



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENERVASYONA BAĞLI
RETROPERİTONEAL YAĞ DOKUSUNDAKİ
TOTAL KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTE
DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YEŞİM SELVİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENERVASYONA BAĞLI
RETROPERİTONEAL YAĞ DOKUSUNDAKİ
TOTAL KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTE
DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YEŞİM SELVİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2018

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim DalıYüksek Lisans öğrencisi Yeşim SELVİ'nin hazırladığı '**Denervasyona Bağlı Retroperitoneal Yağ Dokusundaki Total Karbonik Anhidraz Aktivite Değişikliklerinin İncelenmesi**' başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ahmet ALVER

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Adnan YILMAZ

Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE

Tarih: ... /.../201..

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

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

Tarih: .../... /20....

Yeşim SELVİ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilimsel açıdan bana önemli katkı sağlayan, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösterici olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum, her aşamada göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e, teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmam süresince deneyimleriyle bana katkı sağlayan başta Sayın Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye, Yrd. Doç. Dr. Cemil KAHRAMAN'a

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Prof. Dr. Eşref Edip KEHA'ya, Prof. Dr. Orhan DEĞER'e, Prof. Dr. Asım ÖREM'e, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN'a, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na, Prof. Dr. Birgül KURAL'a ve Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a

Çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan, Dr. Akın BODUR'a, Dr. İmran İNCE AKÇA'ye, Arş. Gör. Neslihan SAĞLAM'a, Öğr. Gör. Nihal TÜRKMEN'e ve Taghi AHMEDİ RENDİ'ye,

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

Yüksek Lisans eğitimim süresince manevi olarak varlıklarını her daim hissettiren ablalarıma, kız kardeşime ve erkek kardeşime en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yeşim SELVİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1.Karbonik Anhidraz	4
4.1.1. Karbonik Anhidraz Fizyolojik Önemi	4
4.1.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	4
4.2. Yağ Dokusu	7
4.2.1. Beyaz Yağ Dokusu Fonksiyonları	8
4.2.2. Yağ Dokusu ve Sinir Sistemi	8
4.2.3.Yağ dokusu ve Karbonik Anhidraz	9
5. GEREÇ ve YÖNTEM	11
5.1. Gereç	11
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	11
5.1.2. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	11
5.1.3. Kullanılan Hayvanlar	12
5.2. Yöntem	13
5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	13
5.2.2. Beyaz Yağ Dokusunda Homojenizasyon Yöntemleri	13
5.2.2.1. Homojenizasyon Yöntemi 1	13
5.2.2.2. Homojenizasyon Yöntemi 2	14
5.2.2.3. Homojenizasyon Yöntemi 3	14
5.2.3. Hidrataz Aktivitesinin Ölçümü	14
5.2.4. Beyaz Yağ Dokusunda Protein Tayini	15

5.2.5. İstatistiksel Analiz	16
6. BULGULAR	17
6.1. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Norepinefrin Ölçümü Sonuçları	17
6.2. Retroperitoneal Yağ Dokusunun Ağırlık Ölçüm Sonuçları	17
6.3. Homojenizasyon Yönteminin Seçimi	17
6.4. CA aktivitesi ölçümü için uygun zaman aralığı belirlenmesi	18
6.5. Denervasyonun Retroperitoneal Yağ Dokusunda Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkileri	19
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	20
8. KAYNAKLAR	24
9. ETİK KURUL ONAYI	29
10.ÖZGEÇMİŞ	30

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. α -CA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi	6
Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	11
Tablo 3. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler	11
Tablo 4. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokusundaki norepinefrin sonuçları	17
Tablo 5. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokularının ağırlık sonuçları	17

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Karbonik Anhidrazın Dönüşümlü Reaksiyonu	4
Şekil 2. Protein Standart Grafiği	16
Şekil 3. Retroperitoneal yağ dokusunda CA aktivitesi ölçümünde zamana bağlı pH değişimi	18
Şekil 4. Deney gruplarındaki CA aktivite sonuçları	19



KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

ACC	Asetil-CoA Karboksilaz
BAT	Kahverengi Yağ Dokusu
CA	Karbonik Anhidraz
CARP	Karbonik Anhidraz İlişkili Proteinler
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
EU	Enzim Ünitesi
G3P	Gliserol-3-Fosfat
GyK	Gliserolkinaz
NE	Norepinefrin
PC	Pirüvat Karboksilaz
PEPCK	Fosfoenolpirüvat Karboksikinaz
SD-	Denervasyon Yapılmayan ve Standart Yem ile Beslenen Grup
SD+	Retroperitonel Yağ Dokusu İki Taraflı Denervasyon Yapılan ve Standart Yem ile Beslenen Grup
SNS	Sempatik Sinir Sistemi
TG	Trigliserit
WAT	Beyaz Yağ Dokusu

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ϵ	Epsilon
η	Eta

1.ÖZET

Denervasyona Bağlı Retroperitoneal Yağ Dokusundaki Total Karbonik Anhidraz Aktivite Değişikliklerinin İncelenmesi

Karbonik anhidraz (CA, E.C. 4.2.1.1) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde prostetik grup olarak Zn^{2+} ihtiva eden bir metaloproteindir. Canlılarda CO_2 'in hidrasyonu ve HCO_3^- 'in dehidrasyonunu katalizler. Tüm organizmalarda, solunum ve karbondioksit/bikarbonat taşınımı, fizyolojik pH homeostazı, lipogenez ve üre sentezi gibi birçok fizyolojik olayda önemli görevler üstlenmektedir. Denerve edilmiş yağ dokularında hem adiposit sayısının hem de büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir. Bu boyut artışı triaçilgliserol sentezinin artırılmasıyla mümkün olmaktadır. Çalışmamızda, sempatik sinir sisteminin yağ dokusunda triaçilgliserol sentezi için öncül bileşiği sentezleyen karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, her grupta 8 adet 100-150 g ağırlığında ve 3-5 haftalık Sprague Dawley ırkı sıçan bulunan 2 grup oluşturuldu. I. Grup: Batınları açıldı ve retroperitoneal yağ dokusuna denervasyon işlemi yapılmadı (SD-) (kontrol grubu). II. Grup: Retroperitoneal yağ dokusu iki taraflı denerve edildi (SD+). 10 haftalık diyet programı sonunda retroperitoneal yağ dokuları toplandı. Retroperitoneal yağ dokuları homojenize edildi ve doku CA hidrataz aktivitesi potansiyometrik yöntemle ölçüldü. Kontrol grubundaki ratlarda CA aktivitesi 1.1 (0.82-1.41) U/mg protein olarak ölçüldü. Denervasyon grubunda CA aktivitesi [1.75 (1.47-2.07) U/mg protein] kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p= 0.015$). Sonuç olarak, sempatik sinir sistemi denervasyonunun retroperitoneal yağ dokusunda yağ asitlerinin sentezinde görev alan karbonik anhidraz aktivitesini arttırarak dokuda TG birikimine katkı sağlayabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Denervasyon, Karbonik Anhidraz, Sempatik Sinir Sistemi,

Yağ Dokusu

2.SUMMARY

The Investigation of Total Carbonic Anhydrase Activity Changes in Retroperitoneal Adipose Tissue by Denervation

Carbonic anhydrase (CA, E. C 4.2.1.1) is a metalloprotein, commonly found in all organisms and contains Zn^{2+} as a prosthetic group in active site. It catalyses the CO_2 hydration and bicarbonate dehydration in organism. In all organisms, it plays important roles in many physiological processes such as respiration and carbon dioxide/bicarbonate transport, physiological pH homeostasis, lipogenesis and ureogenesis. It has been observed that both adipocyte number and size increase in the denervated adipose tissue. This size increase is possible by increasing the triacylglycerol synthesis. In the study, it was aimed to investigate the effects of the sympathetic nervous system on bicarbonate providing carbonic anhydrase activity that synthesis of malonyl-CoA the precursor compound for the synthesis of triacylglycerol in adipose tissue. In the study, two experimental groups containing 8 Sprague Dawley rats weighing 100-150 g and aging 3-5 weeks were formed: Group I: Their abdomens were opened and retroperitoneal adipose tissue denervation was not performed (SD-) (control group). Group II: Retroperitoneal adipose tissues were bilaterally denervated. At the end of the 10-week diet program retroperitoneal adipose tissues were collected from rats. They were homogenized and tissue carbonic anhydrase hydratase activity was measured by potentiometric measurement method. CA activity was found to be 1.1 (0.82-1.41) U/mg protein in the control group. In the denervation group, the CA activity [1.75 (1.47-2.07) U/mg protein] was found to be higher than control group ($p= 0.015$). As a result, it was concluded that sympathetic nervous system denervation may contribute to TG accumulation in the tissues by increasing carbonic anhydrase activity which have a role in the synthesis of fatty acids in retroperitoneal fat.

