



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DİYETLE İNDÜKLENMİŞ OBEZİTEDE YAĞ
DOKUSUNDAKİ OKSİDAN ANTİOKSİDAN
DENGİNİN İNCELENMESİ**

Cemil KAHRAMAN

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON - 2013



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DİYETLE İNDÜKLENMİŞ OBEZİTEDE YAĞ
DOKUSUNDAKİ OKSİDAN ANTİOKSİDAN
DENGİNİN İNCELENMESİ**

Cemil KAHRAMAN

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON - 2013

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Cemil KAHRAMAN'ın hazırladığı “Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusundaki Oksidan Antioksidan Dengenin İncelenmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği/oyçokluğu ile doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç.Dr. Ahmet ALVER

Doktora sınavı jüri üyeleri:

Prof. Dr. Edip KEHA

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Prof. Dr. Fahri UÇAR

Prof. Dr. Ersan KALAY

Doç. Dr. Ahmet ALVER

Tarih/...../ 2013

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..... / 2013 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

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.

02.09.2013

Cemil KAHRAMAN

TEŞEKKÜR

Doktora hayatım boyunca bilimsel bakış açısıyla, akademik duruşuyla daima örnek olarak gördüğüm ve tez çalışmamın gerçekleşmesinde gerekli imkânları sağlayan, araştırmanın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda değerli bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tüm yardım ve emekleri için danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, doktora eğitimim boyunca yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL, Prof. Dr. Ersan KALAY, Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a, çalışmamızın gerçekleşmesi için yapmış olduğu değerli katkı ve yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN, Yrd. Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye, bana her aşamada destek ve yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli arkadaşlarıma, gösterdikleri tüm sabır, özveri ve emekleri için varlıklarıyla bana destek sağlayan, varlıkları bana en güzel armağan olan sevgili eşime, anneme, babama, kardeşlerime ve evimizin neşe kaynağı oğluma teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yapılmasında 111S252 nolu proje ile maddi kaynak sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Araş. Gör. Cemil KAHRAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ve ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

TABLolar DİZİNİ

vi

ŞEKİLLER DİZİNİ

vii

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

ix

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ VE AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

5

4.1. Obezite

5

4.2. Yağ Dokusunun Gelişimi

5

4.3. Yağ Dokusunun Yapısı

7

4.4. Yağ Dokusunun Türleri, Vücuttaki Yerleşimi Ve Özellikleri

8

4.5. Yağ Dokusunda Üretilen Adipokinler

10

4.5.1. Leptin

10

4.5.2. Adiponektin

11

4.5.3. Rezistin

12

4.5.4. Apelin

13

4.5.5. İnterlökin-6

14

4.5.6. Tümör Nekrozis Faktör- α

14

4.5.7. Retinol Bağlayıcı Protein 4

15

4.6. Diyet ve Obezite

15

4.7. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

16

4.8. Malondialdehit

16

4.9. Protein Karbonil

17

4.10. Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz

18

4.11. Antioksidan Savunma Sistemleri

19

4.12. Antioksidan Enzimler

20

4.12.1. Süperoksit Dismutaz

20

4.12.2.	Katalaz	20
4.12.3.	Glutasyon Peroksidaz	21
4.13.	Enzim Olmayan Antioksidanlar	21
4.13.1.	Glutasyon	21
4.13.2.	N-asetilsistein	22
4.14.	Obezite ve Oksidatif Stres	22
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	25
5.1	Gereçler	25
5.1.1.	Kullanılan Sıçanlar	25
5.1.2.	Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	25
5.1.3.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
5.1.4.	Kullanılan Ticari Kitler	27
5.2.	Yöntemler	27
5.2.1	Deney Grupları	27
5.2.2.	Deney Planı	29
5.2.3.	Yağ Dokusunda Antioksidan Enzim Ölçümleri	30
5.2.3.1.	Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	30
5.2.3.2.	Katalaz Aktivite Tayini	32
5.2.3.3.	Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini	34
5.2.4.	Glutasyon Ölçümü	34
5.2.5.	Doku MDA Ölçümü	36
5.2.6.	Protein Karbonil Ölçümü	38
5.2.7.	Serumda Total Oksidan-Antioksidan Kapasite Ölçümü	40
5.2.8.	Protein Tayini	40
5.2.9.	Serumda Leptin Ölçümü	43
5.2.10.	Serumda Adiponektin Ölçümü	44
5.2.11.	Serumda Rezistin Ölçümü	45
5.2.12.	Serumda Apelin Ölçümü	45
5.2.13.	Serumda RBP Ölçümü	46
5.2.14.	Serumda IL-6 Ölçümü	47
5.2.15.	Serumda TNF- α Ölçümü	47
5.2.16.	Serumda İnsülin Ölçümü	48

5.2.17.	Serumda Glukoz Ve Trigliserit Ölçümü	48
5.2.18.	Gen Ekspresyon Analizi	48
5.2.18. 1.	Yağ Dokusunda Total RNA İzolasyonu	48
5.2.18.2.	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Elde Edilmesi Çoğaltılması ve Görüntülenmesi	48
5.2.18.3.	RT- PCR	51
5.2.19.	Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	54
6.	BULGULAR	55
6.1.	Morfolojik Bulgular	55
6.2.	Süperoksit Dismutaz Aktivite Ölçüm Sonuçları	58
6.3.	Katalaz Aktivite Ölçüm Sonuçları	59
6.4.	Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçüm Sonuçları	59
6.5.	GSH Ölçüm Sonuçları	60
6.6.	MDA Ölçüm Sonuçları	51
6.7.	Protein Karbonil Ölçüm Sonuçları	61
6.8.	IL-6, TN- α , OSİ, RBP Ölçüm Sonuçları	62
6.9.	Adipokin Ölçüm Sonuçları	62
6.10.	Ölçülen Oksidatif Stres Belirteçleri, Antioksidan Enzimler, Antioksidan Bileşikler, Adipokinlerin Ortalamaları ve Standart Sapma Değerleri	63
6.11.	Yağ Dokularında Gen Ekspresyon Sonuçları	66
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	68
8.	KAYNAKLAR	76
9.	ETİK KURUL ONAYI	85
10.	ÖZGEÇMİŞ	86

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Kemirgenlerde beyaz ve kahverengi yağ dokusu belirteç farklılıkları	9
Tablo 2.	Kullanılan cihazlar ve malzemeler	25
Tablo 3.	Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	26
Tablo 4.	Kullanılan kitler ve üretici firmalar	27
Tablo 5.	Standart sıçan yeminin içeriği	28
Tablo 6.	Yüksek kalorili sıçan yeminin içeriği	29
Tablo 7.	SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	31
Tablo 8.	Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı	33
Tablo 9.	MDA ölçümü için reaksiyon karışımı ve yapılan uygulamalar	37
Tablo 10.	Protein karbonil ölçümü için derivatizasyon işlemleri	39
Tablo 11.	Agaroz jele yüklenen örnekler	50
Tablo 12.	RT- PCR’da kullanılan primer dizileri	51
Tablo 13.	Örneklerin RT- PCR için hazırlanması	52
Tablo 14.	RT-PCR Protokolü	52
Tablo 15.	Ağırlık, glukoz, TG, insülin ve OSİ değişiklikleri	56
Tablo 16.	Visseral yağ dokusunda MDA, SOD, CAT, protein karbonil ve GSH ortalamaları ve standart sapmaları	63
Tablo 17.	Perirenal yağ dokusunda MDA, SOD, CAT, protein karbonil ve GSH ortalamaları ve standart sapmaları	64
Tablo 18.	Subkutan yağ dokusunda MDA, SOD, CAT, protein karbonil ve GSH ortalamaları ve standart sapmaları	64
Tablo 19.	Deney gruplarındaki adipokinlerin ortalamaları ve standart sapmaları	65
Tablo 20.	Adipokinlerle doku parametreleri arasındaki korelasyon tablosu	65
Tablo 21.	Sitokinler arasındaki korelasyon tablosu	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Yağ asitlerinden MDA oluşumu	17
Şekil 2.	Amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonu ile üretilmiş karbonil türleri	18
Şekil 3.	Aktif NADPH oksidaz kompleksinin yapısı	19
Şekil 4.	Glutatyonun açık formülü	21
Şekil 5.	Logaritmik SOD standart grafiği	32
Şekil 6.	Lineer SOD standart grafiği	32
Şekil 7.	Glutatyon peroksidaz kontrol grafiği	34
Şekil 8.	Glutatyon standart grafiği	36
Şekil 9.	MDA standart grafiği	38
Şekil 10.	Protein standart grafiği (SOD için)	41
Şekil 11.	Protein standart grafiği (CAT için)	42
Şekil 12.	Protein standart grafiği (GSH için)	42
Şekil 13.	Protein standart grafiği (MDA için)	43
Şekil 14.	Leptin standart grafiği	44
Şekil 15.	Adiponektin standart grafiği	44
Şekil 16.	Rezistin standart grafiği	45
Şekil 17.	Apelin standart grafiği	46
Şekil 18.	RBP standart grafiği	46
Şekil 19.	IL-6 standart grafiği	47
Şekil 20.	TN- α standart grafiği	47
Şekil 21.	İnsülin standart grafiği	48
Şekil 22.	RT-PCR'dan sonra agaroz jelde ürünlerin görüntüsü	50
Şekil 23.	Leptin için erime noktası grafiği	53
Şekil 24.	Amplifikasyon eğrileri	53
Şekil 25.	Beslenme periodunun başlanıcındaki sıçanların görüntüsü	55
Şekil 26.	Beslenme periodunun sonunda sıçanların görüntüsü	56
Şekil 27.	Visseral yağ dokusu A) kontrol, B) obez	57
Şekil 28.	Perirenal yağ dokusu A) kontrol, B) obez	57
Şekil 29.	Subkutan yağ dokusu	58

Şekil 30.	SOD aktivite sonuçları	58
Şekil 31.	CAT aktivite sonuçları	59
Şekil 32.	GPx aktivite sonuçları	60
Şekil 33.	GSH sonuçları	60
Şekil 34.	Doku MDA seviyeleri	61
Şekil 35.	Protein karbonil sonuçları	61
Şekil 36.	IL-6, TNF- α , RBP, OSİ sonuçları	62
Şekil 37.	Adipokin seviyeleri	63
Şekil 38.	Visseral yağ dokusundaki gen ekspresyonları	66
Şekil 39.	Perirenal yağ dokusundaki gen ekspresyonları	67
Şekil 40.	Subkutan yağ dokusundaki gen ekspresyonları	67

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AGEs	İleri glikasyon son ürünleri
AMP	Adenozin mono fosfat
BSA	Sığır serum albümin
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
BMI	Vücut kitle indeksi
CAT	Katalaz
CRP	C-reaktif protein
DEPC	Dietil pirokarbonat
Dk	Dakika
DTNB	Ditiyonitrobenzoat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gram
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GSH	Redükte glutasyon
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
4-HNE	4-hydroxynonenal
IL-6	İnterlökin-6
kDa	Kilo dalton
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	Malondialdehit
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein- 1
mL	Mililitre
mM	Milimolar
µL	Mikrolitre
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAC	N-asetilsistein

