

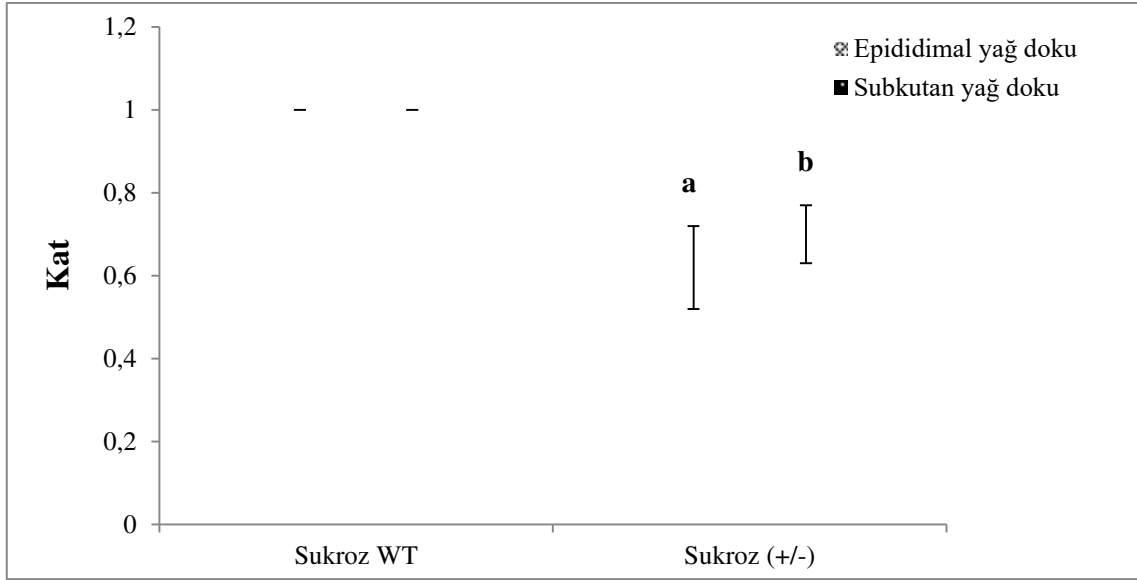
Epididimal yağ dokularında standart (+/-) ve sukroz WT gruplarının GPx3 ekspresyonunun standart WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü (sırasıyla p=0.001, p=0.004). Aynı dokuda sukroz (+/-) grubunun GPx3 ekspresyonu sukroz WT grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu (p=0.010). Subkutan yağ dokuda standart (+/-) grubunun SOD2 ekspresyonunun standart WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (p=0.004). Aynı dokuda sukroz (+/-) grubunun standart (+/-) ve sukroz WT gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.001, p=0.001). Epididimal ve subkutan yağ dokularında ölçülen GPx3 ekspresyonlarının $\bar{X} \pm SE$ değerlerinin dağılımı ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 41-43'te gösterilmiştir.



Şekil 41. Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki GPx3 ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik. ^{a,b}: Standart WT grubuna göre sırasıyla p=0.001 ve p=0.004 düzeyinde anlamlıdır [Standart WT grupları kontrol olarak kullanıldı].

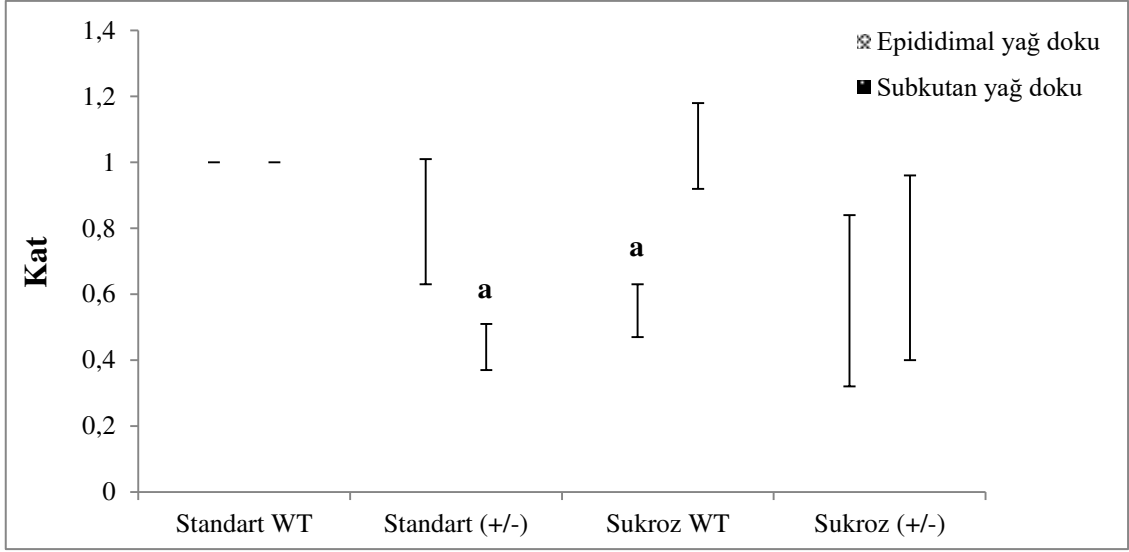


Şekil 42. BHF'lerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki GPx3 ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik. ^a:Standart (+/-) grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır [Standart (+/-) grupları kontrol olarak kullanıldı].

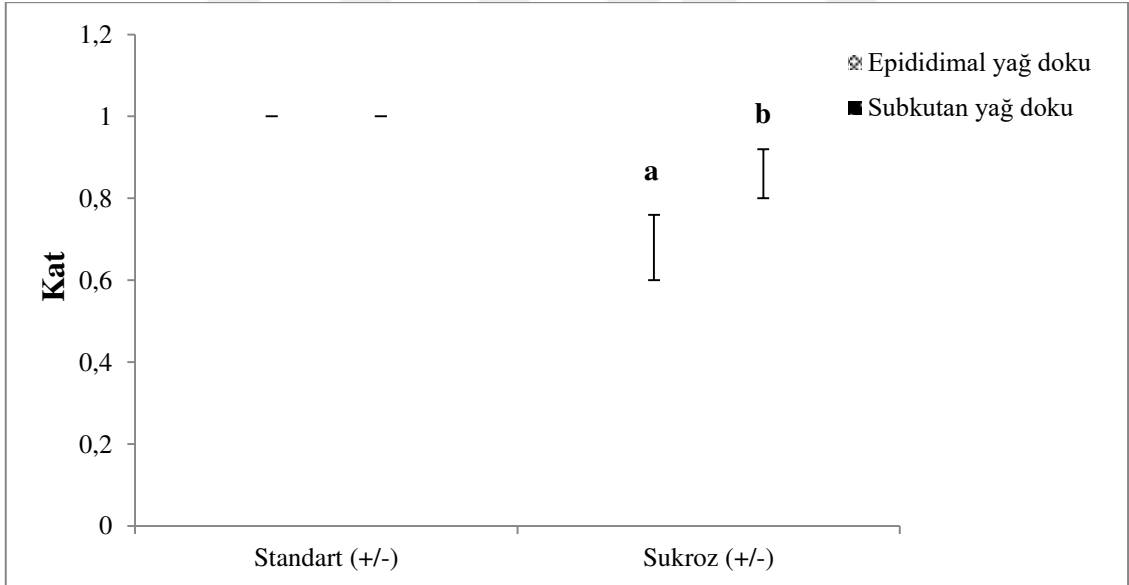


Şekil 43. Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal ve subkutan yağ dokulardaki GPx3 ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini gösteren grafik ^{a,b}: Sukroz WT gruplarına göre sırasıyla p=0.010 ve p=0.001 düzeyinde anlamlıdır [Sukroz WT grupları kontrol olarak kullanıldı].

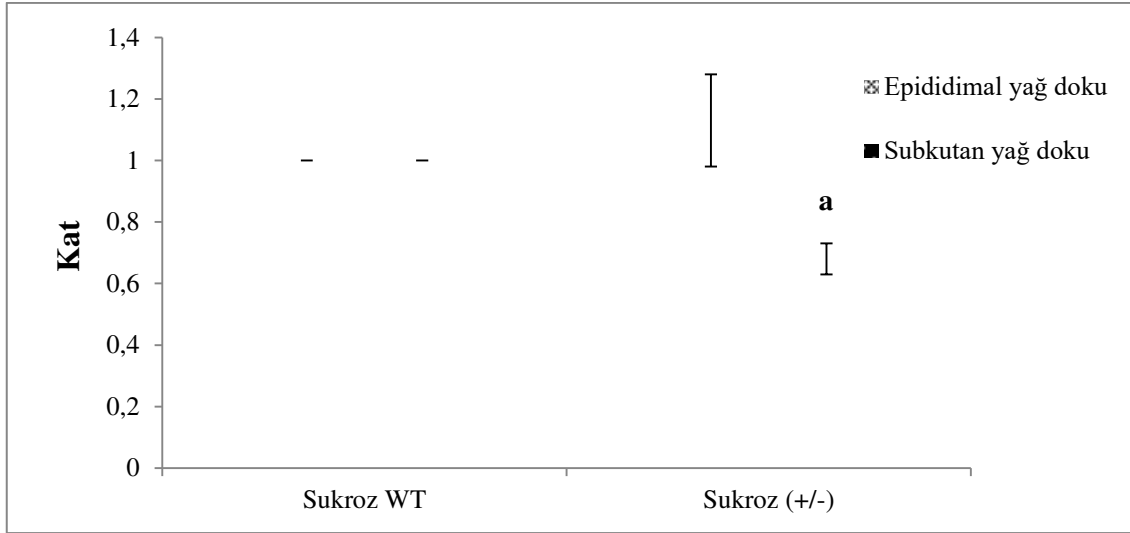
Epididimal yağ dokularında sukroz WT grubunun CAT ekspresyonunun standart WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü (p=0.001). Aynı dokuda sukroz (+/-) grubunun CAT ekspresyonu standart (+/-) grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu (p=0.004). Subkutan yağ dokuda standart (+/-) grubunun CAT ekspresyonunun standart WT grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (p=0.001). Aynı dokuda sukroz (+/-) grubunun standart (+/-) ve sukroz WT gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.035, p=0.001). Epididimal ve subkutan yağ dokularında ölçülen CAT ekspresyonlarının $\bar{X} \pm SE$ değerlerinin dağılımı ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 44-46'da gösterilmiştir.



Şekil 44. Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokulardaki CAT ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik. ^a: Standart WT grubuna göre $p=0.001$ düzeyinde anlamlıdır [Standart WT grupları kontrol olarak kullanıldı].



Şekil 45. BHF'lerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokulardaki CAT ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik. ^{a,b}: Standart (+/-) grubuna göre sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.035$ düzeyinde anlamlıdır [Standart (+/-) grupları kontrol olarak kullanıldı].



Şekil 46. Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal ve subkutan yağ dokularındaki CAT ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini gösteren grafik. ^a: Sukroz WT grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlıdır [Sukroz WT grupları kontrol olarak kullanıldı].

Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonları üzerine etkisini incelemek için, kontrol olarak standart WT grubunun kullanılarak yapılan analizin gruplardaki $\bar{X} \pm SE$ dağılımları Tablo 29 ve 30'da verilmiştir.

Tablo 29. Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun epididimal yağ dokudaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler [Standart WT kontrol olarak kullanıldı]

	SOD2	GPx3	CAT
Standart WT	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Standart (+/-)	0.50 ± 0.21 ^b	0.23 ± 0.06 ^a	0.82 ± 0.19
Sukroz WT	0.80 ± 0.09 ^c	0.33 ± 0.06 ^a	0.55 ± 0.08 ^a

^{a,b,c}: Standart WT grubuna göre sırasıyla p=0.001, p=0.002 ve p=0.047 düzeyinde anlamlıdır.

^p; "Student-t" testine göre belirlendi.