Keywords: Adipose Tissue, Carbonic Anhydrase, Denervation, Sympathetic Nervous System.

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan monomerik yapılu bir metaloenzimdir. Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu ihtiva eder. Karbondioksitin (CO_2) hidrasyonu, bikarbonatın da (HCO_3^-) dehidrasyon reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizler. Elektrolitlerin taşınması, fizyolojik pH homeostazı, biyosentez olayları ve kalsifikasyon gibi birçok fizyolojik olayda önemli rol almaktadır (1).

Yağ dokusu gevşek bir bağ dokusudur (2). Enerji homeostazisi kontrolünü sağlayan sinir kökenli faktörler yağ dokusunun metabolik ve salgı kapasitelerini düzenlerler. Özellikle otonom sinir sisteminin sempatik sinirleri bu kontrolde önemlidir (3, 4). Beyaz yağ dokusunun adrenerjik reseptörleri de lipolizi düzenlemede önemli rol oynamaktadır (5, 6).

Sitozolde ve mitokondride bulunan CA izoenzimlerinin yağ asidi sentezinde asetil-CoA'yı yağ asitlerinin yapı taşı olan malonil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli bikarbonat iyonu sağladığı ileri sürülmüştür (5, 6).

Yağ dokusu üzerine otonom sinir sisteminin etkilerini incelemek için sinir liflerinin denervasyonu kullanılmaktadır. Denerve edilmiş yağ dokularında hem adiposit sayısının hem de büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir. Bu boyut artışı triaçilgliserol sentezinin arttırılmasıyla mümkün olmaktadır (7-9).

Bu çalışmada sempatik sinir sisteminin yağ dokusunda triaçilgliserol sentezi için gerekli yağ asitlerinin öncül bileşiği olan malonil-CoA'nın sentezine bikarbonat sağlayan karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Karbonik Anhidraz

4.1.1. Karbonik Anhidraz ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (CA, E.C. 4.2.1.1) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde prostetik grup olarak Zn^{2+} ihtiva eden bir metaloproteindir. Zn^{2+} katyonu bir su ve üç histidin molekülüyle bağlanır (10). Yaklaşık 260 amino asitten oluşur ve 30 kDa ağırlığındadır. Canlılarda CO_2 'in hidrasyonu ve HCO_3^- 'in dehidrasyonunu katalizler (11, 12).



Şekil 1. Karbonik anhidrazın dönüştürücü reaksiyonu (11)

Bu reaksiyon, bir katalizör olmadan da (Şekil 1) meydana gelebilir, ancak fizyolojik pH değerlerinde, CA substratlarının/reaksiyon ürünlerinin yeryüzündeki organizmaların çoğunda yer aldığı metabolik ihtiyaçları karşılamak için çok yavaştır (13).

Enzim ailesi tüm organizmalarda, solunum ve karbondioksit/bikarbonat taşınımı, fizyolojik pH homeostazı, birçok doku ve organda elektrolit taşınımı, glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi gibi biyosentetik olaylarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar proliferasyonu ve farklılaşması, epileptogenez gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda önemli görevler üstlenmektedir (1, 10).

4.1.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Bikarbonat tampon özelliğinden sonra karbonik anhidraz tarafından katalizlenen reaksiyonlar birçok enzime (prüvat karboksilaz (PC), asetil-CoA Karboksilaz (ACC) ve karbamoil fosfat sentetaz I ve II) bikarbonat sağlar.

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin birkaçı metabolik olaylarda önemlidir. Bu izoenzimler: yağ asiti sentezinde malonil-CoA'yı oluşturmak üzere görev yapan asetil-CoA karboksilaz enzimi için gereken bikarbonatı sağlar. Glukoneogenez başlangıç basamağında kullanılan prüvat karboksilaz için gereken bikarbonatı sağlar

(14). Karbamoil fosfat sentetaz I üre sentezinde, karbamoil fosfat sentetaz II pirimidin biyosentezinde kullanılır ve bu enzimlerin ihtiyaç duyduğu bikarbonat CA tarafından sağlanır (14).

Canlılarda bilinen 6 farklı CA ailesi vardır. Bunlar: α , β , γ , δ , ϵ , η karbonik anhidrazlardır. α -CA (omurgalılar, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında), β -CA (çoğunlukla bakteriler, algler, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında), γ -CA (temel olarak archealarda ve bazı bakterilerde), δ ve ϵ -CA (bazı deniz diatomlarında) ve yakın zamanda bulunan ve η -CA türleri protozoada bulunur (15-17).

Alglerin, bitkilerin ve bazı bakterin CA'ları fotosentez ve biyosentetik reaksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Diatomlarda δ - ve ϵ -CA'lar karbondioksit fiksasyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Protozonlarda η -CA'ların rolü tam olarak anlaşılamamıştır ancak *de novo* pürin/pirimidin biyosentetik yollara dahil olabileceği düşünülmektedir (13, 18-23). Karbonik anhidrazın en fazla bilinen ailesi alfa ailesidir. Alfa ailesinin 16 izoenzimi vardır. Bunlar 13 aktif izoform (CA I-VA, VB, VI, VII, IX ve XII-XV) ve 3 inaktif izoformdan (VIII, X, XI) oluşur. CA I, II, III, VII ve XIII sitozolde, CA IV, IX, XII, XIV, XV hücre membranında, CA-VI salgısal, CA-VA ve VB mitokondride bulunur. CA XV'in katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. CA VIII, X, XI izoenzimlerinin de tümörojen olduğu belirlenmiştir. CA VA ve VB izoenzimleri hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda glukoneogenez ve lipogenez gibi süreçleri kapsar (11, 24). α - CA izoenzimleri Tablo 1'de verilmiştir.

CA'lar spesifik hücre tiplerinde bulunan farklı izoformlarla her yerde bulunur. Örneğin, CA I ve CA II izoenzimleri kanda bol miktarda bulunan proteinlerdir. CA II, IV, XII ve XIV izoenzimleri çözünür maddelerin taşınması ve asit-baz dengesini yüksek oranda düzenleyen böbrekte bulunur. CA III iskelet kasında ifade edilen baskın izoformdur (6).

Tablo 1. α -CA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi (Renner'dan 5)

Hücre içi Yerleşim	İzoenzim	Kcat (x 105) (s-1)	İşlevi	Bulunduğu Dokular
Sitozolik	I	2	• Solunum • Asit/baz homeostazı	Kolon, Göz, Ter Bezi, Yağ Dokusu, Kan Hücreleri
	II	14	• Solunum • Asit/baz homeostazı	Bütün Dokular
	III	0,1	• Metabolizma • Oksidatif hasar	Yağ Dokuları, İskelet Kası, Karaciğer
	VII	9,5	• Nöbetler • Oksidatif hasar • Kanser	Beyin, Kolon, Karaciğer ve İskelet Kası
	XIII	1,5	• Bilinmiyor	Akciğer, Böbrek, Kalp, Beyin, İskelet Kası, Üreme Organları, Bağırsaklar
Sitozolik (CARPS)	VII	---	• Motor fonksiyon • Kanser çoğalması	Beyin
	X	---	• CNS	Merkezi Sinir Sistemi
	XI	---	• CNS • Kanser çoğalması	Merkezi Sinir Sistemi
Membran bağımlı	IV	11	• Solunum • Sperm hareketliliği • CNS tamponlama	Akciğer, Böbrek
	IX	3,8	• Gastrik homeostaz • Kanser çoğalması • Hipoksi	Mide, Kolon, Pankreas
	XII	4,2	• Sıvı homeostazı • Kanser çoğalması • Hipoksi	Böbrek
	XIV	3,1	• Fotoreseptör • Sinyalizasyon • CNS tamponlama	Beyin ve Göz
	mXV	4,7	• Bilinmiyor	Böbrek
Mitokondriyal	VA	2,9	• Üre sentezi • Glukoneogenez • Lipogenez	Karaciğer, İskelet Kası, Böbrek
	VB	9,5	• Üre sentezi • Glukoneogenez • Lipogenez	Bütün Dokular
Salgısal	VI	3,4	• Tat algılaması • Diş boşlukları	Tükürük Bezleri