NBT	Nitro blue tetrazolium
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
pL	Pikolitre
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
RBP-4	Retinol bağlayıcı protein-4
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
ROS	Reaktif oksijen türleri
Sn	Saniye
SDS	Sodyum dodesilsülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
TAK	Total antioksidan kapasite
TOK	Total oksidan kapasite
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TG	Triaçilgliserol
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TNF-α	Tümör nekroz faktör-alfa
UCP	Uncoupling protein
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

Formüller

CuCl₂	Bakır II klorür
CH₃COOH	Asetik asit
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HOCl	Hipoklorous asit
H₃PO₄	Fosforik asit
HO₂•	Hidroperoksil
H₂SO₄	Sülfürik asit
H₃PO₄	Fosforik asit
KCl	Potasyum klorür
K₂HPO₄ 3H₂O	Dipotasyum hidrojen fosfat trihidrat
KH₂PO₄	Potasyum hidrojen fosfat
Na₂HPO₄ 2H₂O	Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
NaOH	Sodyum hidroksit
Na₂EDTA	Sodyum EDTA
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
(NH₄)₂SO₄	Amonyum sülfat
O₂	Oksijen
O₂•⁻	Süperoksit
OH•	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
O₃	Ozon
RO₂•	Peroksil
RO•	Alkoksil

ÖZET

Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusundaki Oksidan-Antioksidan Dengenin İncelenmesi

Obezite ile birlikte yağ dokusunda oksidan-antioksidan denge değişiklikleri meydana gelmektedir. Ancak, vücudun farklı bölgelerindeki yağ dokularında bu değişikliklerin hangi düzeyde gerçekleştiği, oksidan-antioksidan denge değişikliği ile adipokin salgılanması arasında nasıl bir ilişki olduğu net bir şekilde ortaya konulmamıştır. Çalışmamızda, yüksek yağlı diyetle sıçanlarda oluşturulan obezite modelinde, vücudun farklı bölgelerindeki yağ dokularında oksidan-antioksidan denge değişikliği, bu denge değişikliği ile adipokin salgılanması arasındaki ilişki ve antioksidan kullanımının bu ilişkiyi hangi yönde etkilediğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, her birinde 6 adet Sprague Dawley ırkı sıçan bulunan kontrol, obez ve obez + 2 g/L N-asetilsistein alan gruplar oluşturuldu. Kontrol grubu standart sıçan yemiyle, obez ve NAC grubu yüksek yağ içerikli yemle toplam 85 gün beslendi. Serum numuneleri, subkutan (derialtı), visseral ve böbrek etrafındaki yağ dokusu örnekleri alındı. Serum numunelerinde leptin, adiponektin, rezistin, apelin, insülin, interlökin-6, tümör nekrozis faktör- α ve retinol bağlayıcı protein-4 miktarları ölçüldü. Doku örneklerinde leptin, adiponektin, rezistin, apelin, beta aktin ve nikotinamit adenin dinükleotid fosfat oksidaz enziminin ribonükleik asit seviyeleri real time polymerase chain reaction ile belirlendi. Dokularda malondialdehit, protein karbonil grubu, glutatyon miktarı belirlenip, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri ölçüldü.

Serum leptin, perirenal malondialdehit ve subkutan glutatyon seviyeleri obez grupta artmıştı (sırasıyla, $p=0.003$, $p=0.004$, $p=0.032$). Visseral süperoksit dismutaz, visseral katalaz, perirenal katalaz, visseral glutatyon peroksidaz aktiviteleri obez grupta azalmıştı (sırasıyla, $p=0.009$, $p=0.009$, $p=0.002$, $p=0.002$). Leptin ve apelin gen ekspresyonları subkutan yağ dokusunda obez grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.04$, $p=0.03$).

Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen sıçanlarda, yağ dokuları arasında oksidatif strese cevapta ve adipokin ekspresyon profillerinde fark olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Leptin, oksidatif stress, obezite, süperoksit dismutaz, yağ dokusu

SUMMARY

The Investigation of Adipose Tissue's Oxidant - Antioxidant Balance in Dietary-Induced Obesity

The oxidant-antioxidant balance alterations, associated with obesity, have been previously reported. However, the extend of such changes in the fat tissues located at different regions of the body is not clear. Similarly, the relation between the adipokin release and the oxidant-antioxidant balance remains to be elucidated. In this study, the rat model of high fat diet obesity was used to determine the oxidant-antioxidant balance and the relation to the adipokin release in fat tissues of different body regions. How antioxidant use effects the changes occurred also investigated.

Control, obese and obese +2 g/L N-acetylcysteine groups were established. Each group consisted 6 Sprague-Dawley rats. Control rats were fed by standart food and obese and N-acetylcysteine group were fed by high fat diet. The serum samples and fat tissue samples from subcutaneous, visceral and perirenal pads were collected. The concentrations of leptin, adiponectin, apelin, resistin, insulin, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, retinol binding protein-4 were determined in the serum samples. In the fat tissue samples, messenger ribonucleic acid levels of leptin, adiponectin, apelin, resistin and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase were measured by real time polymerase chain reaction. Additionally, the amounts of malondialdehyde, protein carbonyl group, glutathione, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities were determined.

Serum leptin, perirenal malondialdehyde and subcutaneous glutathion levels increased in obese group ($p=0.003$, $p=0.004$, $p=0.032$, respectively) and visceral superoxide dismutase, visceral catalase and perirenal catalase activities decreased in obese group ($p=0.009$, $p=0.009$, $p=0.002$, respectively). Leptin and apelin messenger ribonucleic acid levels increased in obese group ($p=0.04$, $p=0.03$), respectively).

It was suggested that, there are differences in oxidative stress responses and adipokine expression profile for differently located adipose tissues in rats fed high fat diet.

Key Words: Leptin, oxidative stress, obesity, superoxide dismutase, adipose tissue

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Obezite ve komplikasyonları günümüz insanını tehdit eden önemli bir sağlık problemidir. Özellikle sanayileşme ile artan sedanter yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarındaki değişimler, tüm dünyada yaş gruplarına bakılmaksızın obezite insidansını hızlı bir şekilde artırmıştır. Etkili ve uygulanabilir tedavi yaklaşımlarını geliştirebilmek ve obezitenin biyokimyasal mekanizmalarını anlayabilmek için insanlarda gözlenen obezitenin de altında yatan en büyük etken olan diyetle uyarılmış obez modeller birçok çalışmada kullanılmaktadır. Rodentlerde farklı obezite modelleri ile obezite oluşturmak mümkündür. Bunlardan biri olan çevresel indüklenmiş obezite modelinde enerji açısından yüksek kalori değerine sahip beslenme programı uygulanmaktadır (1, 2).

Yağ dokusu anatomik yerleşimlerine göre subkutan ve visseral yağ dokusu olarak sınıflandırılmaktadır. Subkutan yağ dokusu boyun, sırt, bel, karın, gluteal, femoral ve meme bölgesinde bulunur. Visseral yağ dokusu ise mide, barsak, göbek, pankreas, aort, kalp, böbrek ve iç üreme organları çevresinde bulunmaktadır (3) .

Beyaz yağ dokusu salgılamış olduğu hormonlar ve sitokinlerden dolayı endokrin organ olarak kabul edilmektedir. Yağ dokusu diyetle alınan fazla enerjiyi triaçilgliserol (TG) şeklinde depolaması dışında enerji metabolizmasının kontrolünde de ana faktör olduğu bilinmektedir. Yağ dokusu leptin, adiponektin, rezistin, retinol bağlayıcı protein 4 (RBP-4), apelin gibi adipokinleri salgıladığı gibi, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), molekülünün de salgılamaktadır (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Bu moleküller insülin direnci, hipertansiyon, kanser gibi hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar. Yapılan çalışmalar, vücutta farklı yerlerdeki yağ dokularının farklı fonksiyonlara ve sentez özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir (4, 6, 12). Yağ hücrelerinde artan lipid içeriği adiposit disfonksiyonuna sebep olmakta ve salgılanan adipokin profili değişmektedir. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, obezite ile birlikte yağ dokusunda artmış bir oksidatif stresin varlığı belirtilmiştir (8). Ancak lokal yağ dokularındaki oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan mekanizmalar ile adipokin seviyeleri arasındaki ilişki yeterince irdelenmemiştir.

Bu çalışmada, diyetle indüklenmiş obezitede visseral, perirenal ve subkutan yağ dokusundaki oksidatif stresin değişimini tespit etmek, diyabet, kalp-damar hastalıkları, metabolik sendrom ve kanser gibi hastalıkların patolojisinde rol alan bazı adipokinlerle oksidatif stres belirteçlerinin ilişkisini inceleyerek antioksidan kullanımının bu ilişki üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşmak için visseral, perirenal ve subkutan bölgelerden alınan yağ dokularında glutatyon, malondialdehit (MDA), protein karbonil grubu, antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) ölçüldü. Serum örneklerinde leptin, adiponektin, apelin, rezistin, RBP-4, glukoz, TG, IL-6, TNF- α , insülin, total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK) ölçümleri yapıldı. Yukarda belirtilen bölgelerden alınan yağ doku örneklerinden real time polymerase chain reaction (RT-PCR) tekniği ile leptin, adiponektin, rezistin, apelin, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz), beta aktin proteinlerin mRNA ekspresyonları tayin edildi. Güçlü bir antioksidan olan N-asetilsistein (NAC) kullanımı ile antioksidanların yağ dokusundaki oksidatif strese ve adipokin salgılanmasına etkisi ayrıca antioksidan kullanımının obeziteye bağlı komplikasyonların azaltılmasındaki etkinliği incelendi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Obezite

Obezite son yıllarda artan görülme sıklığı ile 21. yüzyılın en önemli sağlık problemlerinden biri olarak ortaya çıkmaktadır (13). Obezite vücuttaki yağ dokusu hacminin artmasından dolayı sağlık problemlerinin arttığı ve beklenen yaşam süresinin azaldığı medikal bir durum olarak tanımlanır (14). Besinlerle alınan enerjinin vücudun harcadığı enerji miktarını geçtiği zaman, fazla enerji yağ dokusunda TG olarak depolanır ve obezite ortaya çıkar (15). Obezite özellikle kalp hastalıkları, tip 2 diyabet ve kanserin ortaya çıkma riskini artırır (4, 5, 14, 15). Bazı endokrin ve psikiyatrik hastalıkların obeziteye neden olduğu bilinmesine rağmen obezitenin en yaygın nedenleri diyetle fazla kalori alınması, fiziksel aktivitenin azalması ve genetik yatkınlık olarak bilinmektedir (16).

Obezite oluşumu esnasında hangi bölgedeki yağ dokusunun genişleyeceğini tür ve genetik durumun belirlediği bilinmektedir. Erkeklerde genellikle abdominal obezite gerçekleşirken kadınlarda ise subkutan yağ kütlesinin artması şeklinde obezite gerçekleşir. Bu farklılıkta cinsiyet hormonları önemli rol oynar (3).