Tablo 30. Standart diyetle beslenen farelerde BDNF eksikliğinin ve wild tip farelerde yüksek sukrozun subkutan yağ dokudaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler [Standart WT kontrol olarak kullanıldı]

	SOD2	GPx3	CAT
Standart WT	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Standart (+/-)	2.31 ± 0.40 ^a	0.66 ± 0.09 ^b	0.44 ± 0.07 ^c
Sukroz WT	1.40 ± 0.22	1.04 ± 0.05	1.05 ± 0.13

^{a,b,c}: Standart WT grubuna göre sırasıyla p=0.006, p=0.004 ve p=0.001 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Student-t” testine göre belirlendi.

BHF’lerde yüksek sukrozun epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonu üzerine etkisini incelemek için, standart (+/-) grupları kontrol olarak kullanılarak yapılan analizin gruplardaki $\bar{X} \pm SE$ dağılımları Tablo 31 ve 32’de verilmiştir.

Tablo 31. BHF’lerde yüksek sukrozun epididimal yağ dokularındaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler [Standart (+/-) kontrol olarak kullanıldı]

	SOD2	GPx3	CAT
Standart (+/-)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Sukroz (+/-)	1.22 ± 0.19	1.47 ± 0.32	0.68 ± 0.08 ^a

^a: Standart (+/-) grubuna göre p=0.004 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Student-t” testine göre belirlendi.

Tablo 32. BHF’lerde yüksek sukrozun subkutan yağ dokularındaki gen ekspresyonları üzerine etkisini gösteren değerler [Standart (+/-) kontrol olarak kullanıldı]

	SOD2	GPx3	CAT
Standart (+/-)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Sukroz (+/-)	0.87 ± 0.12	0.63 ± 0.05 ^a	0.86 ± 0.06 ^b

^{a,b}: Standart (+/-) grubuna göre sırasıyla p=0.001 ve p=0.035 düzeyinde anlamlıdır.

p; “Student-t” testine göre belirlendi.

Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal ve subkutan yağ dokularındaki SOD2, GPx3 ve CAT ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini incelemek için, sukroz WT grupları kontrol olarak kullanılarak yapılan analizin gruplardaki $\bar{X} \pm SE$ dağılımları Tablo 33 ve 34’de verilmiştir.

Tablo 33. Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin epididimal yağ dokularındaki gen ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini gösteren değerler [Sukroz WT kontrol olarak kullanıldı]

	SOD2	GPx3	CAT
Sukroz WT	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
Sukroz (+/-)	0.35 $\pm$ 0.05 ^a	0.62 $\pm$ 0.10 ^b	1.13 $\pm$ 0.15

^{a,b}: Sukroz WT grubuna göre sırasıyla p=0.001 ve p=0.010 düzeyinde anlamlıdır.
^p: “Student-t” testine göre belirlendi.

Tablo 34. Yüksek sukrozlu diyetle beslenmiş farelerin subkutan yağ dokularındaki gen ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin etkisini gösteren değerler [Sukroz WT kontrol olarak kullanıldı]

	SOD2	GPx3	CAT
Sukroz WT	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
Sukroz (+/-)	1.15 $\pm$ 0.18	0.70 $\pm$ 0.07 ^a	0.68 $\pm$ 0.05 ^b

^{a,b}: Sukroz WT grubuna göre sırasıyla p=0.001 ve p=0.001 düzeyinde anlamlıdır.
^p: “Student-t” testine göre belirlendi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nörotrofinler omurgalıların sinir sisteminin gelişimi, korunması ve fonksiyonunda görev alan protein yapıdaki moleküllerdir. Bu moleküller arasında NGF'den sonra tanımlanan ve ikinci nörotrofin olan BDNF nöronların büyümesi, hayatta kalması ve gelişimini destekler (20, 100). Ayrıca son yıllarda BDNF'nin bu fonksiyonlarının yanında vücut ağırlığı ve enerji metabolizması üzerine önemli etkilerinin olduğunu ifade eden yayınlar mevcuttur (11, 101). Bu tez çalışması ile yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen transgenik farelerin metabolik özellikleri farklı olduğu bilinen epididimal ve subkutan yağ dokularındaki oksidan-antioksidan durum incelenerek BDNF'nin, bu yağ dokularında oluşabilecek OS üzerine etkisinin olup olmadığı incelendi.

Yüksek sukroz içerikli diyetin kullanıldığı *in vivo* çalışmalarda, genellikle diyetteki toplam kalori içeriğinin % 30, % 35 ve % 60'ı sukroz olan pellet veya solüsyonların *ad libitum* olarak deney hayvanlarına verildiği görülmektedir. Sukroz içerikli solüsyonların uzun dönemde tüketimi bağırsak ve beyin arasındaki sinyal yollarını ve dolayısıyla bu eksenle metabolik değişimlere daha fazla sebep olabilecek şekilde hormonal değişimlere yol açmaktadır. Sukroz içerikli solüsyonların hipotalamusta proopiomelanokortin, nöropeptit Y'nin ekspresyonunu azalttığı ve yüksek sukroz içerikli solüsyonların insanlar için metabolik olarak zararlı olabileceği öne sürülmüştür (86, 102). Ayrıca fruktoz/sukroz içerikli solüsyonlar glukoz içeriklilere göre postprandiyal plazma glukoz ve insülin seviyesine az miktarda katkıda bulunur ve dolaşımdaki leptin seviyelerinin düşmesine yol açtığı görülmüştür (103).

Yüksek karbohidrat içerikli solüsyonların, pellet yemlere kıyasla iştahı baskılamadığından vücut ağırlığı artışına daha çok etki etmektedir. Pellet yemler bu etkiyi, kolesistokinin salınımının artışı yoluyla iştahı baskılayarak göstermektedir (86). Yüksek sukroz içerikli solüsyonların, obeziteye yatkın olan C57BL6/J ırkı farelerde hiperfaji ve kilo alımını tetiklediği gösterilmiştir (87). Bunun sonucunda oluşacak metabolik değişimler, obeziteye bağlı OS'yi artırır. Sonuçta yüksek karbohidratlı içerikli solüsyonların yol açtığı yağ dokusunun genişlemesine bağlı olan obezitenin, metabolik değişimleri tetikleyerek OS'yi daha da arttırabileceğini söyleyebiliriz. Bu etkiyi azaltmak ve sadece sukrozun OS'ye katkısını değerlendirebilmek için yüksek

sukroz içerikli solüsyonlar yerine protein, karbohidrat ve lipid muhtevası standardize edilmiş pellet şeklinde ticari olarak satılan diyetler bu tez çalışmasında kullanıldı. Ratlarda % 60 gibi yüksek oranda sukroz içeren diyet, metabolik sendromu indüklediğinden bu orandaki diyetin kullanımının ve ayrıca fruktozun saf halde kullanımının insanlardaki beslenme alışkanlığına uygun olmadığından dolayı fizyolojik olmadığı belirtilmektedir (104). Bu sebepten ötürü bu tez çalışmasında kalori içerikleri eşit olan % 35 sukroz içeren ve bu diyetin kontrolü mahiyetindeki % 7 sukroz içeren standart diyet dört aylık beslenme periyodunda kullanıldı. Ayrıca kullanılan her iki tür diyetteki toplam karbohidrat içeriği % 70'tir (Diyet içerikleri için Bkz. Ek 1 ve Ek 2). Tartışma kısmının ilerleyen bölümünde çalışmamızla ilişkili olan ve katı diyetlerin kullanıldığı çalışmalara öncelikle yer verilmiştir. Ancak solüsyonların kullanıldığı çalışmaların değerlendirildiği kısımlarda, kullanılan sukroz içerikli diyetin solüsyon olarak deney hayvanına verildiği ayrıca belirtilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan tüm deney hayvanları her biri ayrı ayrı havalandırılan kafeslerde ve her kafeste bir deney hayvanı olacak şekilde barındırıldı. Böylece deneyde kullanılan BHF'lerin karakteristik saldırgan hallerinden dolayı birbirleriyle kavga etmesi ve feromonlardan etkilenmesinin önüne geçildi. Ayrıca bu şekilde hayvanların sistemik barındırılması yoluyla çalışmada homojen bir ortam oluşturuldu ve hayvanların birbirlerinin metabolik atıklarından etkilenmesinin önüne geçilerek standardizasyon sağlandı.

Tüm gruplar, başlangıç ağırlıklarında fark olmayacak şekilde oluşturuldu (Tablo 14; $p>0.05$). Standart ve yüksek sukroz içerikli diyetlerle beslenen wild tip farelerin haftalık ortalama ağırlıklarının birbirine çok yakın hatta bazı haftalarda hemen hemen eşit olduğu görüldü (Şekil 27). Her iki tür diyetle beslenen BHF'lerin haftalık ortalama ağırlıklarının da wild tip farelerdekine benzer şekilde hemen hemen birbirine yakın olarak seyrettiği belirlendi (Şekil 27). Her iki tür diyetle beslenmiş heterozigot farelerin son ağırlıkları, wild tip farelerinkine göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Tablo 14; $p=0.001$, $p=0.019$). Ancak standart ve yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip farelerin son ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunamadı. Dolayısıyla çalışmamızda görülen kilo artışlarının BDNF eksikliğinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Tillman ve arkadaşları, bizim de kullandığımız C57BL6/J ırkı wild tip fareleri % 60 fruktoz ve % 60 sukroz içeren diyetlerle 20 hafta boyunca beslemişler ve bu farelerle kontrol

diyetiyle beslenen fareler arasında vücut ağırlığı bakımından herhangi bir fark görememişlerdir (105). Sumiyoshi ve arkadaşları, C57BL6/J ırkı wild tip erkek fareleri % 50 sukroz içerikli diyetle 55 hafta beslemişler ve bu farelerle kontrol diyetiyle beslenen fareler arasında son vücut ağırlıkları bakımından herhangi bir fark bulamamışlardır (106). A/J ve C57BL6/J ırkı wild tip farelerde düşük yağ yüksek sukrozlu diyetle yapılan ve dört ay süren çalışmada, bu diyetin vücut ağırlığına önemli katkı sağlamadığı belirlenmiştir (107). Bu çalışmalarda fare dokularının yüzey alanı/hacim oranının yüksek olmasından dolayı, farelerin metabolik hızlarının yüksekliği sonucunda yüksek fruktoz tüketimini tolere edebileceği, ayrıca farelerin sukraz enzim aktivitesinin yüksekliği sonucunda da bu toleransın sağlanabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda yüksek sukroz içerikli diyetin hem wild tip hem de BHF'lerin vücut ağırlıklarına önemli derecede etki etmediği ancak BDNF eksikliğinin farelerin vücut ağırlığının artışına yönelik önemli katkı sağladığı görüldü. Fox ve arkadaşları BHF'lerin iştahın artmasıyla hiperfajinin de arttığını ve bunun da vücut ağırlığının artmasına yol açtığını göstermişlerdir (108). % 6 yağ içeren kontrol diyetiyle altı ay beslenen wild tip ve BHF'lerde gerçekleştirilen çalışmada, beslenmenin altıncı ayında transgenik farelerin vücut ağırlığında anlamlı bir artış görülmüştür. Çalışmalarının sonucunda ise uzun süre standart diyetle beslenmiş BHF'lerde obezitenin gelişmediği ve metabolik mekanizmaların vücut ağırlığını kontrol ettiği kanısına varmışlardır (109). Rios ve arkadaşları BHF'lerin wild tip farelere kıyasla obeziteye daha çok yatkın olduklarını göstermişlerdir. Bu farelerde kronik hiperfajinin ve yaşa bağlı olarak obezitenin geliştiğini de göstermişlerdir. Bunun yanı sıra, BHF'lerde anksiyete ve depresyon ile ilişkili davranışlar da gözlemlenmiştir (110). BHF'lerde görülen bu gibi anormal davranışlar bu tür farelerde beslenme bozukluklarına da yol açmaktadır (111). Sonuçta çalışmamızda vücut ağırlığına dair elde edilen veriler ile literatürde mevcut olan benzer çalışmalardaki veriler uyumludur. Genç BHF'lerin hiperfajik özellik göstermesinden dolayı bu farelerin kilo alımına daha meyilli olduğu bilinmektedir (112). Ayrıca BDNF eksikliği gastrointestinal sistemde bulunan enteroendokrin hücrelerin fonksiyonlarının değişimine yol açarak ghrelin, kolesistokinin ve glukagon benzeri protein-1 gibi hormonların fizyolojik salınımının bozulmasına sebep olur.