4.2. Yağ Dokusu

Yağ dokusu gevşek bağ dokusudur. Kollajen fiberleri gibi lif omurgasını içeren ince hücre katmanı tabakasıyla ayrılmış yağ hücrelerinden (adipositler) oluşur ve çok sayıda damar bulundurur (25). Hücre yapısı, yerleşimi, rengi, damarlanması ve fonksiyonlarına göre beyaz ve kahverengi yağ dokusu olmak üzere ikiye ayrılır. Beyaz yağ dokusu (WAT) erişkin kişilerde en fazla deri altında, böbrek çevresinde, ve visseral bölgede bulunur (2, 26). Kahverengi yağ dokusu (BAT) ise özellikle yeni doğanlarda bulunur. Mitokondri yönünden zengin bir dokudur ve zamanla mitokondri miktarı azalır (2, 27, 28).

Yağ dokusu olgun yağ hücrelerinin haricinde, makrofajlar, fibroblastlar, kan hücreleri, perisitler, preadipositler, az farklılaşmış mezenkimal hücreler (2) ve endotel hücrelerinden oluşur (3, 29). Yağ hücreleri çaplarını genişletme yeteneğine sahiptir. Ancak yağ hücrelerinin hacminin genişlemesi sınırsız değildir (30).

WAT deri altına yerleşen (subkutan) yağ doku, bağırsak ve böbreklerin çevresinde bulunan (visseral) yağ doku olarak iki temel depo bulunur (30). WAT üç fonksiyona sahiptir. Serbest yağ asitlerini trigliserit olarak depolar. Depolanmış trigliseritleri gliserol ve serbest yağ asitlerine dönüştürür. Özel biyolojik fonksiyonlara sahip olan protein, hormon ve sitokinleri salgılar (2, 3).

WAT lipid damlacığı tek ve büyük bir damla (uniloküler) şeklinde bulunur. BAT lipid damlacığı ise çok damlacıklı (multiloküler) tipte bulunur. WAT'ın damar yapılanması kahverengi yağ dokusundan farklı olarak daha az sayıdadır. Ancak her bir hücresi en azından bir kapillerle bağlantı kurmuş haldedir (2, 3, 31).

Eskiden enerji depolama için sadece pasif bir depo olarak görülen yağ dokusu, günümüzde genişleyen ve enerji açığında lipidleri salgılayarak tepki gösteren yüksek oranda aktif bir endokrin ve metabolik yapı olarak kabul edilmektedir. Lipitleri sistemik metabolik talep üzerine depolamak ve bırakmak için benzersiz olan bu kapasite, adipositler ve adipoz doku fizyolojisinin hücre biyolojisini tüm vücut metabolizmasına bağlar (30).

4.2.1. Beyaz Yağ Dokusu Fonksiyonları

Beyaz yağ dokusu temel olarak üç fonksiyona sahiptir. Serbest yağ asitlerini trigliserit (TG) olarak depolar. Depolanmış olduğu TG'leri gliserol ve serbest yağ asitlerine dönüştürür. Son olarak da, özel biyolojik fonksiyonları olan adipokin adı verilen proteinleri, hormonları ve sitokinleri salgılar (2, 32). WAT'taki trigliserit fazla enerjinin depolanmış halidir. WAT metabolizmayı etkileyen çok sayıda peptitleri (hormon, büyüme faktörleri ve sitokinler), proteinleri (enzimleri, ekstraselüler matriks bileşenleri), ve lipitleri (yağ asitleri ve türevler) ürettiği için endokrin organ olarak düşünülür (3, 33).

Genellikle WAT iki temel depoya ayrılır. Derinin altına yerleşen yağ doku ve bağırsakların, böbreklerin çevresinde ve sıçanlarda gonadların çevresinde bulunan yağ dokudur. Ayrıca kas içinde ve kas çevresinde az miktarda bulunan yağ dokusu da visseral yağ dokusuna örnektir (2).

Yağ dokuları normal ağırlıktaki erkeklerde vücut ağırlığının % 15-20'sini oluştururken, kadınlarda ise % 20-25'ini oluşturmaktadır. Yüzeysel ve subkutan yağ dokusu insan vücudundaki yağ dokusunun yaklaşık % 80'i oluştururken, visseral yağ doku ise kalan % 20'sini oluşturur (3, 31).

Obezite ile ilişkili hastalıkların (diyabet, kalp damar hastalıkları, insülin direnci gibi) gelişmesinde, obezitede fazla miktarda yağ birikiminin subkutan veya visseral dokularda olup olmadığı çok farklı etkilere sahiptir (2, 34).

4.2.2. Yağ Dokusu ve Sinir Sistemi

Memelilerde, WAT yağ pedleri denilen birden çok subkutan ve visseral yağ dokusuna dağıtılır. Sinir kökenli faktörler enerji homeostazisinin kontrolünü sağlar. Merkezi ve otonom sinir sistemleri tüm vücut için enerji alımı, tüketimi ve depolama gibi farklı bileşenleri ve bütün vücut enerjisini düzenlerler (3, 35). Otonom sinir sistemi tarafından yağ dokularının metabolik ve salgı kapasiteleri de kontrol edilmektedir. Sempatik sinir sisteminin (SNS) beyaz adipositlerin apoptozunda, çoğalma ve farklılaşmanın kontrolünde etkili olduğunu gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır (4).

Bazı gözlemler WAT'ın otonom sinir sisteminin sempatik uçlarındaki sinir lifleriyle donatıldığını göstermiştir. Bu katekolaminerjik liflerin başlangıçta kan damarlarıyla yakın

ilişkide olduğu bunun da WAT'taki kan akımına sempatik sinir sisteminin dahil olmasına neden olduğu bildirilmiştir. Daha sonraki araştırmalarda sempatik uçların birçok yerinden “en passant” tipte norepinefrin salgılanmasına izin verildiği görülmüştür (4).

SNS'nin temel ve klasik olarak araştırılan nörotransmitteri norepinefrin (NE) olup, bu sinirler arasında NE gibi diğer nörotransmitterleri de içerir ve salgılar; bu adipositler üzerinde bulunan farklı reseptör alt tiplerini aktive ederek lipoliz kontrol edilir (4).

WAT'da, sempatik innervasyonun varlığı kanıtlanmıştır. Ancak parasempatik innervasyonun olup olmadığı halen tartışılmaktadır (30).

Sempatik sinirler WAT'da lipolizi ya da BAT'da termojenezi tetikleyebilecek merkezi sinir sistemi (CNS) regülasyonu tüm vücut enerji dengesini düzenler (36).

SNS sinir uçları tarafından salınan norepinefrin gibi katekolamin nörotransmitterleri, lipolizin pozitif düzenleyicisidir. Duyusal nöronlar çevresel bilgiyi, SNS vasıtasıyla çevresel dokulara bilgi aktararak enerji dengesini düzenlemek üzere buna yanıt veren CNS'ye iletirler. Vagal sinir iletimi CNS'ye gıda alımını azaltmasını ve enerji verimini artırmak için farklı yollarla etkileşime girebilir. Enerji tüketimini uyarmaya yardımcı olabilecek nötrofik faktörlerin ekspresyonunu artırır (36).

WAT'ı inerve eden sempatik sinir tellerinin cerrahi olarak kesilmesi (denervasyon), glukoz alım hızını artırır. Gliserolkinaz (GyK) aktivitesini ve gliseroneogenez yolunu azaltır. Bunuda fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPCK) aktivitesi ve piruvatın gliserol-TAG'a bağlayarak yaptığı tahmin edilmektedir. Bu veriler, WAT'ta gliserol-3-fosfat (G3P) yollarının oluşumunda bazal adrenerjik uyarının rolünün plazma insülin seviyeleri düşük olduğunda daha belirgin hale geldiğini düşündürmektedir (37).