4.2. Yağ Dokusunun Gelişimi

Yağ hücreleri (adipositler) mezankimal kaynaklı fusiform öncül hücreler ve yıldız şeklindeki hücrelerden farklılaşır. İnsan embriyosunda yağ dokusunun oluşumu iki aşamaya ayrılabilir. İlk kez yağ oluşumu doğumdan önceki 14. ve 16. haftalar civarında özel yerlerde şekillenmiş olan preadipositler veya lipoblast olarak adlandırılan epitelsi öncül hücrelerin salgı bezi benzeri toplanması şeklinde meydana gelir. İkinci yağ oluşumu gebeliğin 23. haftasından sonra ve erken doğum sonrasında meydana gelir. Bu aşamada bir tane büyük yağ damlacığına lipidleri toplayan fusiform öncül hücrelerdeki farklılaşma, yağ dokusunun birçok yerinde tek yağ damlacığı içeren beyaz yağ dokusu hücrelerinden oluşan yağ depolarının yayılmasına öncülük eder. Yağ dokusu yağ dokusu parçaları tarafından bölümlere ayrılır. Yağ bölümlerinin sayısı sabit kalmasına rağmen, yağ dokusunun gelişimsel değişiklikleri bölümlerin hacimlerinde meydana gelen büyümeyle beraber gerçekleşir. Hamileliğin ikinci üç aylık süresi yetişkin yaşlarda obezitenin gelişimi için kritik periyodu oluşturur. Yağ hücreleri göreceli olarak

küçük olmasına rağmen üçüncü üç aylık sürenin başlangıcında ana yağ depolarında bulunmaktadır. Yağ hücre kümelerinin oluşumu ile damar oluşumunun temporo-spatial koordinasyonu embriyonik gelişim esnasında meydana gelir. Doğumda beyaz yağ dokusu total vücut ağırlığının yaklaşık % 16'sını oluşturmaktadır. Kahverengi yağ dokusu ise vücut ağırlığının % 2-5'ini oluşturmaktadır. Doğumdan sonraki ilk yıl yağ dokusu 0.7- 2.8 kg arasında artmaktadır (3).

Öncül hücrelerin yağ dokusu hücrelerine dönüşümü adipogenezis olarak adlandırılır (17). Adipogenezis yaşa ve cinsiyete göre değişmektedir. Yağ hücreleri adipoblasta dönüşen multipotent mezenkimal kök hücrelerden meydana gelmektedir. Preadipositlere dönüşen adipoblastlar, erken markırları eksprese ederler ancak geç markırları eksprese etmezler ve TG depolamazlar (3).

Embriyonik gelişim esnasında bulunan multipotent kök hücreler ve adipoblastlar doğumdan sonra da bulunabilmektedir. Yaşam boyunca yağ dokusu hücrelerinde değişiklikler için hassas peryotların varlığı kesin olarak kanıtlanmıştır. Özellikle yağ dokusu büyümesinin hızlandığı iki zaman dilimi bilinmektedir. Bunlar doğumdan sonraki zaman dilimi ve 9-13 yaş arasındaki zaman dilimidir. Hücre çoğalması ve farklılaşması yaşamın ilk yıllarında en yüksek seviyede olmaktadır ve ergenlik çağı öncesindeki yıllarda ise daha az olmaktadır. Ergenlik döneminde hücre çoğalma oranı yavaşlamaktadır. Ağırlığı değişmeyen bireylerde yetişkinlik boyunca hemen hemen değişmeden kalır. Pozitif enerji dengesinin devam etmesi durumunda yağ dokusu kütesinin artması esas olarak dokuda var olan yağ hücrelerinin genişlemesiyle meydana gelmektedir. Bu durumun sürdürülmesi total yağ hücre sayısında artmanın olduğu şiddetli obeziteyle sonlanır. Pozitif enerji dengesi uzun zaman sürerse hücre sayısının artmasıyla veya hücre hacminin artmasıyla yağ dokusunda büyüme gerçekleşir. Beyaz yağ dokusunda apoptozis olayının tanımlanması, yağ hücresi kazanımının geriye dönüşümsüz olduğu fikrini değiştirmiştir. Çocukluk dönemindeki obezite, yağ hücrelerinin hacimsel ve sayısal olarak artması ile karakterizedir. Yetişkinlik dönemindeki obezite de ise yağ hücresi hacminin büyümesi baskındır. Yetişkinlerde yağ dokusundaki yağ hücrelerinin sayısının artması yağ hücrelerinin hacmi kritik hacme ulaşana kadar gerçekleşmez. İnsanlarda yeni yağ hücrelerinin oluşumu farklılaşma

yetenekli hücrelerin önemli bir kısmını içeren beyaz yağ dokusunda gerçekleştiği ifade edilmektedir (3).

4.3. Yağ Dokusunun Yapısı

Yağ dokusu lipitle yüklü yağ hücreleri içeren özel gevşek bağ dokusu olarak kabul edilir. Doku içinde yağ hücreleri, zengin toplar damar ve sinir ağıyla etrafı çevrilen bağ dokusu parçalarıyla bağlanan lobullerde narin retikular lifler vasıtasıyla tutunur (3).

Yağ hücreleri yetişkinlerde yağ dokusu kütesinin yaklaşık % 35-70'ini, total hücre popülasyonunun ise yaklaşık % 25'ini içerir. Yağ dokusunun kendisi sadece yağ hücrelerinden değil, aynı zamanda makrofajlarında dahil olduğu stroma vasküler fraksiyonda bulunan diğer hücre tipleri, fibroblastlar, perisitler, kan hücreleri, endotelial hücreler, preadipositler, az farklılaşmış mezenkimal hücrelerin birleşiminden oluşmuştur. Bu değişik hücre tipleri total hücre popülasyonunun kalan % 75'ini oluşturur. Yağ hücrelerinin karakteristik küresel şekillerinde, 20 µm den 200 µm ye kadar çapta değişebilen hacimde muazzam çeşitlilik vardır. Lipit damlacıkları kolesterol, fosfolipit, yağ asitleri, TG ve nötral yağların karışımını içerir. Yaklaşık olarak depolanan total lipit içeriğinin % 95'i genelde palmitik asit ve oleik asitten oluşan trigliserittir. Geriye kalan ise diaçilgliserol, fosfolipit, esterleşmemiş yağ asidi ve kolesterolü oluşturmaktadır. Lipit damlacıklarını ince arayüzey bir membran stoplazmik matriksten ayırır. Yağ hücreleri çaplarını 20 kat değiştirme yeteneğine sahiptir. Artan lipit yüküne uyum sağlayabilmek için birkaç bin kat hacimlerini değiştirebilir. Ancak yağ hücrelerinin hacminin genişlemesi sınırsız değildir. Öncül hücre havuzundan yeni yağ hücreleri oluşumu insanlarda ortalama 1000 pL olan maksimum kapasiteye ulaşıldığında meydana gelir. Yağ hücrelerinde hücre hacminin yaklaşık % 90'ı lipit damlacığıdır. Hücre çekirdeği, yağ hücrelerinin çevresine sıkışmış olan ince stoplazmik çerçeve ile hücrenin kenarına doğru itilerek düzleşmiş yarım ay haline gelmiştir. Olgun beyaz yağ hücreleri tek büyük lipit damlacığı içerir ve ünloküler olarak tanımlanır. Olgun beyaz yağ dokusu hücreleri tek büyük lipit damlacığı taşıyan hücre haline dönüşmeden önce geçici olarak birçok lipit damlacığını içeren multiloküler hücre şeklindedir. Genç yağ hücresinde hücre çekirdeği yuvarlak veya ovaldir, olgun yağ hücrelerinde fincan şekline döner. Stoplazma lipit damlacığı etrafında dar kılıf şeklinde

yayılır. Gevşek olarak dizilmiş zarımsı kabartı ile birkaç mitokontri hücre çekirdeği etrafında gözlemlenebilir. Stoplazmada küçük golgiler vardır. Serbest ribozomlar bol bulunur, fakat stoplazma az sayıda lizozomlarla bir kaç granüllü endoplazmik redikulumun kısa bölümlerini içerir (3).

4.4. Yağ Dokusunun Türleri, Vücuttaki Yerleşimi ve Özellikleri

Yağ dokusu anatomik yerleşimlerine göre subkutan ve visseral yağ dokusu olarak sınıflandırılmaktadır. İnsan vücudundaki yağ dokusunun yaklaşık % 80'i yüzeysel ve derin subkutan yağ dokusudur. Subkutan yağ dokusu boyun, sırt, bel, karın, gluteal, femoral ve meme bölgesinde bulunur. Yağ dokusunun yaklaşık % 20'si ise visseral yağ olarak mide, barsak, göbek, pankreas, aort, kalp, böbrek ve iç üreme organları çevresinde bulunmaktadır. Ayrıca kas içinde ve kas çevresinde az miktarda bulunan yağ dokusu da visseral yağ dokusuna dahil edilmektedir (3).

Yağ dokusu hücre yapısı, rengi ve fonksiyon farklılıkları açısından ise iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar beyaz yağ dokusu ve kahverengi yağ dokusudur (17). Beyaz yağ dokusu yetişkinlerde deri altında, böbrek çevresinde, ve visseral bölgede bol miktarda bulunurken (15) kahverengi yağ dokusu ise insanlarda özellikle yeni doğanlarda bulunur ve zamanla miktarı azalan mitokondri yönünden zengin bir dokudur (4, 6). Beyaz yağ dokusu ve kahverengi yağ dokusundaki belirteç farklılıkları Tablo 1'de gösterilmiştir (3).

Tablo 1. Kemirgenlerde beyaz ve kahverengi yağ dokusu belirteç farklılıkları (Frühbeck'den, 3).

	Beyaz yağ dokusu	Kahverengi yağ dokusu
Dokunun bol bulunduğu yer	İnguinal, retroperitoneal, gonadal	İnterskapular, böbrek çevresi, koltuk altı, paravertebral
Renk	Sarı veya fildişi	Kahverengi
Damar sistemi	++	+++
Sinir uyarımı	Sempatik ++	Sempatik ++
Hücre şekli	Uniloküler hücreler	Multiloküler hücreler
Fonksiyonlar	Trigiserit depolama Yağ asidi ve gliserol salıverme Adipokin salgılama	Trigiserit depolama Isı üretimi Adipokin salgılama
Mitokondri	+	+++
Uncoupling proteinler	UCP 2 (++)	UCP 1, UCP 2 (+), UCP 3
Leptin	+++	Doğumda, yetişkinde değil
Adrenoreseptörler	β_3 (++) α_2 (+)	β_3 (+++)

Beyaz yağ dokusunun fonksiyonları üç başlık altında toplanmaktadır. Serbest yağ asitlerini TG olarak depolama, depolamış olduğu TG'leri gliserol ve serbest yağ asitlerine katabolize etme ve son olarakta, özel biyolojik fonksiyonları olan proteinleri, sitokinleri, hormonları ve adipokinleri üreterek salgılamaktadır (18).

Yağ dokusu aynı zamanda yağ hücrelerinin depo ve fonksiyonel karakteristiklerinin topografik yerleşimine göre farklılıklar gösterir. Genel olarak subkutan ve internal yağ dokusu olarak sınıflandırılan yağ dokularında fonksiyonel ve yapısal farklılıklar vardır.