Dolayısıyla BHF’lerde beslenme davranışının da bozulmasıyla beraber hiperfaji ve obezite gelişimi görülebilir (108).

Literatürde beslenme sürecinde yüksek sukroz içerikli diyet ve BHF modelinin beraber kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu bakımdan çalışmamız, BHF modelinde yüksek sukroz içerikli diyetin kullanıldığı ve metabolik değişkenlerin ölçüldüğü ilk çalışmadır. Çalışmamızda yüksek sukroz içerikli diyetin kullanıldığı grupların her ikisinde de serum glukoz ve insülin seviyelerinin, bu grupların kontrolü olan standart diyetin kullanıldığı gruplardan anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (Tablo 14; $p<0.05$). Bununla birlikte, hem standart hem de yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF’lerin serum glukoz ve insülin seviyelerinin wild tip farelere nazaran anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 14; $p<0.05$). Ancak, serum TAG seviyeleri üzerine hem kullanılan diyet türünün hem de BDNF’nin muhtemel bir etkisini saptayabileceğimiz istatistiksel anlamlı sonuçlara ulaşamadı (Tablo 14). % 32 sukroz içeren diyet ile Swiss Webster ırkı erkek farelerde gerçekleştirilen dört haftalık çalışmada serum glukoz seviyesi, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Serum insülin ve TAG seviyeleri bakımından bu iki grup arasında herhangi anlamlı bir fark görülmemiştir (113). Wistar ırkı sıçanlarda yüksek yağlı diyet ve bu diyetin kontrolü olarak bu tez çalışmasında da kullanılan ve aynı firmadan temin edilen % 35 sukroz içeren diyet ile gerçekleştirilen altı haftalık çalışmada, plazma insülin, glukoz ve TAG seviyeleri kontrol grubunda daha anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (114). İki ay boyunca % 32 sukroz içerikli diyetle beslenen üç aylık C57BL/6 ırkı erkek farelerin serum TAG seviyesi, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (115). Ancak farklı olarak, % 43 sukroz içeren diyetle dört ay beslenen dört haftalık C57BL6/J ırkı erkek farelerin glukoz ve insülin seviyelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (116). Standart diyet ile üç ay süreyle beslenen BHF’lerin serum glukoz ve insülin seviyelerinin wild tip farelere göre daha yüksek olduğu belirlenmiş, sonuç olarak BDNF’nin glukoz metabolizması için önemli bir düzenleyici olabileceği ve BDNF’nin hipotalamustaki reseptörlerini doğrudan aktifleştirerek enerji dengesi ve besin alımını düzenleyebileceği öne sürülmüştür (117).

Çalışmamızda yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip fareler ile standart diyet ile beslenen kontrol grubu arasında HOMA-IR skoru bakımından anlamlı fark olmadığı belirlendi. Ancak sadece yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen BHF'lerin HOMA-IR skorunun, aynı tip diyetle beslenen wild tip farelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Standart diyet ile beslenen BHF'lerin HOMA-IR skorunun da aynı tip diyetle beslenen wild tip farelere göre daha yüksek olduğu ancak bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlılık arz etmediği belirlendi (Tablo 14). Yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen ve serum/plazma glukoz, insülin ve TAG gibi metabolik değişkenlerin ölçüldüğü çalışmalarda elde edilen veriler kullanılan deney hayvanı türüne, beslenme süresi ve kullanılan diyetlerin içeriğine göre değişkenlik göstermektedir (113-118). Çalışmamızda yüksek sukroz içerikli diyet ile dört aylık beslenme süreci sonunda wild tip ve heterozigot farelerde sistemik hiperglisemi ve hiperinsülinemi görüldü. BDNF eksikliğinin hiperglisemi ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda BDNF glukoz metabolizması üzerine etkisini, karaciğer glikojen seviyesini düşürmesinin yanı sıra karaciğerde alanin aminotransferaz/aspartat aminotransferaz oranını düşürerek ve bunun sonucunda karaciğerdeki yağlanmayı azaltarak gösterdiği bulunmuştur (119, 120). Çalışmamızda da BDNF eksikliğinin hiperglisemi ile ilişkili olduğuna yönelik veriler elde edildi (Tablo 14). İnsülin direncinin tahmini bir göstergesi olan HOMA-IR skorları göz önüne alındığında BDNF eksikliğinin farelerde insülin direncine yol açtığını söyleyebiliriz. Ayrıca yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip farelerin HOMA-IR skorunda artış görülememesinin sebebi dört aylık beslenme süresinin C57BL6/J ırkı farelerde insülin direnci gelişiminde yetersiz kalması olabilir. Ancak çalışmamızda HOMA-IR skorları bakımından, BHF'lerde insülin direncinin geliştiğini söyleyebiliriz. Ayrıca çalışmamızdaki serum adipokin seviyeleri bakımından da BHF'lerde insülin direncinin geliştiğini söylemek mümkündür. İnsülin direncinin olduğu obez bireylerde özellikle adiponektin seviyelerinin azaldığı bilinmektedir (121). Çalışmamızda kullanılan BHF'lerin son ağırlıkları, bu farelerin obez karakterde olduğunu göstermektedir (Tablo 14). Hem yüksek sukrozlu diyetle hem de standart diyetle beslenen BHF'lerin serum adiponektin seviyesinin, wild tip kontrollerine göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü (Tablo 17; $p<0.05$).

Transgenik farelerdeki BDNF eksikliğini deneysel olarak gösterebilmek için farelerde serum BDNF seviyeleri ticari olarak satın alınan ELISA kitiyle belirlendi (Bkz. Kısım 5.2.8.). Ancak kullanılan ELISA kiti mBDNF'ye özgü antikoru içermediğinden dolayı bu protein, biyolojik olarak farklı etkilere yol açan proBDNF'den ayırt edilerek ölçülemedi. Bu nedenle çalışmamızda elde edilen serum BDNF seviyelerinin, toplam BDNF seviyesi olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Literatürdeki mevcut çalışmalarda ELISA yöntemiyle BDNF seviyesinin belirlenmesinde genellikle amigdala, hipokampus gibi beynin farklı bölümlerinden elde edilen homojenatlar kullanılmıştır (122-124). Ancak bu tez çalışmasında beyin dokusunun kapsamımızın dışında olması nedeniyle wild tip ve BHF'lerin tümünde serumdaki toplam BDNF seviyeleri ölçüldü.

Çalışmamızda hem standart diyet hem de yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerin serum BDNF seviyesi, wild tip farelerin bulunduğu kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 28, Tablo 15; $p<0.05$). Bu veriler BHF'lerdeki sistemik BDNF seviyesinin düşük olduğunu teyit etmektedir. Ancak dişi BHF'lerin BDNF seviyesi erkek BHF'lere kıyasla daha yüksektir ve bu transgenik farelerde yaşlanma ile de BDNF seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (125-127). Çalışmamızda transgenik erkek farelerin kullanılması sebebiyle bu farelerdeki BDNF seviyesinin düşüklüğünün genel popülasyon yönünden değerlendirilmesi söz konusu değildir. Ayrıca bu çalışmada aynı yaş grubundaki deney hayvanları kullanılmıştır. Serum BDNF seviyelerine yaşın ve cinsiyetin etkisini ortadan kaldırmak için, çalışmamızda aynı yaş ve cinsiyette (erkek) olan deney hayvanları kullanıldı. Eğer BDNF enerji dengesi düzenleyici role sahipse, BDNF'nin ekspresyon seviyelerinin besinsel durumdaki değişimi yansıtabileceği belirtilmektedir (101). Literatürde yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerde serum BDNF seviyelerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Ancak sadece yüksek sukroz içerikli diyet ile dokuz hafta beslenen erkek BALB/c farelerin hipokampus ve prefrontal kortekslerinden elde edilen homojenatlarında BDNF seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçülmüş ve sukrozun BDNF seviyeleri üzerine herhangi bir etkisi belirlenememiştir (128). Çalışmamızda da yüksek sukroz içerikli diyet türüyle beslenen hem wild tip hem de transgenik farelerin BDNF seviyelerinin kontrol gruplarına göre bir miktar azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 28, Tablo 15; $p>0.05$).

Leptin merkezi sinir sisteminde besin alımını inhibe eden ve enerji tüketimini arttırarak adiposit birikimine karşı koyan bir hormondur. Enerji dengesinin düzenlenmesinde BDNF ile leptinin etkileşiminin incelendiği çalışmada, leptinin beyindeki dorsal vagal kompleks ve ventromedial hipotalamik çekirdek gibi bölgelerde BDNF'yi arttırarak besin alımını azalttığı gösterilmiştir (129). Çalışmamızda serum leptin seviyesinin yüksek olduğu gruplarda, leptin direncinin oluşabileceği ileri sürülebilir. Sonuçta, serum leptin seviyeleri bakımından literatürde mevcut olan benzer çalışmalardaki verilerle çalışmamızda elde ettiğimiz veriler uyumludur. Obez bireylerde plazma leptin düzeyinin yüksek olduğu ve bu bireylerde leptin direncinin olduğu görülmüştür (101). Üç aylık erkek wild tip ve BHF'lerin *ad libitum* olarak üç ay boyunca standart diyet ile beslenmesi ile gerçekleştirilen bir çalışmada, transgenik farelerin açlık serum leptin seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (117). Altı aylık BHF'lerin serum leptin seviyesi wild tip farelere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (25). Fruktozlu diyetlerle uzun süreli beslenen ratların leptin seviyesi yüksektir ve bu ratlarda leptin direncinin gelişim gösterebileceği belirtilmektedir (130). 55 hafta boyunca % 50 sukroz içerikli diyetle beslenen C57BL/6J ırkı erkek farelerin plazma leptin düzeyleri kontrol diyetiyle beslenen grubunkine göre yüksek bulunmuştur (131). İki ay boyunca % 32 sukroz içerikli diyet ile beslenen üç aylık C57BL6/J ırkı erkek farelerin serum leptin seviyesini kontrol diyeti ile beslenen gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (115). % 50 sukrozlu diyet ile 10 hafta boyunca beslenen C57BL6/J ırkı erkek farelerin serum leptin seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (132). 12 hafta süreyle yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen dört haftalık ICR ırkı erkek farelerin açlık leptin seviyelerinin, standart diyet ile beslenen gruptakilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (133). Literatür taraması sonucunda, yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerde serum leptin seviyelerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Çalışmamızda standart ve yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen transgenik farelerin serum leptin seviyeleri, wild tip kontrollerine göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Bunun yanı sıra yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip farelerin serum leptin seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ancak bu grupların son ağırlıkları arasında herhangi bir fark görülmedi (Şekil 29, Tablo 14 ve 16; $p<0.05$). Leptin başlıca subkutan yağ dokuda

vücut ağırlığı ile orantılı olarak sentezlenmektedir. Yüksek sukroz tüketen wild tip farelerle standart diyet tüketen wild tip fareler arasında ağırlık bakımından fark olmaksızın serum leptin seviyelerinin farklı olmasının subkutan yağ dokudaki stromal vasküler fraksiyonlardaki inflamatuvar hücrelerin, bu dokuda leptin üretimini arttıran sitokinleri uyarmış olmasının bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz.

Adiponektin insülin duyarlılığını artırma ve inflamasyonu azaltma gibi faydalı metabolik etkilere sahip bir hormondur (134). Düşük adiponektin seviyelerinin tip 2 diyabet, kalp-damar hastalıkları, obezite gibi ciddi patolojik durumlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (48). Schultz ve arkadaşları % 50 sukroz içerikli diyet ile 15 hafta besledikleri 12 haftalık C57BL6/J ırkı erkek farelerin plazma adiponektin seviyesini, kontrol diyetiyle besledikleri gruba göre anlamlı derecede düşük bulmuşlardır (135). Sukroz bakımından zengin diyet ile beslenen C57BL6/J ırkı erkek farelerde serum adiponektin seviyesi, kontrol diyeti ile beslenen gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (115). Ancak farklı olarak Sumiyoshi ve arkadaşları 55 hafta boyunca % 50 sukroz içerikli diyetle besledikleri C57BL/6J ırkı erkek farelerde plazma adiponektin seviyesini, kontrol diyetiyle beslenen grubunkine göre yüksek bulmuşlardır (106). Ayrıca literatür taraması sonucunda yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerin serum adiponektin seviyelerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamız BHF'lerde serum adiponektin seviyelerinin ölçüldüğü ilk çalışmadır. Çalışmamızda standart ve yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerin serum adiponektin seviyeleri, wild tip kontrollerine göre anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 30, Tablo 17; $p<0.05$). Elde ettiğimiz veriler, adiponektin düşüklüğünün OS stres ve insülin direncine sebep olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda BHF'lerin HOMA-IR skorlarının wild tip kontrollerine yüksek olduğu görüldü ve serum adiponektin seviyelerinin de bu gruplarda düşük olduğu görüldü (Tablo 14, 17). Standart diyetle beslenen BHF'lerin serum 4-HNE seviyesinin, wild tip kontrollerine göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ve ayrıca serum adiponektin seviyelerinin de bu grupta da daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 33, Tablo 20).