4.2.3. Yağ Dokusu ve Karbonik Anhidraz

Çeşitli araştırmalar, CA III'ün en bol bulunduğu dokunun, sitozolik proteinin % 24 konsantrasyonuna sahip olan sıçanın beyaz yağ dokusu olduğunu göstermiştir (6). BAT, iskelet kası ve karaciğerde de oldukça bol miktarda bulunur. CA III, sitozolde bulunan α -CA ailesindeki en yavaş aktiviteye sahip izoenzimdir. Yağ asidi sentezi için bikarbonat sağladığı düşünülmektedir. CA III katalitik aktivitesi olmayan karbonik anhidrazla bağlı proteinler (CA-RP) gibi davranabilir veya fonksiyon değiştirmek için

proteinleri bağlayabilir (5). Sıçan yağ dokusunda temel işlevi belli olmamasına rağmen, CA III'ün asetil-CoA'yı yağ asitlerinin yapı taşı olan malonil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli bikarbonat iyonu sağladığı varsayılmıştır. Sıçan yağ dokusundaki CA III miktarının ve etkinliğinin obezite ile azalma nedeni bilinmemekle birlikte, CA III ekspresyonunun, yağ dokusu metabolizmasını değiştiren obezitede gözlemlenen yüksek insülin seviyeleri tarafından doğrudan veya dolaylı olarak düzenlendiği öne sürülmüştür. Tokluk durumunda insülin seviyesinde artış meydana gelir ve sitoplazmada yeni yağ asitleri üretimi uyarılır. İnsülin ve CA III arasında korelasyon olduğundan dolayı CA III, *de novo* yağlı asit sentezi için gerekli bikarbonatı sağlayabilir. Bir araştırmada, obez farelerde leptin CA III'ün ekspresyonunu düşürdüğünü göstermiştir (6). Ancak bu görüş obez hayvanlarda CA III seviyesinin azalması ile ters düşmektedir. Çünkü bu hayvanlarda *de novo* yağ asidi sentezi artmaktadır (38).

CA I ve CA II yağ dokusunda bulunan diğer izoenzimlerdir ve CA II en fazla katalitik aktiviteye sahip izoenzim olduğu için, yağ asitlerinin yapı taşı olan malonil-CoA oluşumunda bikarbonat sağlayıcısı olarak en büyük katkıyı sağlar (39).

Son zamanlarda, obezite en sık karşılaşılan metabolik hastalık haline gelmiştir. CA'lar yağ asidi öncül bileşiğini sentezlemede kullanıldıkları için CA inhibitörlerinin antiobeziteye katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Yukarıda özetlenen mekanizma, yeni anti-obezite ilaçlarının geliştirilmesinde CA izoenzimlerini potansiyel hedef yapmaktadır. Gerçekten de, yeni nesil antiobezite ilaçlarından olan Qsymia'nın etken maddelerinden biri CA inhibitörü olan topiramattır. Ayrıca CA inhibitörü sülfonamidlerin yağ hücresi kültürlerinde lipogenezi azalttığını gösteren çalışmalar vardır (40).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma
Metanol	Sigma
Tris	Ambresco
HEPES	Ambresco
Etanol	Sigma
EDTA	Merck
Hidroklorik asit	Sigma
Kloroform	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Tris-HCl	Sigma
HCl	Sigma
CO ₂ gazı	Erkuloğlu

5.1.2. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 3’de listelenmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Vorteks	Nüve, NM 110
Santrifüj	Eppendorf
Magnetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet,10-100 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet,100-1000 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet,1-5 mL	Eppendorf Research

Tablo 3 (Devam). Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
pH metre	Hanna Instruments
El homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
Deney tüpleri	SH&GLASS
Mikropleyt okuyucu	VERSA max
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R Centrifuge
Çalkalayıcı	Nüve SL 35
Derin dondurucu	Thermo -86 °C

5.1.3. Kullanılan Hayvanlar

Çalışmamızda TÜBİTAK tarafından desteklenen 114S147 nolu projede kullanılan hayvanlardan alınan beyaz yağ dokusu örnekleri kullanılmıştır. Yine aynı projeden üretilen ve Taghi AHMADİ RENDİ'nin yüksek lisans tezinde bulunan ve bu tez çalışmasında da faydalanılacak veriler kaynak belirtilerek kullanılmıştır (41). Projede Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Sprague-Dawley ırkı 16 adet erkek 3-5 haftalık 100-150 g ağırlığında sıçanlar kullanıldı. Yapılan deneylerin tümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2013/29 protokol (Ek 1. Etik Kurul Onayı) numaralı etik kurulu onayı ile yapıldı.

5.2. Yöntem

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışma başlamadan önce, deney hayvanları aynı yerde deneyler için vücut ağırlıklarına göre dengeli bir şekilde ayarlanarak 2 farklı grup oluşturuldu ve 24 saatlik adaptasyon süresince standart yem ile beslendi. Çalışmada kullanılan yemler (D12450J) Research Diyet'ten satın alındı.

5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar standart sıçan yemi ile (D12450J) 24 saat süreyle beslendi. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Adaptasyon süresi bittikten sonra sıçanlar rastgele her grupta 8 adet sıçan olacak şekilde 2 gruba ayrıldı ve tartım işlemleri gerçekleştirildi.

I.Grup: Batınları açıldı. Retroperitoneal yağ dokusuna ulaşıldı. Ancak denervasyon işlemi yapılmadı (SD-) (kontrol grubu).

II.Grup: Retroperitoneal yağ dokusu iki taraflı denerve edildi (SD+).

Bütün hayvanlara batın kapatılmadan önce tek doz penisilin seyreltilerek batın içi uygulandı. Toplam 70 günlük beslenme periyodunun sonunda, sıçanların tartımı gerçekleştirildi ve 12 saatlik yemsiz bir periyod geçirdikten sonra sabah saatlerinde dekapitasyon sakrifiye edildi. Batından açılıp her iki tarafta olan retroperitoneal yağ dokusunun tümü çıkarılıp hemen steril ependorflara konularak ölçüm yapılana kadar -80°C’de saklandı.

5.2.2. Beyaz Yağ Dokusu Homojenizasyon Yöntemi Seçimi

Retroperitoneal yağ dokusu böbrek ile karın zarı arkasındaki bölgede bulunur. Denervasyonla ilgili çalışmalar daha çok retroperitoneal yağ dokusunda yapılmıştır (42,43). Bu sebeple bu çalışmadaki ölçümler içinde retroperitoneal yağ dokusu tercih edilmiştir.

Yağ dokusunda CA hidrataz aktivitesi ölçümü ile ilgili detaylı bilgiler bulunmamaktadır. CA’nın spesifik aktivitesinin en yüksek olduğu ekstraksiyon yöntemini belirlemek için, üç farklı lipit ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

5.2.2.1. Homojenizasyon Yöntemi 1

Yaklaşık 100 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 µL izolasyon tamponu (100 mL 150 mM NaCl, 100 mL 0,2 mM EDTA ve 50 mM Tris-HCl içeren pH= 7.4) ve 750 µL kloroform/metanol karışımı (2:1) ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar ependorflara aktararak 20 dk buzda bekletildikten sonra 250 µL kloroform ve 250 µL saf su eklendi ve ependorflar vortekslendi. +4°C 15000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant temiz ependorfa aktararak CA ölçümü için hazır hale getirildi (44)

İzolasyon Tamponu Hazırlanması (pH=7.4): 0.61 g Tris, 0.87 g NaCl ve 0.07 g EDTA tartılarak yaklaşık 50 mL saf suda magnetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandı. Ardından pH 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon jojeye aktarılarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

5.2.2.2. Homojenizasyon Yöntemi 2

Bir önceki homojenizasyon yöntemi modifiye edilerek işlem gerçekleştirildi. Yaklaşık 100 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 µL 25 mM HEPES tamponu (pH= 8.80) çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar ependorflara aktarıldı ve 200 µL kloroform ilave edilerek +4°C de 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj ardından iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant fazı temiz ependorfa aktarılarak CA ölçümü için hazır hale getirildi.