Erkeklerin ve kadınların vücut şekillerini oluşturan android ve ginoid yağ dağılımını cinsiyet belirler. Kadınlarda subkutan yağ göğüsle birlikte gluteofemoral bölgede çok bol bulunur. Halbuki erkeklerde subkutan yağ ense, deltoid ve triseps

kasının üstü, ve lumbosakral bölgelerde bulunmaktadır. Her iki cinsiyette de retroperitoneal, omentum, mezenterikte yaygın yağ depoları bulunur. Erkeklerde visseral bölgede daha fazla yağ toplanması eğilimi vardır. Depospesifik farklılıklar sadece yağ hücresinin metabolizmasıyla ilişkili değil yeni yağ hücrelerin şekli ve kapasitesiyle de ilişkilidir. Ayrıca lokal çevresel damar ve sinir ağlarıyla beraber ekspresyon şekli, adipokin sekresyon profili, hormon reseptör dağılımı gibi moleküler karakteristikler bölgesel farklılıkları ortaya çıkarır (3).

4.5. Yağ Dokusunda Üretilen Adipokinler

Yağ dokusu salgılamış olduğu adipokin adı verilen sitokin ve hormonlarla enerji homeostazisinde, yağ hücrelerinin büyümesi ve gelişmesi gibi fizyolojik süreçlerde önemli rol oynar. Ayrıca, yağ dokusunun hemostaziste, immün cevapta, steroid metabolizmasında, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesinde, adipogeneziste ve anjiogenezis gibi metabolik süreçlerde de fonksiyonu bulunmaktadır (19). Son zamanlarda beyaz yağ dokusu salgılamış olduğu hormonlar ve sitokinlerden dolayı endokrin organ olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Yağ dokusu diyetle alınan fazla enerjiyi TG şeklinde depolaması dışında enerji metabolizmasının kontrolünde de ana faktör olduğu bilinmektedir. Yağ dokusu leptin, adiponektin, rezistin, serpin, lipokalin-2, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), retinol bağlayıcı protein 4 (RBP 4), Zn α -2 glycoprotein, vaspin, visfatin, omentin, apelin, chemerin gibi adipokinleri salgıladığı gibi, anjiotensinojen, TNF- α , IL-6, ve monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1) moleküllerinde salgılamaktadır (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Bu moleküller insülin direnci, hipertansiyon, kanser gibi hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar. Yapılan çalışmalar, vücuda dağılımları farklı yağ dokularının adipokin salgılama profillerinin farklı olduğunu göstermiştir (4, 6, 12).

4.5.1. Leptin

İlk kez Friedman ve arkadaşları *Ob* geni tarafından kodlanan leptin adındaki bir proteinin yağ hücrelerinden üretilip salgılandığını tesbit etmişlerdir. Leptin insanlarda ve sıçanlarda 16 kilo dalton (kDa) ağırlığında ve sinyal dizeli hali 167 plazmadaki hali 146 amino asitten oluşan bir proteindir (20, 21). Leptinin merkezi sinir sistemindeki etkisi ile yağ dokusu büyümesini kontrol ettiği sonucuna varılmıştır. Leptin hipotalamusu etkileyerek iştahı baskılar ve enerji sarfiyatını artırır. Yapılan çeşitli

çalışmalarla leptin reseptörlerinin karaciğerde, iskelet kasında, kalpte, böbrek ve pankreas gibi önemli organlarda da bulunduğu tesbit edilmiştir. Leptin başlıca yağ dokusunda sentezlenir. Miktarı vücuttaki yağ kitlesi ile orantılı olarak artar. Yağ dokusu dışında overlerde, bağırsaklarda ve karaciğerde de az miktarda sentezlenmektedir. Leptinin sadece olgun yağ hücrelerde sentezlendiği ve olgun olmayanlarda sentezlenmediği tesbit edilmiştir. Yağ hücreleri leptin reseptörlerinin de eksprese ettiği için bu hormonun otokrin ve parakrin etkilerinin de olduğu söylenmektedir. Aynı zamanda leptin hematopoiesis, angienezisi, uyardığı immun cevabı düzenlediği, sempatik sinir sistemini etkilediği ve kemik iliğini baskıladığı bilinmektedir. Bunlara ilaveten hiperleptinemi kan basıncını hayvanlarda yükseltmektedir. İnsanlarda ise kan basıncını yükseltmekteki etkisi daha azdır (17).

4.5.2. Adiponektin

Adiponektin yağ dokusundan salgılanan 30 kDa ağırlığında bir proteindir. Adiponektin, adipo Q ve Acrp 30 olarakta bilinmektedir. Adiponektin ilk kez 1995'te keşfedilmiştir (17). Adiponektin insanlarda sinyal dizeli hali 244 plazmadaki hali 226 amino asitten oluşan bir proteindir (22).

Obez ve normal kilolu insanlarda visseral yağda, subkutan yağdan daha düşük miktarda adiponektin gen ekspresyonu görülmektedir. Adiponektinin plazma konsantrasyonu visseral yağ dokusu ile negatif korelasyon sergilemektedir (23). Obez sıçanlarda adiponektin mRNA düzeyi normal sıçanlara göre daha düşük bulunmuştur (24).

Aynı zamanda obez insanlarda da normal kilolu insanlara göre adiponektin düzeyi daha düşük bulunmuştur (17, 25). Adiponektin, kasta uncoupling protein-2 (UCP-2) ve açıl koenzim oksidaz ekspresyonunu artırır. Yağ dokuda peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)'yı artırmaktadır. Bunlara ilaveten adiponektin karaciğer ve iskelet kasında adenosin monofosfat (AMP) tarafından aktiflenen protein kinazın fosforilasyonunu ve aktivasyonunu indüklemektedir (17, 26). Bahsedilen bu genlerin aktivasyonu ve ekspresyonu karaciğer ve kasta lipit katabolizmasını artırır ve trigliserit deposunu azaltır, insülin rezistans gelişim riskini azaltır (17, 27) .

Adiponektin çöpcü reseptör class A1'in ekspresyonunu inhibe ettiği için aterosklerotik değişikliklerle sonuçlanan oksitlenmiş düşük dansiteli lipoprotein (LDL) nin makrofajlara alınarak köpük hücre oluşumunu azaltmaktadır (28). Bu nedenle adiponektin aterosklerotik değişikliklerin gelişimine karşı hasara uğramış arterial damar duvarını korumaktadır (29). Ayrıca yapılan çalışmalarda, adiponektin ile oksidatif stres belirteçleri arasında negatif bir korelasyon gösterilmiştir (8).

4.5.3. Rezistin

Rezistin bol miktarda mononükleer hücrelerden exprese edilirken aynı zamanda yağ hücrelerinde, pankreatik hücrelerde, ve kasta da exprese edilmektedir. Rezistini kodlayan mRNA beyaz yağ dokusunda, dalakta, hipotalamusta, adrenal bezde, iskelet kasında ve pankreasta da tesbit edilmiştir (30). Rezistin sıçanlarda 114 amino asitlik, insanlarda 108 amino asitlik proproteinden oluşan, dolaşımda sinyal dizeleri kesilmiş dimerik şekilde bulunan bir proteindir (31). Rezistin ekspresyonu visseral yağ dokuda subkutan dokuya göre 15 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (32). Rezistin plazma seviyesi yağ depo hacmi ve cinsiyete bağlıdır (17). Farelerde rezistin seviyesi kısa süreli açlıkta azalır yeniden beslendiğinde artar. Ayrıca rezistin yüksek yağlı beslenmeye yanıt olarak artar.

Rezistin, iskelet kasını ve yağ dokusunu etkiler ancak moleküler mekanizması ve rolü tam olarak bilinmemektedir. İnsanlarda yüksek serum rezistin seviyeleri aterogenez ve komplikasyonları ile ilişkilidir. Rezistin farelerde insülin direncini ve glukoz intöleransını indükler. Bunu AMP ile aktive edilen protein kinaz aktivitesini azaltarak ve karaciğerde glukoneojenetik enzimlerin ekspresyonunu artırarak yaptığı ileri sürülmektedir (17). Yağ hücre kültüründe rezistin insülinle uyarılmış glukoz alımını bozmaktadır. Hayvanlara antirezistin antikoru nun uygulanması yüksek yağ alımı sonucu oluşan hiperglisemi ve insülin rezistansının gelişimini önlemektedir. Rezistin farelerde insülin rezistansına ve glukoz intöleransına neden olmaktadır (33).

Rezistinin insülin rezistansını indüklemeye anahtar yağ hücre sinyali olduğu ileri sürülmektedir. Böylece obezite ile diyabet arasındaki moleküler ilişkinin sağlandığı ifade edilmektedir (34).

4.5.4. Apelin

Apelin bazı hücre tiplerinin yüzeyinde exprese edilen G proteini ilişkili APJ reseptörü olarakta bilinen apelin reseptörü için endojen liganttır (35, 36, 37). Apelinin yağ dokusu, meme bezi, rahim, testis, akciğer, beyin, kalp gibi önemli dokularda farklı çeşitleri tanımlanmıştır (38, 39, 40). Apelin insanlarda ve sıçanlarda 77 amino asitlik prekürsör olarak sentezlenir daha sonra 55 amino asitlik forma dönüştürülür, ardından da daha kısa formlara dönüşür. Apelinin fizyolojik aktif formu 36 amino asitlik formudur. Daha kısa formda olanların da biyolojik fonksiyonu olabilmektedir (17). Apelin geni 77 aminoasitlik pre-proprotein şeklinde apelin kodlar (39). Endoplazmik redikulumda N terminal bölgedeki sinyal dizesinin ayrılması ile 55 amino asitlik proprotein haline gelir. 42-77 arasındaki 36 amino asitlik kısım apelin 36'yı meydana getirirken, 61-77 arasındaki 17 aminoasitlik kısım apelin 17'yi meydana getirir, 65-77 arasındaki 13 aminoasitlik kısım apelin 13'ü meydana getirir ve 66-77 arasındaki 12 aminoasitlik kısım apelin 12'yi meydana getirir (41).

Apelin arter duvarının düz kas hücrelerinin gevşemesini sağlayan nitrik oksit (NO) in salınmasını uyardığı ifade edilmektedir (42). Sıçanlara apelin uygulaması kan basıncını azaltmaktadır (17). Apelin kardiyak dokunun yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca kronik kalp yetersizliği olan hastaların sol ventriküllerinde apelin seviyesi arttığı tesbit edilmiştir (43). Apelin knock out farelerde kalp kasının kasılmasında sistolik disfonksiyonla ilişkili progresif bir bozulma gözlemlenmiştir (44). Ayrıca, apelinin endotelial hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonunu uyararak, anjiogenik aktivite gösterdiği ve anjiogenezise neden olduğu ifade edilmektedir (45, 46, 47, 48, 49).

Apelinin kahverengi yağ dokusundaki uncoupling protein (UCP) ekspresyonunu artırarak ve adiponektin seviyesini değiştirerek insülin rezistansını düzenleyebileceği ifade edilmektedir (50). Yağ hücrelerinde kısa süreli açlık apelin seviyesini azaltırken besin alımı ile apelin seviyesi yeniden artmaktadır (51). Yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda apelin salgılanmasının daha yüksek olduğu bilinmektedir (17). Diyabetik farelerde serum apelin seviyesi azaldığı için apelin sentezinin insülin tarafından düzenlendiği ileri sürülmektedir. Apelinin obezitede miktarı artar (52).