Rezistin özellikle insan makrofajlarında, kemirgenlerde ise adipositlerde sentezlenen ve inflamatuvar süreç ile ilişkili olduğu bilinen sisten bakımından zengin bir hormondur. Rezistin seviyesi şişmanlık ile paralel şekilde artarken, obez kemirgenlerde insülin direnci gelişimiyle yakından ilintilidir (134, 136). Literatürde kemirgenlerde

sukroz içerikli diyetin esas alındığı ve serum rezistin seviyelerinin ölçüldüğü sadece bir çalışma bulunabilmektedir. Bu çalışmada iki ay boyunca % 32 sukroz içerikli diyetle beslenen üç aylık C57BL/6 ırkı erkek farelerin serum rezistin seviyesi, standart diyetle beslenen kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (115). Ayrıca yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerin serum rezistin seviyelerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız BHF'lerde serum rezistin seviyelerinin ölçüldüğü ilk çalışmadır. Çalışmamızda standart ve yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen BHF'lerin serum rezistin seviyeleri ile bu diyetlerle beslenen wild tip kontrolleri arasında herhangi bir anlamlı artış veya azalış görülmedi (Şekil 31, Tablo 18). Verilerimizde serum rezistin bakımından beklenen artışın görülememesinin nedenleri yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen C57BL6/J ırkı farelerin epididimal ve subkutan yağ dokularının büyüklüğünün, standart diyet ile beslenen farelerinkine kıyasla farksız olması olabilir (Yağ dokularının görünümü için Bkz. Şekil 25 ve Şekil 26). Ayrıca bu farelerin yaşlarının küçük olması da bu duruma katkı sağlayarak insülin direncinin yeterince gelişmemesine katkı sağlamış olabilir. Çalışmamızda insülin direncinin gelişiminin hiperglisemi ve BDNF bağımlı olduğu görüldü ancak bu gelişimde rezistinin katkısı yetersiz kalmış olabilir.

Proteinlerdeki tirozin rezidülerinin translasyon sonrası genellikle peroksinitrit aracılı nitratlanması sonucu oluşan 3-NT, bu proteinlerin fonksiyonlarının değişmesine yol açarak OS ve inflamatuvar süreç ile ilişkili hastalıkların riski ve gelişimi hakkında bir gösterge olarak kullanılmaktadır (137). Bu nedenle, çalışmamızda sistemik OS'nin değerlendirilmesi bakımından inflamasyon ile de ilişkili bir gösterge olan serum 3-NT seviyeleri ölçüldü. BHF'lerde doku, serum veya plazmada 3-NT seviyesinin herhangi bir amaçla ölçüldüğü bir çalışma mevcut değildir. Bu yönden çalışmamız BHF'lerde 3-NT seviyesinin ölçüldüğü ilk çalışma özelliğindedir. Ayrıca literatürde, kemirgenlerde yüksek sukroz içerikli diyetin kullanıldığı ve plazma 3-NT seviyesinin ELISA yöntemiyle ölçüldüğü sadece bir adet çalışma mevcuttur. Bu çalışmada altı hafta boyunca aşırı yüksek sukroz içerikli diyet (720 g sukroz/kg diyet) ile beslenerek insülin direnci oluşturulan altı haftalık erkek Wistar sıçanların plazma 3-NT seviyesi, standart diyet ile beslenen gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (138). Çalışmamızda yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip farelerin serum 3-NT seviyesinin standart diyetle beslenen farelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu

belirlendi (Şekil 32, Tablo 19, $p<0.05$). Serum 3-NT seviyesi üzerine BDNF eksikliğinin herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü. Çalışmamızda serum 3-NT seviyeleri bakımından yüksek sukroz içerikli diyetin sistemik oksidatif stresini indüklediğini ancak BDNF eksikliğinin sistemik oksidatif stres üzerine etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

Lipid peroksidasyonu son ürünlerinden olan 4-HNE, proteinlerle reaksiyona girerek bunların konformasyonunu ve dolayısıyla fonksiyonlarını değiştirir. 4-HNE-modifiye proteinler, serbest 4-HNE'ye kıyasla yüksek biyolojik kararlılık gösterdiğinden OS biyobelirteci olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca obezite ve insülin direncinin en karakteristik özelliklerinin artan ROS ve 4-HNE-modifiye protein seviyesi olduğu açıktır (139). Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda, sistemik OS'nin değerlendirilmesi amacıyla 4-HNE ile modifiye olan serum proteinlerine bağlı olarak serum 4-HNE seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. BHF'lerde doku, serum veya plazmada 4-HNE seviyesinin herhangi bir amaçla ölçüldüğü bir çalışma mevcut değildir. Aynı şekilde yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen kemirgenlerde 4-HNE seviyesinin ölçüldüğü herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Çalışmamız dolayısıyla BHF'lerde ve yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen kemirgenlerin 4-HNE seviyesinin ölçüldüğü ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda hem standart diyetle beslenen BHF'lerin hem de yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip farelerin serum 4-HNE seviyesinin standart diyetle beslenen wild tip farelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Şekil 33, Tablo 20; $p<0.05$). Çalışmamızda serum 4-HNE seviyeleri bakımından yüksek sukroz içerikli diyetin sistemik OS'yi indüklediği ve BDNF eksikliğinin sistemik OS üzerine etkisinin olabileceği belirlendi. Ayrıca yüksek sukroz kullanımıyla serum adiponektin seviyelerinin azaldığı, leptin seviyelerinin ise arttığı belirlendi (Şekil 29, 30; Tablo 16, 17). Dolayısıyla yüksek sukrozlu diyetin tüketiminin sistemik OS'i arttırdığını, serum adiponektin ve leptin seviyeleri bakımından da söyleyebiliriz.

Beyaz yağ dokularından protein ve lipid fazlarının ayrıştırılmasında kullanılan yöntem, Sajic ve arkadaşlarının çalışmasında elde ettiği veriler ışığında belirlendi (140). Ancak bu çalışmada beyaz yağ dokusundan protein ekstraksiyonunda kullanılan ve homojenizasyon aşamasında deterjanın kullanılmadığı üç adet yöntemin karşılaştırılması yapılmış, sonuçta Bligh ve Dyer'ın geliştirdiği yöntemin en uygun

yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu yöntemin lipidlerin uzaklaştırılmasının ardından lipid damlacıklarında bulunan perilipin A proteininin daha iyi izole edilebildiği ve farklı yapısal ve hücresel bölümlerdeki proteinlerin kazanımında daha verimli olduğu gösterilmiştir (91, 140). Bu sebepten ötürü çalışmamızda beyaz yağ dokularından protein ve lipid fraksiyonları, Bligh ve Dyer'ın geliştirdiği yöntem esas alınarak elde edildi.

Çalışmamızda kullandığımız farelerden yaklaşık 400 mg beyaz yağ dokusu elde edildi. Ancak bu dokuların yaklaşık 100 mg'ı protein ve lipid fraksiyonlarını ayırmak için kullanılabildi. Bu amaçla 100 mg gibi düşük miktardaki beyaz yağ dokusundan protein izolasyonunu yapabilmek ve +4 °C'deki santrifüjün gerçekleştirilebilmesi için kullanılan reaktiflerin ve tamponların hacimlerinde orantılı olarak azaltılma yoluna gidildi. Homojenat ile azaltılan reaktifler 1.5 mL'lik reaksiyon tüplerine eklendi ve +4 °C'de santrifüj gerçekleştirildi. Böylece beyaz yağ dokusunun homojenizasyonundaki zorluğun getirdiği zaman kaybı azaltılarak çalışmanın optimizasyonu sağlandı ve protein fraksiyonun içeriğinin etkilenmesinin önüne geçildi. Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fraksiyonda MDA seviyeleri ve SOD, CAT ve GPx aktiviteleri ölçüldü.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA oldukça reaktif bir ürün olup birçok biyomolekül ile reaksiyona girer. MDA proteinlerin yapısında bulunan primer aminlerle reaksiyona girerek 2-propenal lisin şekline dönüşür. Bu MDA-protein ürün kompleksi 1-amino-3-iminopropen ve piridildihidropiridin ile lisin-lisin köprüleri oluşturur (141). MDA'nın çeşitli proteinlerle etkileştiği ve ürün olarak MDA-protein komplekslerinin oluştuğu ve bu ürünlerin çeşitli hastalıkların patolojisinde rol aldığı son yıllardaki çalışmalarda gösterilmiştir (142-144).

MDA seviyelerinin belirlenmesi amacıyla geliştirilen yöntemlerin temelinde genellikle TBA ile MDA'nın türevlendirilmesi vardır. MDA'nın TBA ile türevlendirilmesi ile oluşan MDA-TBA ürün kompleksinin absorptivitesi yüksektir ve spektrofotometre ile kolayca ölçülebilir (145). Ancak TBA, MDA dışındaki diğer aldehit ürünleri ile de reaksiyona girme eğiliminde olduğu için bu temele dayanan yöntemlerin spesifitesi düşüktür. Ayrıca bu temele dayanan yöntemlerde, numunelerin 100 °C'deki inkübasyon süresinin uzaması sonucunda ileri oksidasyon ürünleri de

oluşabilir ve deneylerin tekrarlanabilirliği noktasında sıkıntı oluşur ve sonucun tahmin edilenden daha yüksek olması gibi istenilmeyen durumlar ortaya çıkabilir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein ve lipid fraksiyonlarındaki MDA seviyesinin belirlenmesinde TBA ile türevlendirme esasına dayanan Mihara ve Uchiyama'nın doku MDA seviyesinin belirlenmesi için geliştirdiği yöntem kullanıldı (95). Ayrıca MDA-TBA kompleksinin oluşması için gerçekleştirilen 100 °C'deki inkübasyonun süresi 45 dk'dan fazla tutulmadı ve ileri oksidasyon ürünlerinin aşırı miktarda oluşumunun önüne geçildi. Yağ dokularından elde edilen protein fraksiyonların n=5 tekrarlı çalışılması sonucunda % CV 7.32 bulundu. Epididimal ve subkutan yağ dokularında elde edilen protein fraksiyonlarda MDA ölçümü, homojenizasyondaki zorluklar da göz önüne alınarak farklı günlerde gerçekleştirildi. Protein fraksiyonlarda numunelerdeki MDA seviyesi “nmol MDA/mg numune protein miktarı” cinsinden hesaplandı ve elde edilen sonuçlarda istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

BHF'lerin herhangi bir dokusunda MDA seviyelerinin ölçüldüğü çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. BHF'lerin beyaz yağ dokularında MDA seviyelerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışma mevcut değildir. BHF'lerin sadece beyin dokularında MDA seviyelerinin belirlendiği bir adet çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, BHF'lerin beyin doku MDA seviyelerinin wild tip farelere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (146). BDNF'nin reseptörü olan TrkB'nin aktivasyonunun, nöronlarda enerji dönüşümünü destekleyerek nöronları eş zamanlı olarak oksidatif strese karşı koruduğu belirlenmiştir (11).