5.2.2.3. Homojenizasyon Yöntemi 3

Yaklaşık 150 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 2 mL 25 mM soğuk HEPES tampon çözeltisi (pH= 8.80) içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra tüpün üst kısmında toplanan yağ tabakası uzaklaştırıldı. Yağ tabakası altındaki süpernatandan 0.8 mL temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Tüp içerisine 400 µL etanol/kloroform karışımı (sırasıyla 3:2 oranında) ilave edildi. Elde edilen çözelti vortekslenerek +4°C 15000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpte oluşan 3 fazdan en üstteki süpernatant fazı temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Aktarılan bu çözelti vortekslenerek CA aktivite ölçümünde kullanıldı (2).

5.2.3. Hidrataz Aktivitesinin Ölçülmesi

Hidrataz aktivitesi Wilbur- Anderson metodu modifiye edilerek potansiyometrik olarak ölçüldü (45). Metodun prensibi ortamda substrat olarak bulunan karbondioksitin hidrasyonu sonucu ortaya çıkan H⁺'nin ortamın pH'sını 8.1'den 7.0'a düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır.

HEPES Tamponunun Hazırlanması (25 mM pH= 8.80): 1.63 g HEPES tartılarak yaklaşık 150 mL saf suda magnetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandı. Ardından pH= 8.80'e ayarlandı. Daha sonra balon jojeye aktarılarak hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

Doygun CO₂ Çözeltisi Hazırlanması: 250 mL saf sudan 45-60 dk boyunca CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

Reaksiyon için; numunelerden 100 µL cam tüpe alındı ve üzerine soğuk 2.4 mL HEPES tamponu (25 mM pH= 8.8) ilave edildi. Reaksiyonun soğuk ortamda gerçekleşmesi için reaksiyon tüpü buz banyosu içerisine daldırıldı. Reaksiyon doygun CO₂ çözeltisi ilavesiyle başlatıldı. pH metrenin elektrodunun çevresi parafinle gaz kaçağı olmayacak şekilde iyice sarılıp reaksiyon tüpünün içine yerleştirildi. pH'nın 8.1'den 7.0'a düşüşü kronometre ile takip edildi. Tüm ölçümler en az üç kez tekrarlandı ve geçen sürelerin ortalaması kullanıldı. CO₂ hidrataz aktivitesi enzim ünitesi olarak hesaplandı.

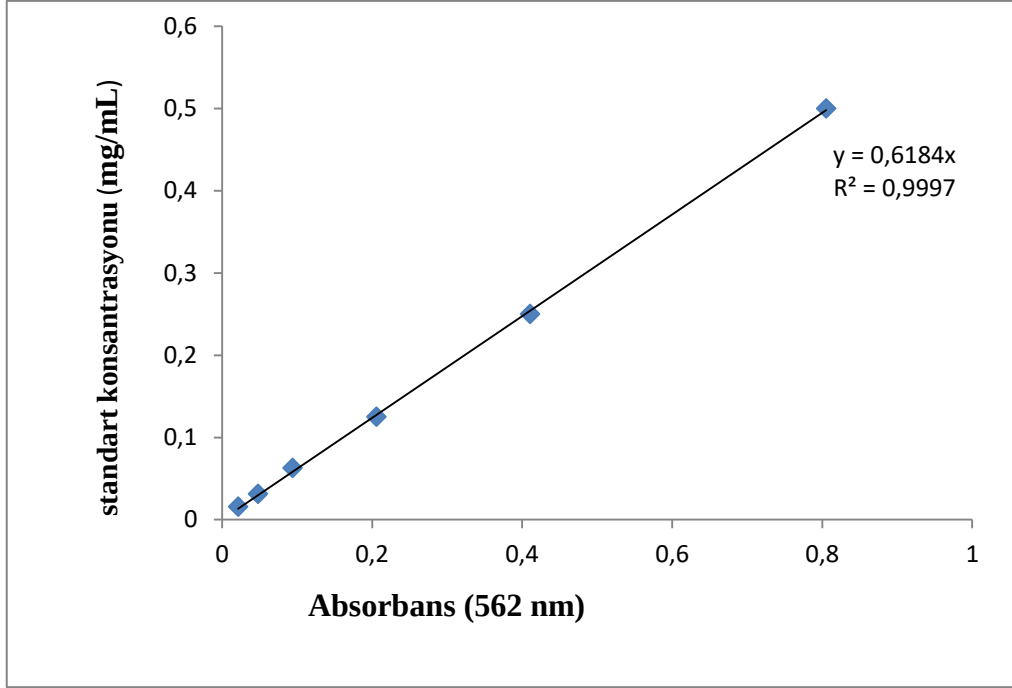
Kör deneme için: Süpernatant elde edilişi etanol içerisinde gerçekleştiği için 800 µL 25mM HEPES (pH= 8.80) ve 160 µL etanol çözeltisi karışımından 100 µL cam tüpe ilave edildi ve üzerine 2.4 mL HEPES ve 2.5 mL CO₂ ile doyurulmuş buzlu saf su ilave edilerek pH'nın 8.1'den 7.0'a düşüşü kronometre ile takip edildi. Ölçüm üç kez tekrarlandı ve geçen sürelerin ortalaması kullanıldı. Enzim ünitesi (EU), enzimatik olmayan reaksiyonlardaki pH değişim süresi (t₀) ve enzimatik reaksiyonların pH değişim süresi (t_c) olacak şekilde eşitlik 1'deki formül ile hesaplanır.

$$EU = \frac{t_0 - t_c}{t_c} \quad (1)$$

5.2.4 Beyaz Yağ Dokusunda Protein Tayini

Çalışmamızda doku protein tayini için BCA kiti kullanıldı. BCA kiti ile protein testi Biüret tepkimesine dayanır. Cu²⁺'nın bir alkali solüsyonunda protein tarafından Cu¹⁺'e indirgenir ve Bisinkoninik asit, indirgenmiş bakır ile kenetlenerek, mor bir reaksiyon kompleksi oluşturarak 562 nm'de absorpsiyon verir.

BCA kiti kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: Protein standart grafiği

5.2.5. İstatistiksel Analiz

CA aktivite sonuçlar, medyan ve interquartilite range olarak ifade edildi. Grupların karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kullanılan potansiyometrik yöntemin performansını değerlendirmek için % CV hesaplaması yapıldı ($\% CV = 100 \times SD / \text{Mean}$).

6. BULGULAR

6.1. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Norepinefrin Ölçümü Sonuçları

Denervasyon markörü olan NE'nin, denerve edilmiş gruplarda ciddi bir düşüşü gözlemlendi ve diğer gruplara göre anlamlı fark belirlendi ($p=0.037$). Sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokusundaki norepinefrin sonuçları (41)

Gruplar	NE (ng/mL) / Retroperitoneal doku (g)
SD-	188.9 ± 28.2
SD+	$125.5 \pm 37.3^*$

(Ahmadi Rendi'den, 41)

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

6.2. Retroperitoneal Yağ Dokusunun Ağırlık Ölçümü Sonuçları

Bütün gruplardaki hayvanlar sakrifiye edildikten sonra retroperitoneal yağ dokuları tartıldı ve gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.033$). Grupların retroperitoneal yağ dokuları ağırlık ortalamaları Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Deney gruplarının retroperitoneal yağ dokularının ağırlık sonuçları (41)

Gruplar	Sağ Retroperitoneal doku ort. (g)	Sol Retroperitoneal doku ort. (g)
SD-	3.09 ± 0.96	3.05 ± 0.97
SD+	$4.84 \pm 1.51^*$	$4.59 \pm 1.51^*$

(Ahmadi Rendi'den, 41)

Sağ retroperitoneal yağ dokusunda istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

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

6.3. Homojenizasyon Yönteminin Seçimi

Çalışmamızda Wilbur-Anderson tarafından geliştirilen potansiyometrik ölçüm kriterlerine en uygun homojenizasyon yöntemini belirlemek için 3 farklı yöntem denenmiştir.

1. Protein izolasyonu Bligh ve Dyer'in geliştirdiği yöntemin (44) tampon karışımı ile yağ dokusu 15 sn boyunca Omni homojenizatörü ile homojenizasyon yapıldı. Potansiyometrik karbonik anhidraz ölçümünde kör değeri ortalama 90 sn bulundu.