4.5.5. İnterlökin-6

IL-6 insanlarda sinyal dizeli hali 212 amino asit içeren, olgun hali 183 amino asitten oluşan bir proteindir (53). Sıçanlarda ise sinyal dizeli hali 211 amino asit içeren olgun hali 187 amino asitten oluşan bir proteindir (54).

IL-6 hücre savunmasında merkezi rol oynayan çok fonksiyonlu sitokindir. Akut faz yanıtını oluşturmada güçlü etkisi bulunmaktadır. IL-6 fazla ekspresyonu multiple miyeloma, romatoid artrit, pisöryazis, menopoz sonrası oluşan osteoporoz gibi bazı hastalıkların patolojisiyle ilişkilidir. IL-6 hematopoiezis, immun cevap gibi hücre savunma mekanizmalarında ve akut faz reaksiyonlarında merkezi rol oynar (55).

İnflamatuvar moleküllerden biri olan IL-6'nın ana kaynaklarından birinin yağ dokusu olduğu ifade edilmektedir. Çeşitli çalışmalarda IL-6 seviyesinin obez bireylerde yüksek olduğu ve dolaşımdaki seviyesinin yağ hücreleriyle korale olduğu tesbit edilmiştir. Kan dolaşımındaki toplam IL-6'nın % 15-35'inin yağ dokusu kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. Visseral yağ doku explantları subkutan yağ dokudan daha çok IL-6 salgılar. Bunlara rağmen IL-6 obezite ilişkisi tartışmalıdır (56).

4.5.6. Tümör Nekrozis Faktör- α

TNF- α 'nın insanlarda membrana bağlı formu ve serbest formu olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Membrana bağlı formu 233 amino asitten oluşur ve membranda bulunur. Serbest formu ise 77 ve 233. amino asitler arasındaki 157 amino asitlik kısımdan oluşmaktadır (57). Sıçanlarda ise 235 amino asitlik bir proteindir (58).

TNF- α akut inflamasyon esnasında makrofajlar ve monositler tarafından üretilen inflamatuvar sitokindir. TNF- α hücre içi sinyal yollarını etkileyerek apoptozise ve nekrozise neden olur. Aynı zamanda enfeksiyon ve kansere direnmede önemli bir proteindir (59). TNF- α birçok biyolojik fonksiyonu vardır ve mekanizmaları bazen karışıktır. Bu protein bir yandan bazı enfeksiyonlara direnmeyi sağlarken diğer yandan patolojik komplikasyonlara neden olarak birbirine zıt roller gerçekleştirmektedir. TNF- α geni knock out farelerde leishmania direncinin olmadığı görülmüş, dalaklarında, germinal merkezlerinde fonksiyon kayıpları görülmüştür. TNF reseptörü knock out farelerde mikrobial enfeksiyonlara karşı hassasiyet artmıştır ve bakteriyel endotoksinlere inflamatuvar yanıt baskılanmıştır. TNF- α bağışıklığı uyatarak, uykuyu

düzenleyerek, embriyonik gelişimde fonksiyon görerek, tümörlere ve enfeksiyon ajanlarına direnç göstererek vücutta çeşitli roller üstlenmektedir. TNF immun sistemin, doğal öldürücü hücrelerin, makrofajların, platelet ve nötrofillerin aktivasyonunun uyarılması vasıtasıyla enfeksiyona karşı direnç oluşmasına katkı sağlamaktadır (59).

Yağ dokusunun inflamatuvar kemokinlerin ve sitokinlerin birçoğunu ürettiği, obez bireylerde TNF- α konsantrasyonunun yüksek olmasında yağ dokusunun ana faktörlerden birisi olduğu uzun zamandır bilinmektedir (60). Vanesse Van Harmelen ve arkadaşlarının insan subkutan ve omental doku preadipositlerini farklılaştırarak yapmış oldukları hücre kültürü çalışmasında TNF- α miktarının omental dokuda subkutan dokudan daha yüksek seviyede olduğunu tesbit etmişlerdir (61).

4.5.7. Retinol Bağlayıcı Protein 4

İnsanlarda ve sıçanlarda retinol bağlayıcı protein I ve II retinolün hücre içerisinde taşınmasını sağlarken RBP-4 retinolün karaciğerden dokulara taşınmasını sağlamaktadır. RBP-4 retinol ve transtiretin ile kompleks oluşturarak plazmada retinolün taşınmasını sağlar. Bu kompleks şekli retinolün böbreklerden atılmasını engeller. RBP-4 ilk 18'i sinyal peptidi olmak üzere toplam 201 amino asitten oluşmuştur (62, 63, 64, 65).

Obez insanların subkutan ve visseral yağ dokusunda kontrol grubuna göre daha yüksek RBP-4 mRNA ekspresyonunun olduğu tesbit edilmiştir. Visseral obez bireylerde subkutan obez bireylere göre visseral ve subkutan yağ dokularında daha çok RBP-4 ekspresyonu olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca visseral yağ dokusunda subkutan yağ dokusuna göre daha çok RBP-4 ekspresyonu olmaktadır. Visseral ve subkutan yağ hücrelerinin hacmi ile RBP-4 mRNA'sı arasında pozitif korelasyonun bulunduğu ifade edilmektedir (66).

4.6. Diyet ve Obezite:

Yapılan çalışmalarda deneysel obezite oluşturmak için birçok model kullanılmaktadır. Bu modeller şunlardır; çevresel indüklenmiş obezite modeli, yüksek ekspresyon kaynaklı transgenik obezite modelleri (örneğin: CRP Overexpression), gen knock-out kaynaklı obezite modelleri (örneğin: MC4-R deficiency), kimyasal ya da cerrahi manüpilasyonlu obezite modelleri (örneğin: VMH-lesion) (1).

Obezite çalışmalarında kullanılan birçok model insanda görülen obezitenin etiyolojisi ile tam olarak ilişkili değildir. İnsanlarda obezite büyük oranda diyetle ilgilidir. Bu yönü ile rodentlerde diyet ile indüklenmiş obezite modelleri oldukça bilgi vericidir. Özellikle fazla miktarda yağ veya karbohidrat içeren diyet modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek miktarda yağ içeren diyetle oluşturulan obezite insülin direnci ve hiperglisemi ile karakterizedir. Diyetle kullanılan yağın çeşidine bağlı olarak farklı kilo artışı ve adipositede farklılıklar oluşturulabilir. Diyetle kolesterol ilavesi ile hiperkolesterolemik ve atherosklerotik modellerde oluşturulabilir. Yüksek karbohidrat içerikli diyetle ise oluşan modeller aşırı kilo alımı, insülin rezistansı ve yüksek TG seviyeleri ile karakterizedir (17).

4.7. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Ortaklaşmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girme eğilimi olan atom veya moleküller serbest radikal olarak isimlendirilmektedir. Oksijen molekülü insan vücudundaki bütün hücrelere kolayca girebilmekte ve yapısı itibarı ile radikal olamaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince akla serbest oksijen radikalleri diğer bir deyişle reaktif oksijen türleri (ROS) akla gelmektedir (67).

Aerobik organizmaların hücrelerindeki metabolik süreçlerde oksijenin suya indirgenmesi esnasında toksik nitelikte serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Canlı sistemlerdeki serbest radikal kaynakları canlının kendi metabolizması esnasında ortaya çıkabildiği gibi dışarıdan çeşitli yollarla da canlıya girebilmektedir. Serbest radikal türleri lipitler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler gibi moleküllerden elektron alarak kararlı hale gelebilmektedir. Böylece elektron alan moleküllerde oksitlenir (68).

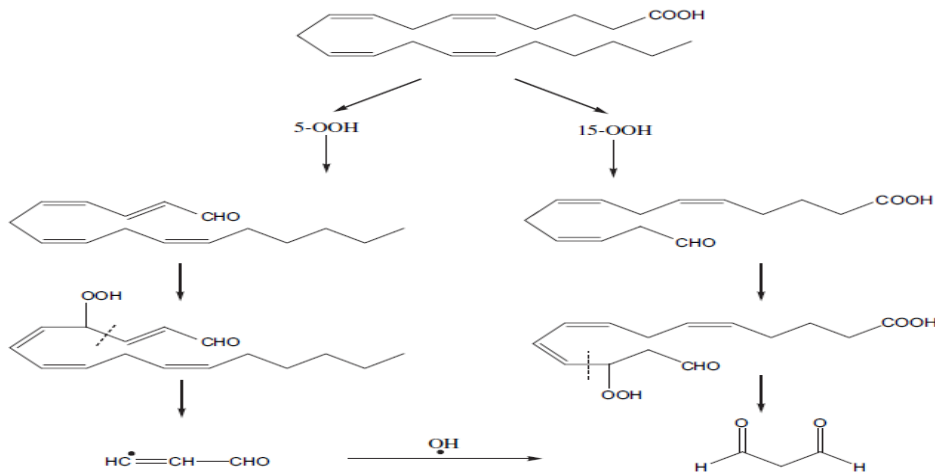
Serbest oksijen radikalleri mikokontriyal solunum, trombosit aktivasyonu, lökosit fagositozu ve prostaglandin sentezi gibi çok önemli süreçlerde rol oynamasına rağmen lipitlere, proteinlere, DNA ya ve karbohidratlara toksik etkileri bulunmaktadır. Bundan dolayı hücrelerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olabilmektedir (69, 70).

4.8. Malondialdehit

Biyolojik örneklerde MDA'nın ana kaynağı, poliansatüre yağ asitlerinden iki yada daha çok metilen çift bağlarının koparıldığı peroksidasyon reaksiyonudur. MDA'nın oluşumu ile ilgili öne çıkan üç hipotez bulunmaktadır. Birinci hipotez metil

linoleatın prostaglandin-like endoperoksite dönüştürülmesiyle MDA öncülleri oluşturulmasıdır.

Diğer iki hipotezin temeli hidroperoksi aldehit oluşturmak üzere ardışık hidroperoksit oluşumu ve yağ asidi zincirinin beta ayrılmasıdır. MDA hidroksi aldehitin beta ayrılması yada son akrolein radikalının bir hidroksil radikali ile reaksiyonundan oluşur (71). Yağ asitlerinden MDA oluşumu Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Yağ asitlerinden MDA oluşumu (Del Rio’dan, 71).

Aynı zamanda MDA hücre içerisinde çeşitli prostaglandinlerin enzimatik süreçleri esnasında oluşmaktadır. Hecker ve Ullrich tromboksan A_2 biyosentezinin yüksek verimle yan ürün olarak MDA ve 12-(S) hydroxi-8,10 (E-E)- heptadecadienoic asit in oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. MDA fizyolojik durumda enolat anyonu formunda ve düşük kimyasal reaktiviteli olarak bulunur. Bu molekül lipidlerin oksidatif yıkımının ve doku hasarının belirticidir (71).