Literatürde yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen kemirgenlerin beyaz yağ dokularında MDA'nın ölçüldüğü herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ancak çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan sukroz içerikli solüsyonlarla beslenen kemirgenlerin karaciğer, beyin, böbrek gibi organlarından elde edilen homojenatlarda ve kan plazmalarında MDA seviyeleri ölçülmüştür. Folmer ve arkadaşları sukroz içerikli solüsyon (200 g/L) ile dört hafta boyunca besledikleri 8 haftalık erkek farelerin beyin, karaciğer, böbrek dokularının MDA seviyelerinde, kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlı fark bulamamışlardır (147). Ruiz-Ramirez ve arkadaşları % 30'luk sukroz içerikli solüsyon ile 20 hafta besledikleri 28 günlük erkek Wistar sıçanların karaciğer ve plazma MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu

belirlemişlerdir (68). Brito ve arkadaşları sukroz içerikli solüsyon (100 g/L) ile 30 hafta boyunca besledikleri sekiz haftalık erkek farelerin beyin ve böbrek MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir (67). Çalışmamızda standart diyetle beslenen BHF'lerin ve yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip farelerin epididimal yağ dokusundaki MDA seviyesinin wild tip kontrollerine göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Şekil 34, Tablo 21; $p<0.05$). Yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen BHF'lerin subkutan yağ dokusundaki MDA seviyesi, standart diyetle beslenen BHF'lerinkine göre anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 34, Tablo 22; $p<0.05$). Tüm gruplar göz önüne alındığında, subkutan yağ dokudaki MDA seviyesinin, epididimal yağ dokudakine göre daha düşük olduğu görüldü (Şekil 34). Çalışmamızda elde edilen OS'nin bir göstergesi olan MDA seviyelerine göre, epididimal yağ dokuda BDNF eksikliğinin ve yüksek sukroz içerikli diyetin OS'yi arttırabileceği gösterilmiştir. Ancak subkutan yağ dokudaki MDA seviyeleri, BDNF eksikliğinin OS üzerine etkisinin olamayabileceğini göstermektedir. İnflamatuar özellikte olan M1 türü makrofajların subkutan yağ dokuya epididimal yağ dokuya nazaran daha az infiltre olabileceği iddia edilmektedir. Bu inflamatuvar makrofajların seçici olarak peroksiredoksin 3, glutatyon peroksidaz 4 gibi antioksidan genlerin ekspresyonunu azaltarak ve lipid peroksidasyon ürünlerini arttırarak protein karbonilasyonunu da arttırabileceği iddia edilmektedir (148). Epididimal ve subkutan yağ dokulardaki inflamatuvar, anjiyogenik, hipoksik ve lipolitik özelliklerin yanı sıra stromal vasküler fraksiyondaki hücre dağılımı ve bu hücrelerin proteomlarının farklı olmasından dolayı özellikle subkutan yağ dokudaki BDNF ile ilişkili olabilecek mekanizmaların OS'ye karşı direnç sağladığını ön görmekteyiz.

Çalışmamızdaki SOD aktivitesi ölçümünde, bölümümüzde de sıkça kullanılan Sun ve Oberley'in geliştirdiği yöntem tercih edildi (92). Bu yöntem üzerine yapılan denemelerde, SOD aktivitesinin laboratuvar sıcaklığına karşı hassas olduğu ve özellikle 22 ile 25 °C arasındaki sıcaklıklarda bu ölçümün en iyi verimle gerçekleştirildiği gözlemlendi. Ayrıca reaksiyon ortamına ksantin oksidaz enziminin ilave edilmesinden sonra en ideal mavi renkli formazan boyasına dönüşümün 20. dk'da gerçekleştiği belirlendi. Yağ dokularından elde edilen protein fraksiyonlarda $n=5$ tekrarlı SOD aktivitesinin çalışılması sonucunda % CV 5.63 bulundu. Bu gözlemlerden ve

laboratuvarın şartlarından yola çıkarak epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fraksiyonlarda SOD aktivite tayini gerçekleştirildi.

CAT aktivitesi ölçümünde öncelikle Aebi'nin geliştirdiği yöntem üzerinde denemeler yapıldı. Bu yöntemin temeli substrat çözeltisinde bulunan H_2O_2 'nin CAT enzimi ile ayrışması ile meydana gelen absorbans azalışının 240 nm'de 30 s boyunca takip edilmesine dayanır. Bu yöntemle yapılan analizde, 30 s'lik reaksiyon süresinin her 10 s'sindeki absorbans azalışının ise 0.015-0.100 arasında olması gerekir (149). Aebi yönteminin temelini teşkil eden bu detayları test etmek için öncelikle sığır karaciğerinden elde edilmiş olan CAT standardında denemeler yapıldı. CAT standardı üzerinde yapılan denemeler sonucunda 10 s'lik absorbans azalışlarının 0.015-0.100 arasında olduğu görüldü. CAT standardı üzerindeki testlerin olumlu olmasından dolayı protein fraksiyonlarda Aebi yöntemiyle CAT aktivitesi çalışması gerçekleştirilmesine karar verildi. Epididimal ve subkutan yağ dokularından elde edilen protein fazın miktarı sınırlı olduğu ve CAT aktivite tayini dışında da ölçümler yapıldığı için Aebi yönteminde öncelikle fazla miktarda numune harcanmamasına dikkat edildi. Ancak Aebi yöntemiyle gerçekleştirilen denemeler sonucunda sınırlı miktardaki protein fazlar ve kullanılan kuartz küvetlerin hacimleri de göz önüne alındığında, numunelerin aşırı seyreltilmesi sonucu CAT aktivitesinin belirlenemediği görüldü. Sonuçta elde edilen protein fazlardaki CAT miktarının, Aebi yönteminin hassasiyeti dışında olabileceği düşünüldü. Bu nedenle CAT aktivite tayini için kuartz küvet kullanmayı gerektirmeyen ve reaksiyon süresinin kısalığı ve mikroplyte uygulanabilmesi yönünden kullanışlı olan Goth'un geliştirdiği yöntemin kullanılması uygun görüldü (94). Ayrıca serum numunelerine özgü geliştirilen bu metodun formülasyonunda, bilirubinden kaynaklanan interferansı ortadan kaldırmak amacıyla ekstradan reaktif körleri kullanılmaktadır. Bu metotta uygulanan formülasyon yerine çalışmamızda CAT aktivite tayini için, sığır karaciğerinden elde edilen CAT standardı kullanılarak standart grafiği elde edildi (Şekil 18, 19). Yağ dokularından elde edilen protein fraksiyonlarda n=5 tekrarlı CAT aktivitesinin Goth yöntemiyle çalışılması sonucunda % CV 3.46 bulundu.

BHF'lerin epididimal ve subkutan yağ dokularında SOD, CAT ve GPx aktivitelerinden yalnız birinin veya hepsinin ölçüldüğü herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir. Sadece Hacıoğlu ve arkadaşları beş-altı haftalık erkek BHF'lerin beyin dokularındaki SOD ve CAT aktivitelerinin, wild tip farelerinkine göre istatistiksel

olarak anlamlılık arz etmeyecek düzeyde yüksek olduğunu belirlemişlerdir (146). Literatürde yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen kemirgenlerin farklı bölgelerdeki yağ dokularında SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin ölçüldüğü çalışmalar sınırlıdır. Illesca ve arkadaşları yüksek sukroz içerikli diyet ile dört ay boyunca beslenen erkek Wistar sıçanların epididimal yağ dokularında SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu belirlemişlerdir (150). D'Alessandro ve arkadaşları % 62.5 oranında sukroz içeren diyet ile 3, 15 ve 30 hafta boyunca beslenen erkek Wistar sıçanların epididimal yağ dokularında SOD, CAT ve GPx aktivitelerini, standart diyet ile beslenenlerinkine göre düşük bulmuşlardır (151).

Yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen kemirgenlerin subkutan yağ dokularında SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılamadı. Çalışmamızda hem yüksek sukroz içerikli diyetin hem de BDNF eksikliğinin epididimal SOD aktivitelerinde azalmaya yol açtığı ancak bu azalmaların istatistiksel anlamlılık arz etmediği belirlendi (Şekil 35, Tablo 23). Epididimal yağ dokuda artan oksidatif stresin ROS seviyesini yükselttiği ve dolayısıyla artan H₂O₂ SOD enzimini inhibe edebileceğinden dolayı (152), epididimal yağ dokuda kontrol grubunun (standart WT) SOD aktivitesinin diğer gruplara göre düşüklüğünün, bu inhibisyon kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Epididimal yağ dokunun aksine subkutan yağ dokuda hem yüksek sukroz içerikli diyetin hem de BDNF eksikliğinin SOD aktivitelerinde anlamlı derecede artışa yol açtığı belirlendi (Şekil 35, Tablo 24; p<0.05). Subkutan yağ dokuda MDA seviyesinin de epididimal yağ dokuya göre düşük olduğu göz önünde bulundurulsa, elde edilen veriler subkutan yağ dokuda OS'nin baskılandığını düşündürmektedir (Şekil 34). Farklı bölgelerdeki yağ dokularında yapılan çalışmada sonuç olarak, subkutan yağ dokuya inflamatuvar makrofajların epididimal yağ dokuya kıyasla daha az infiltre olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, epididimal yağ dokuda inflamatuvar sitokinlerin seçici olarak antioksidan genlerin ekspresyonunu azaltabileceği ve bu durumun lipid aldehit türlerini arttırarak protein karbonilasyonunu da arttırabileceği ifade edilmiştir (148).

Çalışmamızda sadece yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerin epididimal yağ dokudaki CAT aktivitesinin, aynı diyet ile beslenen wild tip farelere göre anlamlı derecede artış gösterdiği belirlendi (Şekil 36, Tablo 25; p<0.05). Ancak çalışmamızda elde edilen verilerden yola çıkarak epididimal yağ dokuda hem yüksek

sukroz içerikli diyetin hem de BDNF eksikliğinin CAT aktivitesini arttırdığı veya azalttığına yönelik net bir kanıya varmak mümkün değildir (Şekil 36, Tablo 25). Ancak subkutan yağ dokuda hem yüksek sukroz içerikli diyetin hem de BDNF eksikliğinin CAT aktivitesinde anlamlı derecede artışa yol açtığı belirlendi (Şekil 36, Tablo 26; $p<0.05$).

Çalışmamızda yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerin epididimal yağ dokudaki GPx aktivitesinin hem bu diyet ile beslenen wild tip hem de standart diyet ile beslenen BHF'lere göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Şekil 38, Tablo 29; $p<0.05$). Ancak çalışmamızda elde edilen verilerden yola çıkarak, epididimal yağ dokuda hem yüksek sukroz içerikli diyetin hem de BDNF eksikliğinin GPx aktivitesinde artış veya azalışa neden olabileceğine dair net bir yorum yapabilmek güçtür (Şekil 37, Tablo 27). Ayrıca çalışmamızda hem standart hem de yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen BHF'lerin subkutan yağ dokudaki GPx aktivitesinin, bu diyetlerle beslenen wild tip farelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Şekil 37, Tablo 28; $p<0.05$). Dolayısıyla subkutan yağ dokuda hem yüksek sukroz içerikli diyetin hem de BDNF eksikliğinin GPx aktivitesini yükselttiğini net şekilde söylemek mümkündür.

Çalışmamızda SOD2, GPx3 ve CAT enzimlerinin gen ekspresyonları epididimal ve subkutan yağ dokulardan elde edilen cDNA'larda ölçüldü. GPx3 izoenziminin ekspresyonunun obez farelerin adipoz dokularında seçici olarak azaldığı gösterilmiştir (12, 13). SOD izoenzimleri arasında mitokondride bulunan SOD2'nin, ROS seviyesinin düzenlenmesinde ve adipoz dokuda önemli rol üstlendiği bilinmektedir (13). Ancak CAT izoenzimlerinin yağ dokusundaki dağılımı ve bu dokudaki rolü hakkında literatürde bilgi bulunmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda, epididimal ve subkutan yağ dokularında SOD2, GPx3 ve CAT izoenzimlerinin gen ekspresyonları belirlendi.