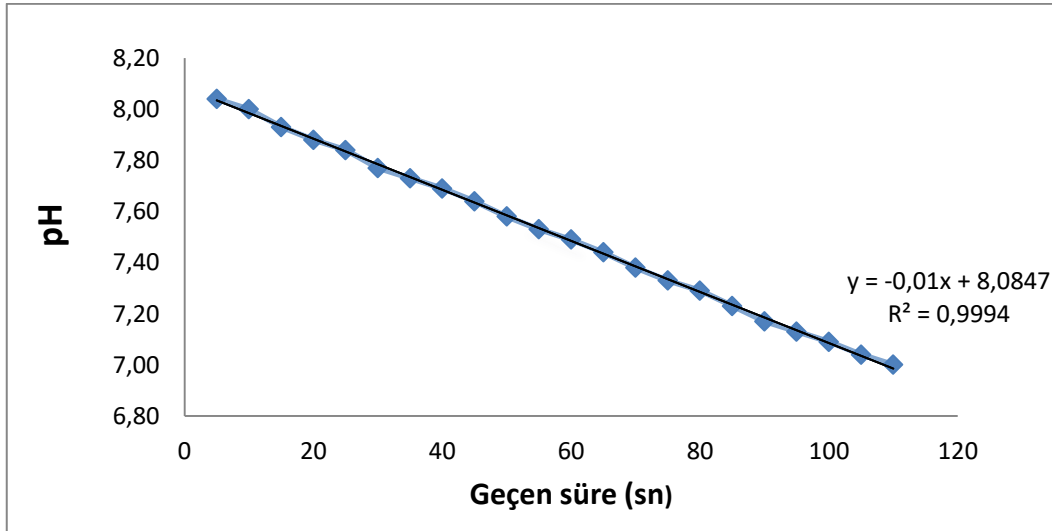
Numunelerdeki ölçümlerde ise bu değer ortalama 88 sn bulundu. Bu değerler birbirine çok yakın olduğu için CA aktivitesi ölçümünde kullanılmadı.

2. Protein izolasyonu için HEPES tamponu ile yağ dokusu 15 sn boyunca Omni homojenizatörü ile homojenizasyon yapıldı. Potansiyometrik CA ölçümünde kör değeri ortalama 112 sn bulundu. Numunelerdeki ölçümlerde ise bu değer ortalama 109 sn bulundu. Bu değerler birbirine çok yakın olduğu için CA aktivitesi ölçümünde kullanılmadı.

3. Protein izolasyonu için HEPES tamponu ile yağ dokusu 10 sn boyunca Omni homojenizatörü ile homojenizasyon yapıldıktan sonra kloroform etanol karışımı (3:2) ile ekstrakte edildi. Potansiyometrik CA ölçümünde kör değeri ortalama 130 sn bulundu. Numunelerdeki ölçümlerde ise bu değer ortalama 109 sn bulundu. Kör ile numune arasındaki fark potansiyometrik CA aktivite ölçümü için yeterli olarak değerlendirildi. Bu homojenizasyon yöntemi tez çalışmamızda kullanıldı (2).

6.4. CA Aktivitesi Ölçümü İçin Uygun Zaman Aralığı Belirlenmesi

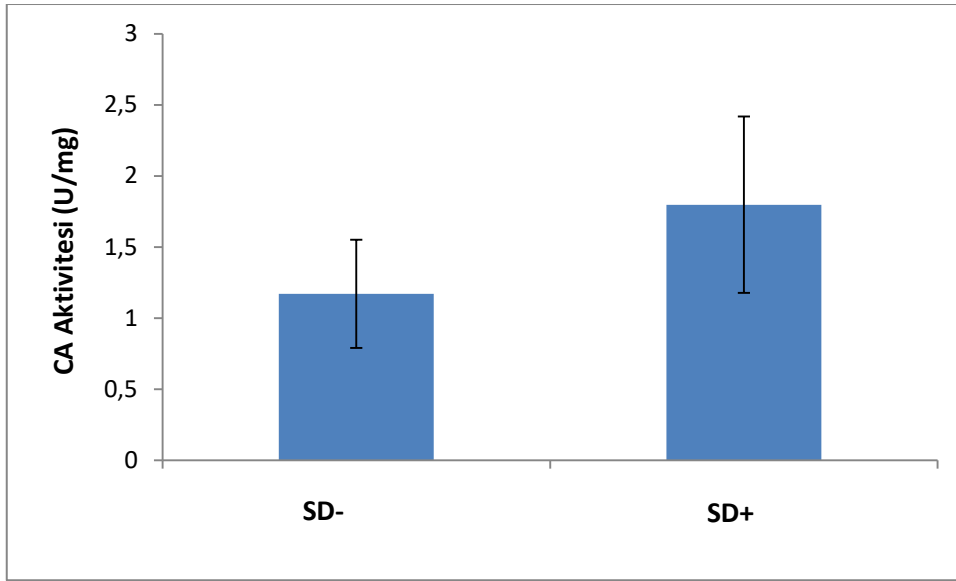
Karbonik anhidraz aktivitesi ölçümü için kullandığımız HEPES Tamponunun pH 8.8'den 6.8'e kadar olan düşüşleri incelenmiş ve ölçüm için en uygun aralığın pH= 8-7 olduğu görülmüştür. Örnek bir numunenin pH 8-7 arasındaki zamana bağlı azalış grafiği Şekil 3'te verilmiştir. Ölçüm yönteminin % CV değeri % 5.7dir.



Şekil 3. Retroperitoneal yağ dokusunda CA aktivitesi ölçümünde zamana bağlı pH Değişimi

6.5. Denervasyonun Retroperitoneal Yağ Dokusunda Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Retroperitoneal yağ dokusunda yapılan CA aktivite ölçümlerinde kontrol grubundaki ratlarda CA aktivitesi 1.1 (0.82-1.41) U/mg protein olarak ölçülmüştür. Denervasyon grubundaki ratlarda ise aktivite 1.75 (1.47-2.07) U/mg protein olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p= 0.015$). Elde edilen sonuçlar Şekil 4 'te verilmiştir.



Şekil 4. Deney gruplarındaki CA aktivite sonuçları

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yağ dokusu gevşek bağ dokusu olarak sınıflandırılır ve kollajen fiberleri gibi lif omurgasını içeren ince hücre katmanı tabakasıyla ayrılmış yağ hücreleri oluşur ve çok sayıda damar bulundurur (23). Beyaz yağ dokusu üç fonksiyona sahiptir. Serbest yağ asitlerini trigliserit olarak depolama, depolanmış trigliseritleri gliserol ve serbest yağ asitlerine katalizleme ve özel biyolojik fonksiyonları olan protein, hormon ve sitokinleri salgılamaktır (24, 28).

Karbonik anhidraz canlılarda CO_2 'in hidrasyonu ve HCO_3^- 'in dehidrasyonunu katalizler (11). Elektrolitlerin taşınması, fizyolojik pH homeostazı, biyosentez olayları ve kalsifikasyon gibi birçok fizyolojik olayda önemli rol almaktadır (1). CA izoenzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar birçok enzime (prüvat karboksilaz, asetil-CoA karboksilaz ve karbamoil fosfat senteta I ve II) bikarbonat sağlar (14). CA izoenzimlerinin asetil-CoA'yı yağ asitlerinin yapı taşı olan malonil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli bikarbonat iyonu sağladığı varsayılmıştır (6).

Yağ dokularının metabolik ve salgı kapasiteleri de otonomik sinir sistemi tarafından kontrol edilmektedir (36). Yağ dokusunda sinir kökenli faktörler enerji homeostazi kontrolünü sağlar. Merkezi ve otonom sinir sistemleri tüm vücut için enerji alımı, tüketimi ve depolama gibi farklı bileşenleri ve bütün vücut enerjisini düzenlerler (3, 35). Yağ dokusu üzerine otonom sinir sisteminin etkilerini incelemek için sinir liflerinin devre dışı bırakıldığı denervasyon yöntemi kullanılmaktadır. Denerve edilmiş yağ dokularında obeziteye benzer şekilde hem adiposit sayısının hem de büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir. Bu boyut artışı triaçilgliserol sentezinin artırılmasıyla mümkün olmaktadır (7-9). WAT'ı innerve eden sempatik sinir tellerinin cerrahi olarak kesilmesinin, glukoz alım hızını arttırdığını, ancak gliseroneogenez yolunu azalttığını göstermektedir (37).