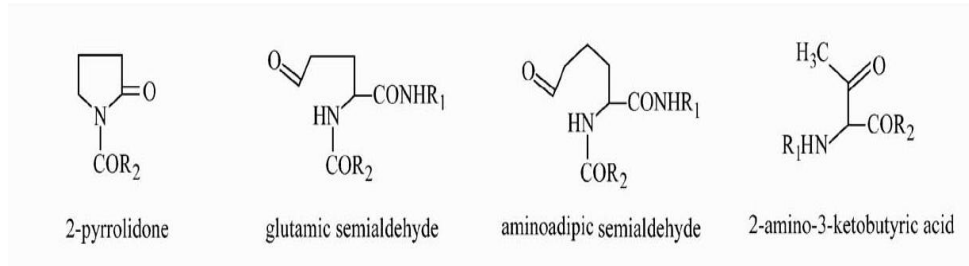
4.9. Protein Karbonil

Süperoksit ($O_2^{\bullet}$), hidroksil ($OH^{\bullet}$), peroksil ($RO_2^{\bullet}$), alkoksil ($RO^{\bullet}$), hidroperoksil ($HO_2^{\bullet}$) gibi reaktif oksijen türleri ve non radikal türler hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloros asit ($HOCl$), ozon (O_3), tek oksijen, peroksinitrit ($ONOO^-$) protein oksidasyonuna neden olur. Proteinler özellikle prolin, arjinin lizin ve treonin yan zincirleri oksitlendiği zaman yan zincirlerinde karbonil grupları (aldehit ve ketonlar) oluşur. Bu kısımlar kimyasal olarak stabildir (72) .

Aynı zamanda protein karbonil türevleri proteinlerin N terminal ucundaki amino asidin alfa ketoaçıl türvleriyle bloklanan peptidin oluşumuna öncülük eden glutamil yan zincirinin oksidasyonu veya alfa amidasyona uğradığı oksidatif reaksiyonu vasıtasıyla üretilebilir (72).

Buna ilaveten karbonil grupları proteinlerin histidin lizin sistein rezidülerinin nükleofilik yan zincirleriyle lipit peroksidasyon ürünü (akrolein, 4 hydroxy 2-nonenal, ve MDA) aldehitlerin yada reaktif karbonil türevlerinin (kotoaminler, ketoaldehitler deoksizonlar) sekonder reaksiyonları sonucu oluşur (72) .

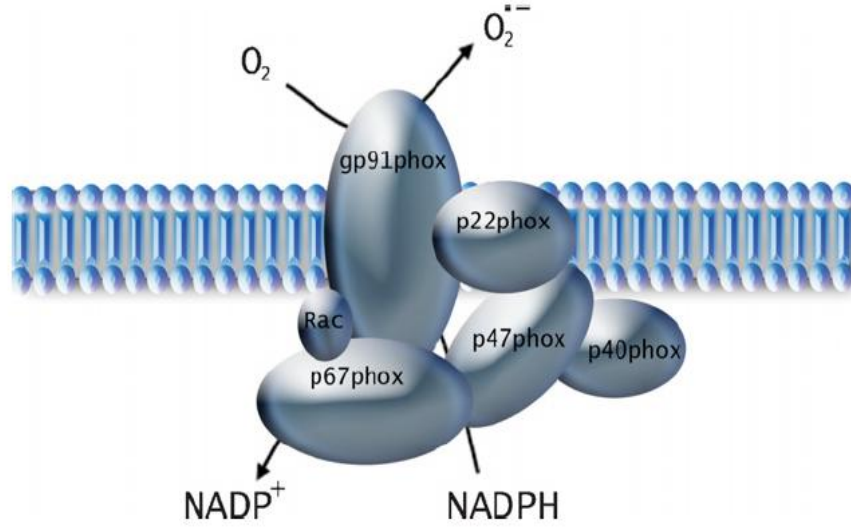
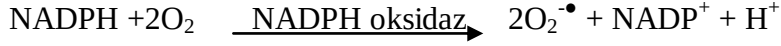
Protein karbonil grubu protein oksidasyonunun güncel olarak kullanılan en yaygın ve en genel belirteçidir. İnsan beyin korteksinde protein karbonil grubunun referans değer aralığı 1.5-6.4 nmol/mg protein'ken plazmadaki protein karbonil aralığı 0.4-1.0 nmol/mg proteindir (72). Amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonu ile üretilen karbonil türleri Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonu ile üretilmiş karbonil türleri (Dalle Donne’den, 72).

4.10. Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz kompleksi ilk olarak fagositlerde tanımlanmıştır. Fagositlerde tanımlanan NADPH oksidaz (Nox 2) 2 tanesi integral membran proteini olan ve toplam 6 alt birimden oluşan bir enzim kompleksidir. Alt birimlerde phagocyte oxidase kelimelerinin baş harfleri kullanılmaktadır. Membranda bulunan alt birimler $\text{gp91}^{\text{phox}}$ ve p22^{phox} dur. Sitoplazmik alt birimleri ise p40^{phox} , p47^{phox} , p67^{phox} ve Rac2 proteinleridir. NADPH oksidaz enziminin Nox 1, Nox 2, Nox 3, Nox 4, Nox5 olmak üzere farklı dokularda 5 izoformu bulunmaktadır (73). NADPH oksidaz moleküler oksijeni süperoksida katalizlemektedir (74). Aktif NADPH oksidaz kompleksinin yapısı Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. Aktif NADPH oksidaz kompleksinin yapısı (Ray'dan, 73).

4.11. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı sistemlerde reaktif oksijen türlerinin düzeylerini düzenleyecek ve bunların oluşturduğu hasarları önleyebilecek birçok savunma mekanizması mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar olarak bilinen bu mekanizmalar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engeller ve reaktif oksijen türlerini toksik olmayan bileşiklere dönüştürür (75). Antioksidan moleküller etkilerini dört yolla gösterirler. Bunların birincisi antioksidanların oksidan molekülleri daha zayıf başka bir moleküle çevirerek etkisizleştirme yoludur. İkincisi antioksidanların oksidan molekülleri kendilerine bağlayarak etkisizleştirme yoludur. Üçüncüsü antioksidanların oksidan moleküllere bir hidrojen aktararak onların aktivitelerini azaltan veya yok ederek etkisizleştirme yoludur. Dördüncüsü ise oksidatif olarak hasar görmüş molekülleri onarma yoludur (76).

Bütün aerobik hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan iki çeşit antioksidan savunma mekanizması mevcuttur (77). Başlıca enzimatik aktivite gösteren antioksidanlar SOD, CAT, GPx, glutatyon redüktaz, glukoz 6 fosfat dehidrojenaz ve glutatyon-s-transferaz'dır (68). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutatyon, NAC, albümin, seruloplazmin, ferritin, transferin, laktoferrin, haptoglobulin, hemoglobin,

miyoglobin, vitamin C, tokoferoller, karotenoidler, flavonoidler, selenyum, bakır, çinko gibi moleküllerdir (68).

4.12. Antioksidan Enzimler

4.12.1. Süperoksit Dismutaz

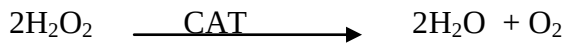
SOD süperoksit serbest radikal anyonunu hidrojen perokside katalizleyen antioksidan enzimdir.



Memelilerde SOD'un 3 izoformu vardır. Bakır-çinko içeren SOD (SOD 1, CuZn-SOD) primer olarak stoplazmada ve nükleer kompartmanda lokalizedir. Manganez içeren SOD (SOD 2, Mn-SOD) mitokondride bulunur. Ekstrasellüler SOD (SOD 3, EC-SOD) ekstrasellüler alanda bulunur ve yapısında Cu-Zn bulunur (78, 79). İnsanlarda ve sıçanlarda SOD 1 153 amino asitten oluşmuş ve 4 amino asiti modifikasyona uğramıştır. SOD 2 ise 198 amino asitten oluşmuş ve 3 amino asiti modifikasyona uğramıştır (80, 81, 82, 83). SOD 3 insanlarda 222 amino asitten oluşmuş ve üç amino asiti modifikasyona uğrarken sıçanlarda ise 229 amino asitten oluşmuş ve bir amino asiti modifikasyona uğramıştır (84, 85). SOD 1 dimerik yapıda, SOD 2 ve SOD 3 ise homotetramerik yapıdadır (79, 86).

4.12.2. Katalaz

CAT homotetramerik yapıda ve yapısında dört tane hem grubu ve dört tane NADPH bulunan ve molekül ağırlığı 244 kDa olan bir enzimdir (87). İnsanlarda ve sıçanlarda CAT polipeptidinde 526 amino asit bulunmaktadır ve insanlarda polipeptid iki amino asitten sıçanlarda ise bir amino asitten modifikasyona uğramıştır (88, 89). Bu hem grubu içeren protein saniyede yaklaşık 10^7 mol H_2O_2 'i serbest radikal oluşturmaksızın H_2O ve O_2 'e katalizlemektedir (87).

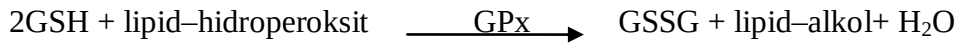


Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. CAT esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğunudur. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde

yüksektir (90). Fizyolojik şartlarda CAT, H₂O₂ konsantrasyonunu kontrol eder. H₂O₂'nin hücrelerde birikimini engeller ve hücreleri oksidatif tehlikelere karşı korur (91).

4.12.3. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz bir enzim ailesinin genel ismidir. Temel biyolojik rolü organizmayı oksidatif hasardan korumaktır. Glutatyon peroksidazın insanlarda tanımlanmış sekiz farklı izoformu (GPx1-8) bulunmaktadır. Glutatyon peroksidazların biyokimyasal fonksiyonu lipid hidroperoksitlerini lipid-alkollere dönüştürmek ve hidrojen peroksitleri suya dönüştürmektir (92).

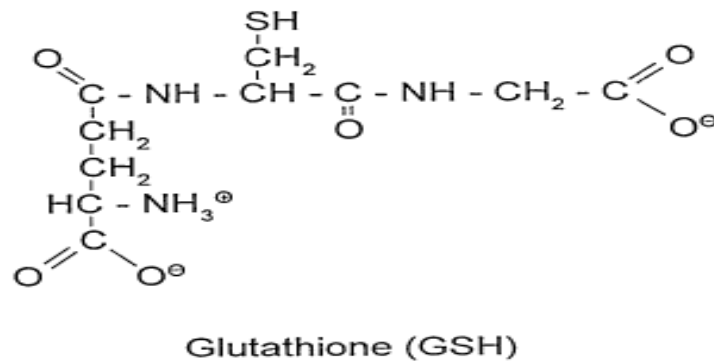


İnsanlarda glutatyon peroksidazın izoformlarından sadece GPx 4 olarak isimlendirilen fosfolipid hidroperoksit GPx lipid hidroperoksitlerini substrat olarak kullanır. Diğer izoformlar H₂O₂'i substrat olarak kullanır (93).

4.13. Enzim Olmayan Antioksidanlar

4.13.1. Glutatyon

Glutatyon sistein ve glutamat arasında alışılmışın dışında gama peptid bağı bulunan glisin, sistein ve glutamat aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir (Şekil 4). Glutatyon reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan oksidatif hasara karşı hücreleri korur.