BHF'lerin epididimal ve subkutan yağ dokularında SOD, CAT ve GPx gen ekspresyonlarının yalnız birinin veya hepsinin ölçüldüğü herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir. Literatürde yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen kemirgenlerin farklı bölgelerdeki yağ dokularında SOD, CAT ve GPx ekspresyonlarının ölçüldüğü çalışmalar sınırlıdır ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar farklılık

göstermektedir. BDNF'nin nöronlarda sirtuin-1 ve FOXO3a transkripsiyon faktörleri üzerinden SOD2 ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (11). Illesca ve arkadaşları yüksek sukroz içerikli diyet ile dört ay boyunca beslenen erkek Wistar sıçanların epididimal yağ dokularındaki SOD ekspresyonunun kontrol grubuna göre yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ancak aynı çalışmada yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen grubun GPx ekspresyonu, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur (150). Ferreira ve arkadaşları altı ay boyunca yüksek sukrozlu diyet ile beslenen erkek Wistar sıçanların epididimal yağ dokularındaki SOD ekspresyonunun kontrol grubuna göre yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ancak aynı çalışmada yüksek sukroz içerikli diyet ile beslenen grubun GPx ekspresyonunun kontrol grubuna göre düşük olduğunu belirlemişlerdir (153). Buserolles ve arkadaşları iki hafta boyunca yüksek sukrozlu diyet ile beslenen üç haftalık erkek Wistar sıçanların kalp dokusundaki SOD2 ve CAT ekspresyonlarının, standart diyet ile beslenen gruba göre yüksek bulmuşlardır. Ancak aynı çalışmada yüksek sukrozlu diyet ile beslenen grubun GPx ekspresyonunun, kontrol grubuna göre düşük olduğunu göstermişlerdir (154). Bu çalışmaların sonucunda SOD2 ekspresyonunu NF-kB, GPx ekspresyonunu ise nükleer faktör eritroit-2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) transkripsiyon faktörlerinin modüle edebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda, epididimal yağ dokuda her iki tür diyet ile beslenen transgenik farelerin bulunduğu gruplarda SOD2 ekspresyonları, belirlenen kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu ve dolayısıyla bu gruplarda BDNF eksikliğinin etkisinin olduğu görüldü (Şekil 38 ve 40; Tablo 29 ve 33; $p<0.05$). Yüksek sukroz içerikli diyetin wild tip farelerin epididimal yağ dokusundaki SOD2 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu görülürken, transgenik farelerde bu etki görülemedi (Şekil 38 ve 39; Tablo 29 ve 31; $p<0.05$). BDNF eksikliğinin, standart diyet ile beslenen transgenik farelerin subkutan yağ dokusundaki SOD2 ekspresyonunda artışa neden olduğu görülürken, yüksek sukroz içerikli diyetin bu bakımdan herhangi bir etkisi görülmedi (Şekil 38-40; Tablo 30, 32 ve 34; $p<0.05$). Yüksek sukrozlu diyetin wild tip farelerin epididimal yağ dokusundaki GPx3 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu belirlendi. Standart diyet ile beslenen farelerin epididimal yağ dokusunda GPx3 ekspresyonunun, BDNF eksikliği ile azaldığı görüldü (Şekil 41; Tablo 29; $p<0.05$). Her iki tür diyet ile beslenen heterozigot farelerin subkutan yağ dokusundaki GPx3 ekspresyonunun, BDNF eksikliği ile azaldığı belirlendi (Şekil 41 ve 42; Tablo 30 ve 32;

$p<0.05$). Yüksek sukrozlu diyetin, BHF'lerin subkutan yağ dokusundaki GPx3 ekspresyonunda azalmaya yol açtığı görüldü (Şekil 42; Tablo 32; $p<0.05$). Yüksek sukroz içerikli diyetle beslenmiş BHF'lerin epididimal ve subkutan yağ dokusundaki GPx3 ekspresyonunun azaldığı belirlendi (Şekil 43). Yüksek sukrozlu diyetin hem wild tip hem de transgenik farelerin epididimal yağ dokularındaki CAT ekspresyonunda azalmaya yol açtığı belirlendi (Şekil 44 ve 45; Tablo 29 ve 31; $p<0.05$). Ancak aynı dokudaki CAT ekspresyonu üzerine BDNF eksikliğinin herhangi bir etkisi görülmedi (Şekil 44 ve 46; Tablo 29 ve 33; $p<0.05$). Diyetten bağımsız olarak BDNF eksikliğinin, subkutan yağ dokularındaki CAT ekspresyonunda azalmaya yol açtığı görüldü (Şekil 44 ve 46; Tablo 30 ve 34; $p<0.05$). Yüksek sukrozlu diyetin, BHF'lerin subkutan yağ dokusundaki CAT ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu görüldü (Şekil 45, Tablo 32; $p<0.05$). Epididimal ve subkutan yağ dokuların inflamatuvar, preadiposit karakteristiği, lipolitik özellikleri, sentezleyip salgıladıkları proteinlerin profilleri gibi metabolik özellikleri farklılık göstermektedir (41). Farklı bölgelerde bulunan bu yağ dokularının metabolik farklılık göstermesine bağlı olarak, yüksek sukroz tüketiminin oksidatif stres ile ilişkili transkripsiyon faktörleri olduğu bilinen NF-kB, Nrf2 gibi faktörleri düzenleyebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca BDNF eksikliğinin PPAR- γ ve PGC-1 α gibi oksidatif stres ve enerji metabolizması ile ilişkili olduğu bilinen transkripsiyon faktörlerini etkileyerek ölçtüğümüz antioksidan enzim genleri düzenleyebileceğini öngörmekteyiz (13).

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen veriler bir bütün olarak göz önüne alındığında, yüksek sukroz içerikli diyetle ilgili olarak artan sistemik oksidatif stres BDNF eksikliğinin arttırabileceği belirlendi. BHF'lerin serum insülin, glukoz, leptin ve adiponektin seviyeleri, BDNF eksikliğinin kullanılan diyetten bağımsız olarak diyabete yol açabileceğini göstermiştir. Epididimal yağ dokuda artan OS'ye karşı bu dokuda BDNF'nin koruyucu etkisinin olabileceği görüldü. Subkutan yağ dokuda yüksek sukroz içerikli diyetle ve BDNF eksikliğine bağlı olarak OS artışı görülemediğinden bu dokuda, BDNF'nin OS üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığı net olarak ortaya konulamadı.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda;

1. BHF'lerin diyetten bağımsız olarak obez karakter gösterdiği ve BDNF eksikliğinin insülin direncine yol açabileceği belirlendi.

2. BDNF eksikliğinin, yüksek sukroz içerikli diyetin indüklediği sistemik OS'i arttırdığı gösterildi.

3. BDNF eksikliğinin, epididimal yağ dokuda OS'i indüklediği belirlendi.

4. Subkutan yağ dokuda BDNF eksikliğine bağlı OS artışı görülemedi ve BDNF eksikliğinin bu dokudaki etkisi net olarak belirlenemedi.

Standart WT (kontrol) grubuna göre diğer gruplardaki anlamlı değişimler Tablo 35'te özetlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçların doğrultusunda;

1. Adipositler ve stromal vasküler hücreler üzerinde yapılacak *in vitro* çalışmalar, epididimal ve subkutan yağ dokularda BDNF eksikliğinin muhtemel etkilerini daha iyi ortaya koyabilir. Yüksek sukroz içerikli diyetle beslenen wild tip ve BHF'lerin epididimal ve subkutan yağ dokularında histolojik analizler yapılarak karşılaştırmalar yapılabilir.

2. BHF'lerde yüksek sukroz içerikli pellet ve solüsyonların kullanımına bağlı olarak, BDNF eksikliğinin farklı yağ dokuları üzerine muhtemel etkisi incelenebilir.

3. Epididimal ve subkutan yağ dokuda BDNF eksikliğine bağlı olarak gelişen inflamatuvar profil araştırılarak, elde edilen OS değerleri ile karşılaştırılabilir.

4. BDNF ve insülin sinyal yollarının ortak kısımları araştırılarak, BDNF'nin insülin direnci ve diyabet gelişimindeki rolü belirlenebilir. Böylece obezite ve tip 2 diyabet gibi yaygın görülen metabolik hastalıkların temelinde yer alan insülin direncinin erken tanısında, BDNF bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğine dair bilgi edinilebilir.

5. Yağ dokudan protein ekstraksiyonu ve bu protein ekstraktlarında antioksidan aktivite tayinleri için yeni veya modifiye edilmiş yöntemler geliştirilebilir.

6. Wild tip ve BHF'lere TrkB agonistleri ve dışarıdan BDNF uygulaması yapılarak, OS ile ilişkili değişkenler incelenebilir.

Tablo 35. Standart WT (kontrol) grubuna göre diğer gruplardaki anlamlı değişimler

	Standart (+/-)	Sukroz WT	Sukroz (+/-)
Epididimal MDA Seviyesi	↑	↑	↑
Epididimal SOD Aktivitesi	—	—	—
Epididimal CAT Aktivitesi	—	—	↑
Epididimal GPx Aktivitesi	—	—	↑
Epididimal SOD2 Ekspresyonu	↓	↓	—
Epididimal GPx3 Ekspresyonu	↓	↓	↓
Epididimal CAT Ekspresyonu	—	↓	—
Subkutan MDA Seviyesi	—	—	↓
Subkutan SOD Aktivitesi	↑	↑	↑
Subkutan CAT Aktivitesi	↑	↑	↑
Subkutan GPx Aktivitesi	↑	—	↑
Subkutan SOD2 Ekspresyonu	↑	—	—
Subkutan GPx3 Ekspresyonu	↓	—	—
Subkutan CAT Ekspresyonu	—	—	—
Serum Glukoz Seviyesi	↑	↑	↑
Serum İnsülin Seviyesi	↑	↑	↑
Serum TAG Seviyesi	—	—	—
Serum HOMA-IR Skoru	↑	—	↑
Serum BDNF Seviyesi	↓	—	↓
Serum Leptin Seviyesi	↑	↑	↑
Serum Adiponektin Seviyesi	↓	—	↓
Serum Rezistin Seviyesi	—	—	—
Serum 3-NT Seviyesi	—	↑	↑
Serum 4-HNE Seviyesi	↑	↑	↑

↑ : Arttı, ↓ : Azaldı, — : Değişmedi.

9. KAYNAKLAR

1. Samuel VT (2011). Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 22: 60-65.
2. Campos VC, Tappy L (2016). Physiological handling of dietary fructose-containing sugars: implications for health. *Int J Obes (Lond)* 40: S6-11.
3. Kolderup A, Svihus B (2015). Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, and Obesity. *J Nutr Metab* 2015: 823081.
4. Khan TA, Sievenpiper JL (2016). Controversies about sugars: results from systematic reviews and meta-analyses on obesity, cardiometabolic disease and diabetes. *Eur J Nutr* 55: 25-43.
5. Tappy L, Le KA (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90: 23-46.
6. Sakurai T, Ogasawara J, Shirato K, Izawa T, Oh-Ishi S, Ishibashi Y, Radak Z, Ohno H, Kizaki T (2017). Exercise Training Attenuates the Dysregulated Expression of Adipokines and Oxidative Stress in White Adipose Tissue. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 9410954.
7. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sanchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-Gonzalez JA (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12: 3117-3132.
8. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
9. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC (2008). Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14: 741-751.

10. Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R (2014). Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 908539.
11. Marosi K, Mattson MP (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab* 25: 89-98.
12. Lee YS, Kim AY, Choi JW, Kim M, Yasue S, Son HJ, Masuzaki H, Park KS, Kim JB (2008). Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol* 22: 2176-2189.
13. Ruperez AI, Gil A, Aguilera CM (2014). Genetics of oxidative stress in obesity. *Int J Mol Sci* 15: 3118-3144.
14. Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116: 321-361.
15. Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1: 549-553.
16. Raefsky SM, Mattson MP (2017). Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. *Free Radic Biol Med* 102: 203-216.
17. Rios M (2013). BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci* 36: 83-90.
18. Reichardt LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545-1564.
19. Shu YH, Lu XM, Wei JX, Xiao L, Wang YT (2015). Update on the role of p75NTR in neurological disorders: A novel therapeutic target. *Biomed Pharmacother* 76: 17-23.
20. Smith PA (2014). BDNF: no gain without pain? *Neuroscience* 283: 107-123.