Sempatik sinir sisteminde denervasyonun başarısını göstermek için, doku norepinefrin miktarı ölçülmektedir. Sempatik uyarının azalmasına bağlı olarak yağ dokusundaki norepinefrin miktarı azalmaktadır (46). Retroperitoneal yağ dokusunda yaptığımız norepinefrin ölçümlerinde gruplarda denervasyonun net bir şekilde norepinefrin miktarını azalttığı görülmüştür ($p=0.005$, Bkz. Tablo 4). Ayrıca norepinefrin miktarının baskılanması SNS liflerinin kesilmesine bağlı olarak

denervasyonun yapıldığı retroperitoneal yağ dokusunda denervasyonun yapılmadığı gruba göre anlamlı ağırlık artışları tespit edildi ($p= 0.038$, Bkz. Tablo 5).

Literatürde CA aktivitesinin yağ dokusunda potansiyometrik olarak ölçüldüğü bir çalışmaya rastlanmadı. Alver ve arkadaşları yağ dokusu eksplantlarında Tris tamponu ($pH= 7.2$) kullanarak yaptıkları homojenizasyondan sonra Maren yöntemi ile hidrataz aktivitesi ölçmüşlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar lipitleri uzaklaştırmak için herhangi bir ekstraksiyon yöntemi kullanmamıştır (47). Ancak yağ dokusunda yapılan protein ve enzim ölçümlerinde çoğunlukla lipit interferansını engellemek için apolar çözücülerle lipit ekstraksiyonu yapılmaktadır. Çalışmamızda CA aktivitesinin ölçmek için yağ dokusu homojenizasyonunda farklı yöntemler kullanılmıştır. Yağ dokusu içerdiği yüksek lipit bileşeni sebebiyle protein ve aktivite ölçümlerinde interferanslara sebep olmaktadır. Lipitlerin doku homojenatlarından uzaklaştırılması için genellikle kloroform kullanılarak lipit ekstraksiyonunun yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır (47).

Bu çalışmada lipit ekstraksiyonu için üç yöntem kullanılmıştır. Homojenizasyon yöntemi 1’de lipitler izolasyon tamponu (150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM Tris $pH= 7.4$) ile homojenize edilerek kloroform/metanol karışımı ile ekstraksiyon yapıldı. Santrifüjün ardından süpernatant kısmı CA ölçümü için ayrıldı.

Homojenizasyon yöntemi 2’de lipitler $pH=8.80$ olan HEPES tamponu ile homojenize edilerek kloroform ile ekstraksiyon yapıldı. Santrifüjün ardından süpernatant kısmı CA ölçümü için ayrıldı.

Homojenizasyon yöntemi 3’de lipitler $pH=8.80$ olan HEPES tamponu ile homojenize edilerek kloroform/etanol karışımı ile ekstraksiyon yapıldı. Santrifüj ardından süpernatant kısmı CA ölçümü için ayrıldı.

Kör ile numune aktivitesi arasındaki fark bu çalışmada enzimin ekstraksiyonunun başarısının bir ölçüsü olarak kullanıldı. Bu üç yöntemden CA aktivitesi ölçümünde kullanılan potansiyometrik ölçümde kör ölçümü ile numune aktivitesi ölçümü arasındaki en büyük farkın olduğu 3. yöntem tercih edildi.

CA aktivitesi, enzimin hidrataz aktivitesi ve esteraz aktivitesini esas alan yöntemlerle ölçülmektedir. Esteraz aktivitesi için herhangi bir fizyolojik fonksiyon tanımlanamamıştır. Spektrofotometrik çalışmalara uygunluğundan dolayı genellikle inhibisyon çalışmalarında enzimin p-nitrofenili hidrolizlediği esteraz aktivitesi

kullanılmaktadır. Hidrataz aktivitesi ölçümünde ise çoğunlukla karbonik anhidrazca oluşturulan H^+ 'nın ölçüm ortamındaki pH düşüşünün bir indikatör kullanılarak takip edilmesi esası kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörlerdeki farklılıklar, dönüm noktasının tespitindeki zorluklar ve inhibitörlerin düşük inhibisyon etkileri hidrataz aktivitesinin kullanımını sınırlamaktadır (48). Wilbur-Anderson tarafından geliştirilen elektrometrik ölçümde ise hidrataz aktivitesindeki pH düşüşü bir pH elektrotu ile takip edilmektedir. Yukarıda bahsedilen hidrataz aktivitesine ait sınırlamaların tamamı bu yöntemde ortadan kaldırılmıştır. Potansiyometrik ölçüm hem fizyolojik olması hemde bölümümüzde daha önceden yapılan çalışmalarda kullanılmış olması sebebiyle tercih edildi. Sonuçların hassasiyetini arttırmak için her bir ölçüm üç defa tekrar edildi (45).

Denerve edilen yağ dokularında yağ dokusu kütlesinin arttığı gözlenmiştir (8). Bu artışta SNS baskılanmasına bağlı olarak yağ dokusundaki hücre sayısı (adiposit sayısı) ve yağ hücrelerindeki TAG içeriği artmıştır. Yağ dokusunda özellikle diyetten sonra kanda miktarı artan şilomikronların taşıdığı ekzojen kaynaklı lipidlerin lipoprotein lipaz tarafından hidrolizi ile açığa çıkan yağ asitleri yağ hücresinde TAG sentezi için kullanılır. Bunun dışında daha az miktarda özellikle glukozun bol olduğu dönemlerde *de novo* sentezi ile asetil-CoA'dan sentezlenen yağ asitleri de TAG sentezinde kullanılır. *De novo* lipogeneze yeterli substratı sağlamak için asetil gruplarının mitokondriden sitozole taşınması gerekir. Fakat mitokondri membranının asetil-CoA'ya geçirgenliği yoktur. Bu taşınma asetil-CoA'nın okzaloasetatla birleşerek sitrat oluşturması ile gerçekleşir. Pirüvat, bikarbonat ile pirüvat karboksilaz enzimi sayesinde karboksillenerek okzalata dönüşür. Bu olay için gerekli olan bikarbonat karbonik anhidraz izoenzimi olan CA VA veya VB tarafından sağlanır. Okzalatin asetil-CoA ile reaksiyonu sonucunda oluşan sitrat, trikarboksilik asit taşıyıcıları ile sitozole taşınır. Burada sitrat ATP sitrat liyaz tarafından asetil-CoA'ya dönüştürülür (reaksiyon sonunda oluşan okzalat dekarboksilasyon sonucu pirüvata dönüşerek pirüvat taşıyıcıları ile mitokondriye taşınır). Asetil-CoA *de novo* lipogenez için sitozolde kullanılır. Asetil-CoA, asetil-CoA karboksilaz ve bikarbonat ile malonil-CoA'ya dönüşür. Bu olay için gereken bikarbonat CA II izoenzimi ile CO_2 'in bikarbonata dönüşümü ile sağlanır. Bu reaksiyonlarla yağ zinciri uzatılır. Sonuç olarak karbonik anhidraz izoenzimlerinin bir kaç yağ asitleri biyosentezinde rol alır. Bu izoenzimler: mitokondride CA VA ve VB

izoenzimleri (PC için yeterli substrat sağlar) ve sitozoldeki CA II izoenzimidir (ACC için gereken substratı sağlar).

Sonuç olarak, Retroperitoneal yağ dokusunda yaptığımız CA aktivitesi ölçümlerinde, denervasyona bağlı grupta karbonik anhidraz aktivitesi kontrol grubundaki aktivite değerlerine göre anlamlı derecede arttığı görüldü ($p= 0.015$). Bu artışın yağ dokusunda artan TAG sentezini desteklemek amaçlı olabileceği kanaatine varıldı.