Şekil 4. Glutatyonun açık formülü (Anderson'dan, 94).

Glutatyondaki gama peptid bağı glutatyonu birçok peptidazların hidrolizinden korumaktadır. Glutasyon prekürsörleri olan glisin ve gamaglutamilsistein den kolaylıkla sentezlenir. Glutasyon ençok memelilerde ve birçok prokaryot hücrelerde bulunur. Glutasyonun okside glutasyon (GSSG) ve redükte glutasyon (GSH) formları bulunmaktadır. Glutasyon hücre içinde NADPH'ı substrat olarak kullanan glutasyon redüktaz sayesinde tiyol formunda (redükte glutasyon halinde) tutulur (94). Sağlıklı hücre ve dokularda total glutasyon havuzunun % 90'ından fazlası GSH formunda % 10'undan azı ise GSSG formundadır. GSSG'nin GSH'a oranının artması oksidatif stresin habercisi olarak kabul edilir (95). Glutasyon aminoasitlerin transportunda koenzim olarak fonksiyon görür. Glutasyon koenzim A ve sistein gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ve proteinlerin tiol gruplarının devamlılığını sürdürmede fonksiyon görür (94).

Glutasyon askorbik asidin devamlılığını sürdürür. Glutasyon toksik bileşiklerle enzimatik veya non enzimatik olarak reaksiyon verir. Glutasyon ROS ile non enzimatik olarak reaksiyon verebilir. Hidrojen peroksit ve diğer peroksitler GPx tarafından detoksifiye edilir (94).

4.13.2. N-asetilsistein

Suda çözünen güçlü bir antioksidandır. Oksidatif stresle ilgili bir çok çalışmada etkili bir antioksidan olarak kullanılmıştır. NAC doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan özellik sergiler. NAC, ROS üzerine süpürücü etkiye sahiptir. NAC'ın serbest tiyol grubu ROS'un elektrofilik gruplarıyla etkileşime girme yeteneğine sahiptir. ROS ile olan bu etkileşim NAC tiyolün ara formuna ve NAC disülfid son ürününün oluşumuna yol açar. Glutasyon öncülü olduğu içinde dokularda glutasyon miktarını artırır. Ayrıca oksidatif stresin uyardığı nükleer faktör kapp B (NF-kB) aracılıklı IL-6 ve TNF- α salgılanmasını baskılar (96).

4.14. Obezite ve Oksidatif Stres

Sağlıklı bir şekilde çalışan organizmalarda oksidan ve antioksidan sistem arasında bir denge bulunmaktadır. Oksidan etki antioksidan etkiden daha baskın olduğu durumda oksidatif stres ortaya çıkarak bu denge bozulmaktadır (97). Obezite ve oksidatif stres üzerine yapılan birçok çalışmada obezitenin sistemik oksidatif stresi artırdığı tesbit

edilmiştir. Van Gaal ve arkadaşları obez ve obez olmayan bireylerde LDL ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL)'nin oksitlenebilirliği ile ilgili bir araştırma yapmıştır. Bu çalışmada obezlerin lipoprotein örneklerinde MDA seviyesinin obez olmayanlara göre daha yüksek (3.13 - 1.89 mmol/L) olduğu tesbit edilmiştir. VLDL ve LDL nin oksitlenebilirliğinin obez bireylerde obez olmayanlara göre % 22'ye varan seviyelerde daha hızlı olduğu tesbit edilmiştir. LDL oksidasyonunun gecikme süresi obez bireylerde obez olmayanlara göre daha kısa olduğu tesbit edilmiştir. Bunlara ilaveten obezlerde plazma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) seviyesinin daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir (98) .

Ozata ve arkadaşları sağlıklı obez ve obez olmayan erkeklerde oksidatif stresle ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada kan lipitleri, TBARS, ve eritrositlerde antioksidan kapasite parametrelerine bakılmıştır. Obez grupta obez olmayan gruptan daha yüksek seviyede TBARS tesbit edilmiştir. Ayrıca obez grupta SOD ve GPx enzim aktivitesi daha düşük olduğu tesbit edilmiştir (98).

Olusi ve arkadaşları 300 kişilik araştırma örneklemini vücut kitle indeksi (BMI)'e göre 6 gruba (19-25, 30-34, 35-39, 40-44, 45-49, 50 ve üzeri) ayırarak bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada BMI 40 kg/m² den daha büyük olan gruplarda BMI 19-25 kg/m² arasında olan gruba göre MDA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. MDA değeri BMI artışına göre artış göstermiştir. CuZn-SOD ve GPx aktivitesi BMI 40 kg/m²'yi aşmış kişilerde obez olmayan bireylere göre daha düşük bulunmuştur (98).

Keaney ve arkadaşları erkek ve kadınlar üzerinde yapmış olduğu çalışmada BMI erkelerde 25 Kg/m² kadınlarda 27 Kg/m² den büyük olanlarda serum izoprostan seviyesinin BMI ile lineer olarak yükseldiğini tesbit etmişlerdir (98).

Çalışmamızın amacı obezitede subkutan, visseral ve perirenal lokal yağ dokularında oluşan oksidan antioksidan denge değişikliği ile bu dokulardan salgılanan adipokin miktarları arasındaki ilişkiyi belirlemek ve antioksidan kullanımının bu ilişki üzerine nasıl bir etki yaptığını ortaya koymaktır.

Bu amaca ulaşmak için visseral, perirenal ve subkutan bölgelerden alınan yağ dokularında glutatyon, MDA, protein karbonil grubu, antioksidan enzimlerden SOD,

CAT ve GPx ölçüldü. Serum örneklerinde leptin, adiponektin, apelin, rezistin, RBP-4, glukoz, TG, IL-6, TNF- α , insülin, TAK, TOK ölçümleri yapıldı. Yukarda belirtilen bölgelerden alınan yağ doku örneklerinden RT-PCR tekniği ile leptin, adiponektin, rezistin, apelin, NADPH oksidaz, proteinlerin mRNA analizleri yapıldı. Güçlü bir antioksidan olan NAC kullanımı ile antioksidanların yağ dokusundaki oksidatif strese ve adipokin salgılanmasına etkisi incelenerek antioksidan kullanımının obeziteye bağlı komplikasyonların azaltılmasındaki etkinliği irdelendi.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.Gereçler

5.1.1. Kullanılan Sıçanlar

Çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilen Sprague-Dawley ırkı 18 adet erkek 6-8 haftalık 150-200 g sıçanlar kullanıldı.

5.1.2. Kullanılan Cihazlar Ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 2’de listelenmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Kullanılan 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	Nüve NM110
Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) pleyti	Bioscience
Real time PCR cihazı	Roch light cycler 480 II
Santrifüj	Heraus
Magnetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet 10-100 µL	Ependorf research
Otomatik pipet 100-1000 µL	Ependorf research
Otomatik pipet 1-5 mL	Ependorf research
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 171
pH metre	Hana instrument
Homojenizatör	Ultra-turrax T 25
Saf su cihazı	Aquatron 4AD
Hassas analitik terazi	Metler toledo AB204-S
Deney tüpleri	SH GLASS
Spektrofotometre	Beckman-Coulter
Kuartz küvet	Agilent Technologies
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R centrifuge
Steril DNAaz RNAaz free pipet uçları	Greiner
Derin dondurucu	Forma -86 C
ELISA yıkayıcısı	Biotek
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Mikropleyt okuyucu	Molecular devices (VERSA max)
Santrifüj	Beckman coulter
Thermocycler	Micromax
Homojenizatör	IKA-ultra turrax T 18
UV-Floresan dedektörlü, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Agilent 1100

5.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları hakkında bilgi Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici Firma
Agaroz	Serva
Etidyum bromür	Sigma
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Lancaster
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Carlo erba
Dietil pirokarbonat (DEPC)	Sigma
Ditiyonitrobenzoat (DTNB)	Sigma
Ksantin	Sigma
Etilen daimin tetra asetik asit (EDTA)	Carlo erbo reagent
Nitro blue tetrazolium (NBT)	Sigma
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
Amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
Bakır II klorür (CuCl ₂)	Lancaster
Ksantin oksidaz	Sigma
Etanol	Sigma
Triton X-100	Merck
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	Merck
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Merck
Tris-HCl	Appllichem
Coomassie brillant blue G-250	Serva
Hidroklorik asit (HCl)	Merck % 37
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma
Potasyum hidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma
1,1,3,3-tetrametoksipropan	Sigma
Kloroform	Merck
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Merck
N- Acetyl cysteine (NAC)	Amresco
Primerler (leptin, rezistin, apelin, adiponectin, NADPH oksidaz, β-aktin)	Alpha DNA
Sıçan yemi	Research diet
Aprotinin	Phonex
Glutatyon standartı	Acros organics
250*4,6 Hypersil gold 5µm kolon	Thermo
İzopropil alkol	Sigma
SOD standartı	Sigma
GPx standartı	Sigma

5.1.4. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firmaları hakkında bilgi Tablo 4’de sunulmuştur.

Tablo 4. Kullanılan kitler ve üretici firmalar

Kullanılan kitler	Üretici firmalar
Leptin kiti (Mouse and rat leptin ELISA)	Biovendor R&D Products
Adiponektin	Millipore Corporation
Resistin (Rat resistin ELISA)	Biovendor R&D Products
Apelin (Apelin 12 human rat mouse)	Phoenix pharmaceuticals, Inc
İnsülin ELISA kiti	DRG
GPx spektrofotometrik kit	Cayman Chemical Company
RBP ELISA kiti	Sun Red
IL-6 ELISA kiti	eBioscience
TNF- α ELISA kiti	eBioscience
TRIzol RNA izolasyon kiti	Invitrogen
cDNA sentez kiti	Roche
DNA Master SYBR Green I	Roche

5.2. Yöntemler

Yapılan deneylerin tümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2010/39 protokol no’lu etik kurulu başvurusunun onayı ile yapıldı.

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilip yine aynı yerde deneyler için 12 saatlik karanlık-aydınlık ortam sağlanarak barındırılıp beslendi. Çalışmada Sprague-Dawley ırkı 18 adet erkek 6-8 haftalık 150-200 gr sıçanlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm yemler (D12450B ve D12451) *Research Diyet*’ten satın alındı.

5.2.1. Deney Grupları

Sıçanlar standart sıçan yemi (D12450B) ile alınan kalorinin % 70’ini karbohidrattan, % 20’sini proteinden, % 10’unu yağdan sağlayarak 15 gün süreyle

beslendi. Yem ve su ad libitum olarak verildi. On beş gün sonra sıçanlar rastgele her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı ve tartım işlemleri gerçekleştirildi.

I. Grup: Kontrol grubu, kalorisinin % 70 karbohidrat, % 20 protein, % 10 yağ dan oluşan standart sıçan yemi ile,

II. Grup: Obez grup, kalorisinin % 45 yağ, % 35 karbohidrat, % 20 Protein den oluşan yüksek kalorili yem (D12451) ile,

III. Grup: Antioksidan grup, kalorisinin % 45 yağ, % 35 karbohidrat, % 20 protein den oluşan yüksek kalorili yem ve içme suyuna karıştırılan 2 g/L NAC ile beslendi. Tüm gruplara su ve yem ad libitum olarak verildi.