21. Rosas-Vargas H, Martinez-Ezquerro JD, Bienvenu T (2011). Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation and obesity. *Arch Med Res* 42: 482-494.
22. Chourbaji S, Hellweg R, Brandis D, Zorner B, Zacher C, Lang UE, Henn FA, Hortnagl H, Gass P (2004). Mice with reduced brain-derived neurotrophic factor expression show decreased choline acetyltransferase activity, but regular brain monoamine levels and unaltered emotional behavior. *Brain Res Mol Brain Res* 121: 28-36.
23. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8856-8860.
24. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Fujiwara K, Shimasaki T, Mitsutomi K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H (2013). Hypothalamic brain-derived neurotrophic factor regulates glucagon secretion mediated by pancreatic efferent nerves. *J Neuroendocrinol* 25: 302-311.
25. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 19: 1290-1300.
26. Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerstrom T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52: 1409-1418.
27. Tsuchida A, Nonomura T, Ono-Kishino M, Nakagawa T, Taiji M, Noguchi H (2001). Acute effects of brain-derived neurotrophic factor on energy expenditure in obese diabetic mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1286-1293.
28. Ozek C, Zimmer DJ, De Jonghe BC, Kalb RG, Bence KK (2015). Ablation of intact hypothalamic and/or hindbrain TrkB signaling leads to perturbations in energy balance. *Mol Metab* 4: 867-880.

29. Skledar M, Nikolac M, Dodig-Curkovic K, Curkovic M, Borovecki F, Pivac N (2012). Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met and obesity in children and adolescents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 36: 136-140.
30. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Thorlacius S, Jonsdottir I, Jonsdottir T, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, Jonsson T, Jonsson F, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Lauritzen T, Aben KK, Verbeek AL, Roeleveld N, Kampman E, Yanek LR, Becker LC, Tryggvadottir L, Rafnar T, Becker DM, Gulcher J, Kiemeny LA, Pedersen O, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41: 18-24.
31. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6: 736-742.
32. Komori T, Morikawa Y, Nanjo K, Senba E (2006). Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience* 139: 1107-1115.
33. Wang C, Bomberg E, Billington C, Levine A, Kotz CM (2007). Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R992-1002.
34. Rendeiro C, Vauzour D, Kean RJ, Butler LT, Rattray M, Spencer JP, Williams CM (2012). Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology (Berl)* 223: 319-330.
35. Rendeiro C, Vauzour D, Rattray M, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Butler LT, Williams CM, Spencer JP (2013). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PLoS One* 8: e63535.

36. Gil A, Olza J, Gil-Campos M, Gomez-Llorente C, Aguilera CM (2011). Is adipose tissue metabolically different at different sites? *Int J Pediatr Obes* 6 Suppl 1: 13-20.
37. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39: 715-728.
38. Kershaw EE, Flier JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556.
39. Votruba SB, Jensen MD (2007). Regional fat deposition as a factor in FFA metabolism. *Annu Rev Nutr* 27: 149-163.
40. Booth A, Magnuson A, Foster M (2014). Detrimental and protective fat: body fat distribution and its relation to metabolic disease. *Horm Mol Biol Clin Investig* 17: 13-27.
41. Dolinkova M, Dostalova I, Lacinova Z, Michalsky D, Haluzikova D, Mraz M, Kasalicky M, Haluzik M (2008). The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol Cell Endocrinol* 291: 63-70.
42. Bjorndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes* 2011: 490650.
43. De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Keijer J, Arnould T (2009). Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol* 175: 927-939.
44. Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, Lopez-Miranda J, Vazquez-Martinez R, Malagon MM (2010). The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics* 10: 3356-3366.
45. Wajchenberg BL (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21: 697-738.
46. Sackmann-Sala L, Berryman DE, Munn RD, Lubbers ER, Kopchick JJ (2012). Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice. *Obesity (Silver Spring)* 20: 101-111.

47. Kwok KH, Lam KS, Xu A (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* 48: e215.
48. Fasshauer M, Bluher M (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 36: 461-470.
49. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316: 129-139.
50. Balland E, Cowley MA (2015). New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front Neuroendocrinol* 39: 59-65.
51. Beltowski J (2012). Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39: 168 - 178.
52. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 13: 1231-1238.
53. Li L, Mamputu JC, Wiernsperger N, Renier G (2005). Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin. *Diabetes* 54: 2227 - 2234.
54. Lazar MA (2007). Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res* 39: 710-716.
55. Schwartz DR, Lazar MA (2011). Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab* 22: 259-265.
56. Chen C, Jiang J, Lu JM, Chai H, Wang X, Lin PH, Yao Q (2010). Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H193-201.
57. Codoner-Franch P, Alonso-Iglesias E (2015). Resistin: insulin resistance to malignancy. *Clin Chim Acta* 438: 46-54.

58. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M, Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating G (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377: 557-567.
59. Maury E, Brichard SM (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314: 1-16.
60. Vincent HK, Taylor AG (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 30: 400-418.
61. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA (2012). Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 68: 701-711.
62. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23: 599-622.
63. Kusminski CM, Scherer PE (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 23: 435-443.
64. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 360438.
65. Onyango AN, Baba N (2010). New hypotheses on the pathways of formation of malondialdehyde and isofurans. *Free Radic Biol Med* 49: 1594-1600.
66. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR (2007). Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab* 9: 813-839.
67. Brito VB, Folmer V, Soares JC, Silveira ID, Rocha JB (2007). Long-term sucrose and glucose consumption decreases the delta-aminolevulinate dehydratase activity in mice. *Nutrition* 23: 818-826.

68. Ruiz-Ramirez A, Chavez-Salgado M, Peneda-Flores JA, Zapata E, Masso F, El-Hafidi M (2011). High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E1198-1207.
69. Zhong H, Yin H (2015). Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biol* 4: 193-199.
70. Schaur RJ (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 24: 149-159.
71. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizak B, Mandl J, Margittai E, Puskas F, Szaraz P, Szelenyi P, Banhegyi G (2015). On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1852: 826-838.
72. Schaur RJ, Siems W, Bresgen N, Eckl PM (2015). 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules* 5: 2247-2337.
73. Teixeira D, Fernandes R, Prudencio C, Vieira M (2016). 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. *Biochimie* 125: 1-11.
74. Ahsan H (2013). 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol* 74: 1392-1399.
75. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, Ghezzi P (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 23: 1144-1170.
76. Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
77. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med* 87: 84-97.

- 78.** Brigelius-Flohe R, Maiorino M (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3289-3303.
- 79.** Aitken RJ, Roman SD (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 1: 15-24.
- 80.** Beevers CA, McDonald TRR, Robertson JH, Stern F (1952). The crystal structure of sucrose. *Acta Crystallographica* 5: 689-690.
- 81.** Meyer H, Vitavska O, Wieczorek H (2011). Identification of an animal sucrose transporter. *J Cell Sci* 124: 1984-1991.
- 82.** Jegatheesan P, De Bandt JP (2017). Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients* 9: 230.
- 83.** Ottum MS, Mistry AM (2015). Advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance. *J Clin Biochem Nutr* 57: 1-12.
- 84.** Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 251-264.
- 85.** Dornas WC, de Lima WG, Pedrosa ML, Silva ME (2015). Health Implications of High-Fructose Intake and Current Research. *Advances in Nutrition* 6: 729-737.
- 86.** DiMeglio DP, Mattes RD (2000). Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 794-800.
- 87.** Soto M, Chaumontet C, Mauduit CD, Fromentin G, Palme R, Tome D, Even P (2016). Intermittent access to a sucrose solution impairs metabolism in obesity-prone but not obesity-resistant mice. *Physiol Behav* 154: 175-183.
- 88.** Spangler R, Wittkowski KM, Goddard NL, Avena NM, Hoebel BG, Leibowitz SF (2004). Opiate-like effects of sugar on gene expression in reward areas of the rat brain. *Molecular Brain Research* 124: 134-142.
- 89.** Stanhope KL (2016). Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 53: 52-67.

90. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.
91. Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
92. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497-500.
93. Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
94. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 196: 143-151.
95. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271-278.
96. Guan H, Yang K (2008). RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR. *Methods Mol Biol* 456: 259-270.
97. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11: 1026-1030.
98. Bustin SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39.
99. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25: 402-408.
100. Huang EJ, Reichardt LF (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
101. Xu B, Xie X (2016). Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neurosci* 17: 282-292.

- 102.** Soto M, Chaumontet C, Even PC, Azzout-Marniche D, Tome D, Fromentin G (2017). Metabolic effects of intermittent access to caloric or non-caloric sweetened solutions in mice fed a high-caloric diet. *Physiol Behav* 175: 47-55.
- 103.** Havel PJ (2005). Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 63: 133-157.
- 104.** Roncal-Jimenez CA, Lanaspa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Mc Fann K, Sautin YY, Johnson RJ (2011). Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism* 60: 1259-1270.
- 105.** Tillman EJ, Morgan DA, Rahmouni K, Swoap SJ (2014). Three Months of High-Fructose Feeding Fails to Induce Excessive Weight Gain or Leptin Resistance in Mice. *PLoS ONE* 9: e107206.
- 106.** Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y (2006). Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr* 136: 582-587.
- 107.** Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44: 645-651.
- 108.** Fox EA, Biddinger JE, Jones KR, McAdams J, Worman A (2013). Mechanism of hyperphagia contributing to obesity in brain-derived neurotrophic factor knockout mice. *Neuroscience* 229: 176-199.
- 109.** Coppola V, Tessarollo L (2004). Control of hyperphagia prevents obesity in BDNF heterozygous mice. *Neuroreport* 15: 2665-2668.
- 110.** Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 15: 1748-1757.

111. Koizumi H, Hashimoto K, Iyo M (2006). Dietary restriction changes behaviours in brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice: role of serotonergic system. *Eur J Neurosci* 24: 2335-2344.
112. Nakagawa T, Ono-Kishino M, Sugaru E, Yamanaka M, Taiji M, Noguchi H (2002). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 185-191.
113. Fernandes-Lima F, Monte TL, Nascimento FA, Gregorio BM (2016). Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First 'Hit' of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs* 201: 464-472.
114. Beylot M, Pinteaur C, Peroni O (2006). Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats. *Metabolism* 55: 396-401.
115. Oliveira LS, Santos DA, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB (2014). The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. *J Nutr Biochem* 25: 193-200.
116. Sato Mito N, Suzui M, Yoshino H, Kaburagi T, Sato K (2009). Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. *J Nutr Health Aging* 13: 602-606.
117. Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Mattson MP (2003). Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* 144: 2446-2453.
118. Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ (2000). Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1334-1340.
119. Teillon S, Calderon GA, Rios M (2010). Diminished diet-induced hyperglycemia and dyslipidemia and enhanced expression of PPARalpha and FGF21 in mice with hepatic ablation of brain-derived neurotrophic factor. *J Endocrinol* 205: 37-47.

120. Tonra JR, Ono M, Liu X, Garcia K, Jackson C, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Wong V (1999). Brain-derived neurotrophic factor improves blood glucose control and alleviates fasting hyperglycemia in C57BLKS-Lepr(db)/lepr(db) mice. *Diabetes* 48: 588-594.
121. Paniagua JA (2016). Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes* 7: 483-514.
122. Balasubramanian P, Subramanian M, Nunez JL, Mohankumar SM, Mohankumar PS (2014). Chronic estradiol treatment decreases brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression and monoamine levels in the amygdala--implications for behavioral disorders. *Behav Brain Res* 261: 127-133.
123. Borba EM, Duarte JA, Bristot G, Scotton E, Camozzato AL, Chaves ML (2016). Brain-Derived Neurotrophic Factor Serum Levels and Hippocampal Volume in Mild Cognitive Impairment and Dementia due to Alzheimer Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 6: 559-567.
124. Inal-Emiroglu FN, Karabay N, Resmi H, Guleryuz H, Baykara B, Alsen S, Senturk-Pilan B, Akay A, Kose S (2015). Correlations between amygdala volumes and serum levels of BDNF and NGF as a neurobiological marker in adolescents with bipolar disorder. *J Affect Disord* 182: 50-56.
125. Endres T, Lessmann V (2012). Age-dependent deficits in fear learning in heterozygous BDNF knock-out mice. *Learn Mem* 19: 561-570.
126. Saylor AJ, Meredith GE, Vercillo MS, Zahm DS, McGinty JF (2006). BDNF heterozygous mice demonstrate age-related changes in striatal and nigral gene expression. *Exp Neurol* 199: 362-372.
127. Hill RA, van den Buuse M (2011). Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. *Brain Res* 1384: 51-60.
128. Pyndt Jorgensen B, Hansen JT, Krych L, Larsen C, Klein AB, Nielsen DS, Josefsen K, Hansen AK, Sorensen DB (2014). A possible link between food and mood: dietary impact on gut microbiota and behavior in BALB/c mice. *PLoS One* 9: e103398.