8. KAYNAKLAR

1. Iqbal S, Saleem M, Azim MK, Taha M, Salar U, Khan KM, Perveen S, Choudhary MI (2017). Carbohydrazones as new class of carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, kinetics, and ligand docking studies. *Bioorg Chem* 72:89-101.
2. Kahraman C (2013). Diyetle indüklenmiş obezitede yağ dokusundaki oksidan antioksidan dengenin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
3. Pénicaud L, Lorsignol A (2013). Chatting between the brain and white adipose tissues. *Physiology and physiopathology of adipose tissue* (Ed: Bastard JP, Fève B). Paris, 171-181.
4. Sağlam N (2016). Retroperitoneal yağ dokusu denervasyonunu takiben diyetle obez yapılmış sıçanlarda adiponektin gen ekspresyonu ve serum seviyelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
5. Whitney Renner S (2017). Metabolic characterization of mice lacking carbonic anhydraseIII. Doctoral dissertation, University of North Carolina Genetics and Molecular Biology Curriculum, Chapel Hill.
6. Alver A, Uçar F, Keha EE, Kalay E, Ovalı E (2004). Effects of leptin and insulin on CA III expression in rat adipose tissue. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19 (3):279-81.
7. Cousin B, Casteilla L, Lafontan M et al. (1993). Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endoc* 133: 2255-2262.
8. Bowers RR, Festuccia WTL, Song CK et al. (2004). Sympathetic innervation of adipose tissue and its regulation of fat cell number". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: 1167-1175.
9. Foster MT, Bartness TJ (2006). Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: 1630-1637.
10. Liu X, Lu D, Bowser R, Liu J (2016). Expression of carbonic anhydrase in motor neurons and alterations in ALS. *Int J Mol Sci* 1;17(11)

11. Şentürk A (2015). Oksidatif olarak modifiye edilmiş karbonik anhidraza karşı otoantikör oluşumunun ve bu antikörlerin bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
12. Diler US (2009). Siprofibratın İnsan Karbonik Anhidraz II ve Glukoz 6-Fosfat Dehidragenaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İn Vitro İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
13. Supuran CT (2016). Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem J* 15;473(14):2023-32.
14. Supuran CT, Winum JY (2009). Drug design of zinc-enzyme inhibitors functional, structural, and disease applications. Drug design of antiobesity carbonic anhydrase inhibitors. (Ed. Giuseppina De Simone and Claudiu T Supuran). Canada. 241-245.
15. Hilvo M, Tolvanen M, Clark A, Shen B, Shah GN, Waheed A, Halmi P, Hänninen M, Hämäläinen JM, Vihinen M, Sly WS, Parkkila S (2005). Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem J* 392: 83-92.
16. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery* 7:1-12.
17. Yalduz F (2012). Hipotroidili ve hipertroidili hastalarda CAI ve CAII otoantikoları ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
18. Pocker Y and Ng SY (1973) Plant carbonic anhydrase. Properties and carbon dioxide hydration kinetics. *Biochem* 12: 5127-5134.
19. Graham D, Reed ML, Patterson BD, Hockley DG and Dwyer MR (1984). Chemical properties, distribution and physiology of plant and algal carbonic anhydrases. *Ann NY Acad Sci* 429: 222-237.
20. Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS and Ferry JG (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc NY Acad Sci* 96:15184–15189.
21. Krungkrai J, Krungkrai SR and Supuran C T (2007). Malarial parasite carbonic anhydrase and its inhibitors. *Curr Top Med Chem* 7: 909–917.
22. Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y and Morel FM (2008) Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* 452, 56-61.

23. Capasso C and Supuran CT (2015). An overview of the alpha-beta and gamma-carbonic anhydrases from bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria. *J Enzyme Inhib Med Chem* 325–332.
24. Saleem M, Saeed A, Atia-tul-Wahab et al. *Med Chem Res* (2016). Benzamide sulfonamide derivatives: potent inhibitors of carbonic anhydrase-II. *Med Chem Res* 25: 438.
25. Pénicaud L, Lorsignol A (2013). Histology of Adipose Tissue. *Physiology and physiopathology of adipose tissue* (Ed: Bastard JP, Fève B). Paris, 67-69.
26. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR, (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256.
27. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ. A review article. *Dig Dis Sci* 54: 1847-1856.
28. Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11: 11-18.
29. Frühbeck G (2008). Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Adipose Tissue Protocols* (Ed: Yang K). Totowa, 1-19.
30. Messina G, Valenzano A, Moscatelli F, Salerno M, Lonigro A, Esposito T, Monda V, Corso G, Messina A, Viggiano A, Triggiani AI, Chieffi S, Guglielmi G, Monda M, Cibelli G (2017). Role of Autonomic Nervous System and Orexinergic System on Adipose Tissue. *Front Physiol* 10;8:137.
31. Peker E (2005). Soğuk stresine maruz bırakılan sıçanlarda damar düz kas aktivitesinin yağ dokusu ile ilişkisi. Yüksek lisans tezi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
32. Parray HA, Yun JW (2015). Proteomic identification of target proteins of thiodigalactoside in white adipose tissue from diet-induced obese rats. *Int J Mol Sci* 16 (7):14441-63.
33. Gesta S, Kahn CR (2012). White adipose tissue. *Adipose Tissue Biology* (Ed: Symonds ME). Boston, 72-72.
34. 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 Endoc* 291: 63-70.

35. Giordano A, Song CK, Bowers RR, Ehlen JC, Frontini A, Cinti S, Bartness TJ (2006). White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol* 291: 1243-1255.
36. Blaszkiewicz M, Townsend KL (2016). Adipose tissue and energy expenditure: central and peripheral neural activation pathways. *Curr Obes Rep* 5 (2):241-50.
37. Frasson D, Boschini RP, Chaves VE, Dos Santos ME, Paula Gomes S, Valentim RR, Garófalo MA, Navegantes LC, Migliorini RH, Kettelhut Ido C. (2012). The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats. *Metabolism*. 61(10):1473-85.
38. Ahmet Alver (2003). Sıçan Yağ Hücrelerinde Leptin Hormonu ile Karbonik Anhidraz III İzoenzimi Arasındaki İlişkinin İn Vitro İncelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
39. Ayşegül Sümer (2014). Topiramatin Yağ Hücresi Farklılaşması ve Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İn Vitro İncelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
40. Jin Hee Shin and Kishore M Gadde (2013). Clinical utility of phentermine/topiramate (Qsymia™) combination for the treatment of obesity Diabetes Metab Syndr Obes 6: 131–139.
41. Ahmadi Rendi T (2015). Retroperitoneal yağ dokusu denervasyonunu takiben diyetle obez yapılmış sıçanlarda leptin sentezi ve serum leptin seviyelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
42. Harris RBS (2012). Sympathetic denervation of one white fat depot changes norepinephrine content and turnover in intact white and brown fat depots. *Adipocyte* Bio 20: 1355-1366.
43. Bartness TJ, Liu Y, Shrestha YB, Ryu V (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front Neuroendoc* 35: 473-93.
44. Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.

45. Wilbur KM and Anderson NG (1948). Carbonic anhydrase colorimetric determination. *electrometric and journal of biological chemistry*. 176: 147-154.
46. Vaughan CH, Zarebidaki E, Ehlen JC, Bartness TJ (2014). Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Met Enzym* 537:199-225.
47. Alver A, Keha EE, Uçar F, Ovali E (2003). The effect of carbonic anhydrase inhibition on leptin secretion by rat adipose tissue. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19 (2): 181-4.
48. Alver A (1997). Belirli yaş gruplarındaki bireylerde serum total karbonik anhidraz ve karbonik anhidraz III aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

9. 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 : "Retroperitoneal Yağ Dokusu Denevce Edilmiş Sıçanlarda Retroperitoneal ve Epididimal Yağ Dokularından Salgılanan Adipokin Profillerinin İncelenmesi"			
Çalışmacılar : Doç.Dr.Ahmet ALVER, Doç.Dr.Sinan CANPOLAT, Arş.Gör.Cemil KAHRAMAN			
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya			
Etik Kurul Dosya No 2013/ 29	Etik Kurul Toplantı Tarihi 28.05.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/09	Etik Kurul Karar No 06
Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Etem ALHAN'ın başkanlığında; "Retroperitoneal Yağ Dokusu Denevce Edilmiş Sıçanlarda Retroperitoneal ve Epididimal Yağ Dokularından Salgılanan Adipokin Profillerinin 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. (28.05.2013) Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı			

10) ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yeşim SELVİ
Doğum Tarihi/Yeri : 1990/MAÇKA
E-posta : yesimselvi61@hotmail.com
Adres : KTÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AbD, TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Fakülte/Bölüm	Üniversite	Yıl
Yüksek Lisans	SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	KTÜ	2015
Lisans	Fen Fak./Kimya	KTÜ	2013
Yabancı Dil	İngilizce YÖKDİL (73.750)		