- 129.** Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C (2011). The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1053-1069.
- 130.** Tran LT, Yuen VG, McNeill JH (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 332: 145-159.
- 131.** Sumiyoshi M, Kimura Y (2016). Effects of a High-Fat or High-Sucrose Diet on Ultraviolet B Irradiation-Induced Carcinogenesis and Tumor Growth in Melanin-Possessing Hairless Mice. *Nutr Cancer* 68: 791-803.
- 132.** Kang JH, Yun SI, Park MH, Park JH, Jeong SY, Park HO (2013). Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS One* 8: e54617.
- 133.** Ryu MH, Sohn HS, Heo YR, Moustaid-Moussa N, Cha YS (2005). Differential regulation of hepatic gene expression by starvation versus refeeding following a high-sucrose or high-fat diet. *Nutrition* 21: 543-552.
- 134.** Choi CHJ, Cohen P (2017). Adipose crosstalk with other cell types in health and disease. *Exp Cell Res.* [Epub of ahead of print]
- 135.** Schultz A, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2015). Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose. *Food Funct* 6: 1684-1691.
- 136.** Parimisetty A, Dorsemans AC, Awada R, Ravanani P, Diotel N, Lefebvre d'Hellencourt C (2016). Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *J Neuroinflammation* 13: 67.
- 137.** Rubbo H, Radi R (2008). Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1318-1324.
- 138.** Blouet C, Mariotti F, Mathe V, Tome D, Huneau JF (2007). Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 1458-1464.

139. Castro JP, Jung T, Grune T, Siems W (2016). 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radic Biol Med* 111: 309-315.
140. Sajic T, Hopfgartner G, Szanto I, Varesio E (2011). Comparison of three detergent-free protein extraction protocols for white adipose tissue. *Anal Biochem* 415: 215-217.
141. Pizzimenti S, Ciamporcerio E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F, Barrera G (2013). Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol* 4: 242.
142. Domingues RM, Domingues P, Melo T, Perez-Sala D, Reis A, Spickett CM (2013). Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? *J Proteomics* 92: 110-131.
143. Gronwall C, Amara K, Hardt U, Krishnamurthy A, Steen J, Engstrom M, Sun M, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Scheel-Toellner D, Greenberg JD, Klareskog L, Catrina AI, Malmstrom V, Silverman GJ (2017). Autoreactivity to malondialdehyde-modifications in rheumatoid arthritis is linked to disease activity and synovial pathogenesis. *J Autoimmun.* [Epub of ahead of print]
144. Weisser J, Ctorteka C, Busch CJ, Austin SR, Nowikovskiy K, Uchida K, Binder CJ, Bennett KL (2017). A Comprehensive Analytical Strategy To Identify Malondialdehyde-Modified Proteins and Peptides. *Anal Chem* 89: 3847-3852.
145. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 316-328.
146. Hacıoglu G, Senturk A, Ince I, Alver A (2016). Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model. *Iran J Basic Med Sci* 19: 388-393.
147. Folmer V, Santos FW, Savegnago L, Brito VB, Nogueira CW, Rocha JB (2004). High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺ - ATPase but not on delta-aminolevulinate dehydratase in mice. *Toxicol Lett* 153: 333-341.

- 148.** Long EK, Olson DM, Bernlohr DA (2013). High-fat diet induces changes in adipose tissue trans-4-oxo-2-nonenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal levels in a depot-specific manner. *Free Radic Biol Med* 63: 390-398.
- 149.** Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
- 150.** Illesca PG, Alvarez SM, Selenscig DA, Ferreira MDR, Gimenez MS, Lombardo YB, D'Alessandro ME (2017). Dietary soy protein improves adipose tissue dysfunction by modulating parameters related with oxidative stress in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Biomed Pharmacother* 88: 1008-1015.
- 151.** D'Alessandro ME, Selenscig D, Illesca P, Chicco A, Lombardo YB (2015). Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats. *Food Funct* 6: 1299-1309.
- 152.** Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1804: 245-262.
- 153.** Ferreira MR, Alvarez SM, Illesca P, Gimenez MS, Lombardo YB (2016). Dietary Salba (*Salvia hispanica* L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Eur J Nutr.* [Epub of ahead of print]
- 154.** Busserolles J, Zimowska W, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A (2002). Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci* 71: 1303-1312.

10. EKLER

10.1. EK 1

Ek 1. Beslenme süresince kullanılan standart yemin (D12450J) içeriği

D12450J kodlu yem içeriği	% g	% kcal
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam kcal/g	3.85	100

Bileşenler	g	kcal
Kazein	200	800
L-Sistin	3	12
Mısır nişastası	506.2	2024.8
Maltodekstrin 10	125	500
Sukroz	68.8	275.2
Selüloz	50	0
Soya yağı	25	225
Domuz yağı	20	180
Mineral karışımı	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat.H ₂ O	16.5	0
Vitamin karışımı	10	40
Kolin bitartarat	2	0
Sarı gıda boyası	0.04	0
Mavi gıda boyası	0.01	0

10.2. EK 2

Ek 2. Beslenme süresince kullanılan yüksek sukrozlu yemin (D12450B) içeriği

D12450B kodlu yem içeriği	% g	% kcal
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam kcal/g	3.85	100

Bileşenler	g	kcal
Kazein	200	800
L-Sistin	3	12
Mısır nişastası	315	1260
Maltodekstrin 10	35	140
Sukroz	350	1400
Selüloz	50	0
Soya yağı	25	225
Domuz yağı	20	180
Mineral karışımı	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat.H ₂ O	16.5	0
Vitamin karışımı	10	40
Kolin bitartarat	2	0
Sarı gıda boyası	0.05	0
Mavi gıda boyası	0	0

11. ETİK KURUL ONAY BELGESİ

**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**

Çalışmasının Adı : “BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör)’nin, Yağ, Dokusunda Diyete Bağlı Adipokin Salgılanması ve Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi”

Çalışmacılar :Doç.Dr.Ahmet ALVER, Y.Doç.Dr.İsmail ABİDİN, Doç.Dr.Sinan CANPOLAT, Doç.Dr.Ersan KALAY, Arş.Gör.Cemil KAHRAMAN, Doktora Öğr.İmran İNCE, Doktora Öğr.Akın BODUR

Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya ABD.

Etik Kurul Dosya No 2013/ 6	Etik Kurul Toplantı Tarihi 12.02.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/03	Etik Kurul Karar No 5
--	--	---	--------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN’ın başkanlığında; “BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör)’nin, Yağ, Dokusunda Diyete Bağlı Adipokin Salgılanması ve Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi” başlığını taşıyan çalışmasının, 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. (12.02.2013)

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

12. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı Akın BODUR
E-posta akinbodur28@gmail.com
Adres KTÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AbD, TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Fakülte/Bölüm	Üniversite	Yıl
Doktora	SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	KTÜ	2017
Yüksek Lisans	SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	KTÜ	2012
Lisans	Fen Fak./Kimya	Atatürk	2009

YABANCI DİL

İngilizce, İyi, (YÖKDİL Sağlık Bilimleri, Mart 2017: 80.00)

YAYINLAR/BİLDİRİLER

Yüksek Lisans Tezi: Testis Torsiyonu ile Oluşturulan Doku Hasarına Karşı N-asetil sistein'in Uzun Dönemde Etkisinin İncelenmesi (Danışman: Doç. Dr. Ahmet ALVER) 2012.

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

1- Bodur A, Alver A, Kahraman C, Altay DU, İnce İ. Investigation of N-acetylcysteine on contralateral testis tissue injury by experimental testicular torsion: long-term effect. Am J Emerg Med. 2016 Jun; 34(6):1069-74. doi: 10.1016/j.ajem.2016.03.021.

2- Yildirmis S, Alver A, Yandi YE, Demir S, Senturk A, **Bodur A,** Mentese A. The effect of erythrocyte membranes from diabetic and hypercholesterolemic individuals on human carbonic anhydrase II activity. Arch Physiol Biochem. 2016;122(1):14-8. doi: 10.3109/13813455.2015.1111909.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1- Bodur A**, Alver A. Testis Torsiyonu ile Oluşturulan Doku Hasarına Karşı N-Asetil Sistein'in Uzun Dönemde Etkisinin İncelenmesi, XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 2012.
- 2. Kahraman C**, Saral S, İnce İ, **Bodur A**, Canpolat S, Alver A. Ratlarda Kronik Apelin Uygulamasının Serum Melatonin Seviyelerine Etkisi, XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 2012.
- 3. İnce İ**, **Bodur A**, Altay Us D, Alver A. Obez BDNF Heterozigot Farelerde Yağ Dokusu MDA Seviyeleri, XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 2015.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1. Kılıç M**, Bayrak G, Yenilmez E, **Bodur A**, Alver A, Demir E, Kerimoğlu G, Sökmen M. Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı *Camellia sinensis* Kateşinlerinin Antioksidan ve Antiapoptotik Etkileri, 22nd Electron Microscopy Congress, İstanbul, 2015.
- 2. Bodur A**, Ince I, Abidin I, Alver A. Investigation of some oxidative stress parameters in Bdnf heterozygous mice liver tissue. FEBS Journal, 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life, SEP 03-08 2016, Kusadasi, Turkey, FEBS, 1742-464X, 1742-4658.
- 3. Ince I**, **Bodur A**, Abidin I, Alver A. Effect of high fat diet on liver oxidative stress parameters in BDNF heterozygous mice. FEBS Journal, 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life, SEP 03-08 2016 Kusadasi, Turkey, FEBS, 1742-464X, 1742-4658.

PROJE/ BURSLAR

- 1. Deneysel Testis Torsiyon Modelinde Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkili Apoptoz Üzerine N-Asetil Sistein, Etil Pirüvat ve Berberine'nin Akut Dönemde Etkilerinin İncelenmesi**, BAP Diğer, TSB-2017-5676, Araştırmacı, Devam Ediyor.
- 2. Fındık Tüketiminin Erkek Sıçanların Üreme Sisteminde Doksorubisin ve Yaşlanmayla Uyarılan Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi**, BAP 01 (Temel Araştırma Projesi), TSA-2015-5262, Araştırmacı, Devam Ediyor.

3. BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör)'nin, yağ dokusunda diyetle ilgili adipokin salgılanması ve oksidatif strese etkisinin incelenmesi, TÜBİTAK Projesi, 114S553, Bursiyer, Devam Ediyor.

4. Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusundaki Oksidan-Antioksidan Dengenin Adipokin Salgılanması Üzerine Etkisi", TÜBİTAK Projesi, 111S252, Bursiyer, 2012.

SERTİFİKA, KURS ve EĞİTİMLER

1. Akademik Düzeyde Araştırma Projesi Hazırlama Eğitimi Sertifikası, KTÜ Proje Destek Birimi, 28-30 Eylül 2016.

2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 2015.

3. Editör ve Yazar 6. Eğitim Semineri Katılım Belgesi, TÜBİTAK ULAKBİM, 2015, Trabzon.

4. ABL 80 & ABL8XX Series Kan Gazı Analizörleri Servis ve Uygulama Eğitimi Katılım Sertifikası, Radiometer Tıbbi Malzemeler San. Ve Tic. Ltd. Şti., 2013.

5. AQT 90 Series Immunoassay Analizörleri Servis ve Uygulama Eğitimi Katılım Sertifikası, Radiometer Tıbbi Malzemeler San. Ve Tic. Ltd. Şti., 2013.

6. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi Katılım Belgesi, 25-28 Eylül 2012, Konya.

7. Uygulamalı Kromatografik Analiz Çalıştayı Katılım Belgesi, KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 29 Nisan-1 Mayıs 2011, Trabzon.