Sıçanların kullanmış olduğu D12450B ve D12451 yemlerin içeriği Tablo 5 ve Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo 5. Standart sıçan yeminin içeriği

D12540B kodlu standart sıçan yemi içeriği	% g	% K. kalori
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam kilo kalori / gr	3.83	100
Bileşenler	g	K. kalori
Kazein	200	80
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	315	1260
Maltodeksrin 10	35	140
Sükroz	350	1400
Selüloz	50	0
Soya yağı	25	225
Hayvansal yağ	20	180
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (H ₂ O’ lu)	16.5	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
Sarı gıda boyası	0.05	0
TOPLAM	1055.05	40.57

Tablo 6. Yüksek kalorili sıçan yeminin içeriği

D12541 kodlu yüksek kalorili sıçan yemi içeriği	% g	% K. kalori
Protein	24	20
Karbohidrat	41	35
Yağ	24	45
Toplam kilo kalori / gr	4.73	100
Bileşenler	g	K. kalori
Kazein	200	800
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	72.8	291
Maltodeksrin 10	100	400
Sükroz	172.8	691
Selüloz	50	0
Soya yağı	25	225
Hayvansal yağ	177.5	1598
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (H ₂ O' lu)	16	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
Sarı gıda boyası	0.05	0
TOPLAM	858.15	40.57

5.2.2. Deney Planı

Toplam 85 günlük beslenme periyodunun sonunda, sıçanların tartımı gerçekleştirildi ve anestezi altında aortadan kanları alınarak sakrifiye edildi. Kanların santrifüjlenmesiyle elde edilen serumların bir kısmına, her bir ml için 0.6 TUI aprotinin ilave edildi. Diğer serumlarla beraber analiz sürelerine kadar -80 °C de saklandı. Sıçanların subkutan (deri altı), retroperitoneal (visseral) ve perirenal (böbrek

çevresindeki) yağ dokusunun bir kısmı çıkarılıp kuru CO₂ de donduruldu ve hemen ependorflara konarak ölçüm yapılana kadar -80 °C saklandı.

5.2.3. Yağ Dokusunda Antioksidan Enzim Ölçümleri

5.2.3.1. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in (99) geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek oluşturduğu mor renkli formazan molekül renginin 560 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Homojenizasyon Aşaması: Yağ dokusu buz aküsü üzerinde kesilerek hassas terazide yaklaşık 150 mg tartıldı. Doku buz üzerinde bekleyen 2 mL soğuk homojenizasyon tamponuna (500 µL/L triton x 100, 50 mM Tris –HCl içeren pH: 7.4) konuldu. Dokular soğuk ortamda 10 saniye (sn) süre ile homojenizatörle homojenize edildi. Homojenize doku 4 °C'de, 3 000 rpm'de, 10 dakika (dk) santrifüj edildi. En üsteki yağ tabakası uzaklaştırılıp altındaki süpernatant alındı. 0.8 ml Süpernatant üzerine 400 µl etanol kloroform karışımı (etanol : kloroform oranı 2 : 3) konuldu. Karışım vorteksenerek 4 °C'de 10 000 g'de 30 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant Tablo 7'de ifade edildiği şekilde ve miktarda kullanıldı.

Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1) SOD reaktif karışımı: 3.65 mg ksantin, 8.93 mg etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), 4.9 mg NBT, 1.01 g Na₂CO₃, 12 mg sığır serum albümin (BSA) tartılarak hacmi 196 mL'ye tamamlandı.

2) 2 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi: 2.64 g (NH₄)₂SO₄ 10 mL saf suda çözöldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.

3) 0,8 mM CuCl₂ çözeltisi: 5.37 g CuCl₂ alındı ve 50 mL saf suda çözöldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

4) 167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi: 3.3 U/ mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL' ye amonyum sülfat çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

Standartların Hazırlanışı ve Örneklerin Çalışılması: Sigma tarafından üretilen SOD standartından 5, 4, 3, 2.7, 2.35, 2, 1.7, 1.35, 1, 0.75 U/mL' lik SOD standartları ve kör hazırlandı. SOD standartları homojenizasyonda kullanılan pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl çözeltisi ile dilue edilerek hazırlandı. Standart ve köre etanol/kloroform aşaması uygulanmadı. Numuneler 2 kat dilue edildi. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaktifler Tablo 7'ye göre pipetlendi.

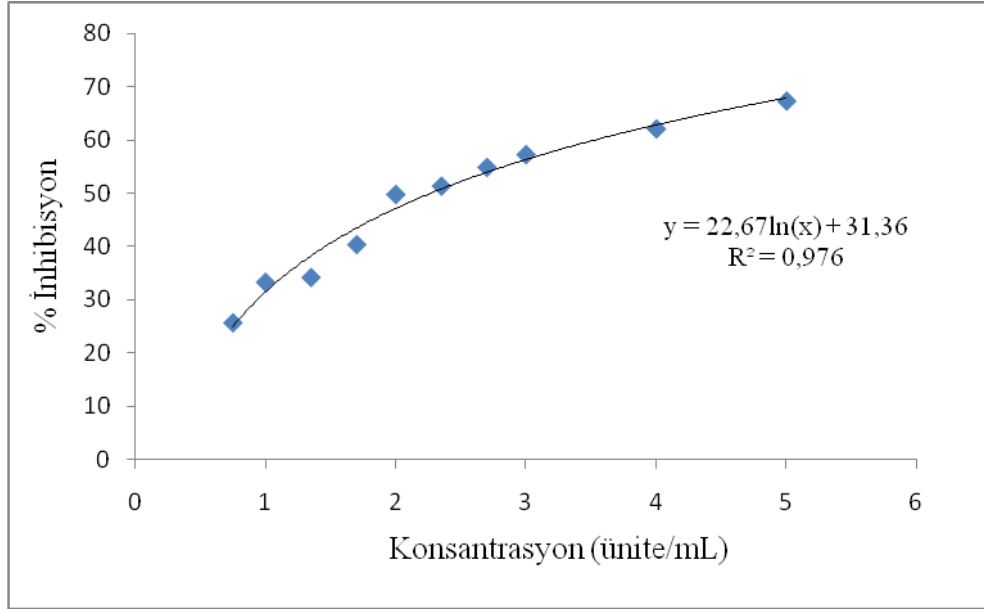
Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı

Çözeltiler	Hacim (mL)
Numune (standart, kör, örnek)	0.25
SOD reaksiyon karışımı	1.25
Ksantin oksidaz	0.025
25 °C 20 dakika karanlıkta inkübasyon	
CuCl ₂	0.5
560 nm de spektrofotometrik ölçüm	

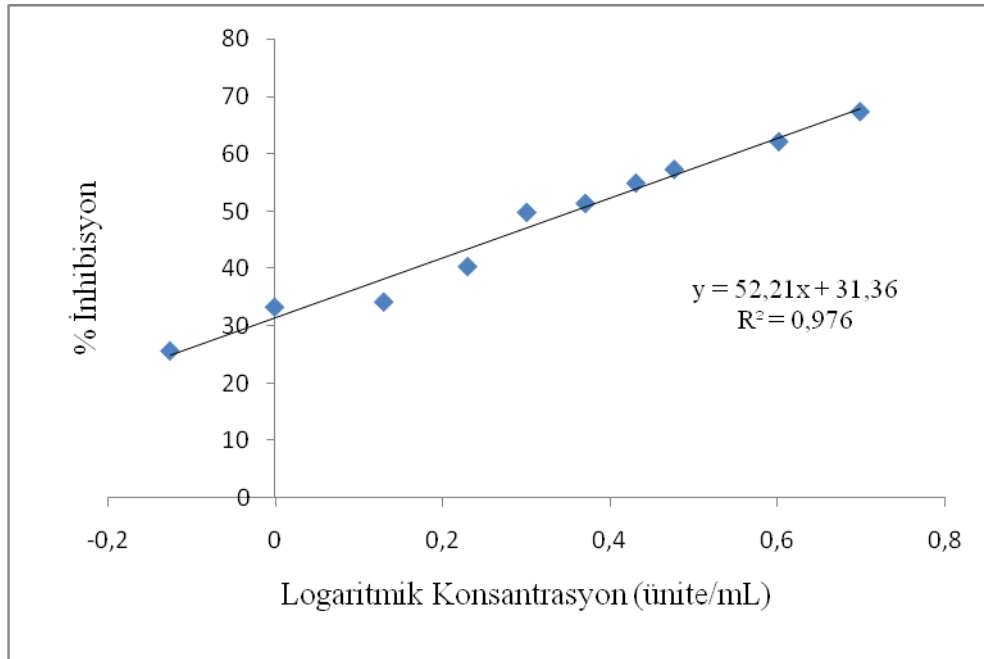
% inhibisyon eşitlik 1 kullanılarak hesaplandı.

$$\% inhibisyon = \frac{(Absorbans\ kör - Absorbans\ numune)}{Absorbans\ kör} \times 100 \quad (1)$$

% inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonlar belirlenerek Şekil 5'deki standart grafiği çizildi. Standart SOD aktivitelerinin logaritması alınarak Şekil 5'deki standart grafiği Şekil 6'daki lineer standart grafiğine dönüştürüldü. Numunelerin absorbansları kullanılarak numunelerin % inhibisyonları eşitlik 1 kullanılarak bulundu. Standart grafiğindeki denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen logaritmik SOD aktiviteleri bulundu. Logaritmik SOD aktivitelerinin antilogları alınarak SOD aktiviteleri bulundu. Bulunan bu SOD aktiviteleri protein miktarına bölünerek sonuçlar U/g protein olarak hesaplandı. Logaritmik SOD standart grafiği Şekil 5'de ve Lineer SOD standart grafiği Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 5. Logaritmik SOD standart grafiği



Şekil 6. Lineer SOD standart grafiği

5.2.3.2. Katalaz Aktivite Tayini

Hidrojen peroksidin oksijen ve suya hidrolizini katalizleyen katalaz aktivitesinin tayininde Aebi (100) metodu modifiye edilerek kullanıldı. Bu metodun esası, H_2O_2 'nin CAT tarafından parçalanması sonucu 240 nm'deki absorbans düşüşüne dayanmaktadır.

Homojenizasyon Aşaması: Homojenizasyon SOD ölçümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Homojenize doku 4 °C’de, 3 000 rpm’de, 10 dk santrifüj edildi. En üsteki yağ tabakası uzaklaştırılıp altındaki süpernatant alındı. 1 mL Süpernatant üzerine 300 µl kloroform konuldu. Karışım vortekslenerek 4 °C’de, 10 000 g’de 15 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant kullanıldı.

Katalaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1) 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.00): 3.405 g KH_2PO_4 ve 4.45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 500’er mL saf suda çözüldüler. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1.5 oranında karıştırıldı ve pH’sı 7.0’a ayarlandı.

2) % 0,216 lık hidrojen peroksit (H_2O_2): 0.36 mL % 30’luk H_2O_2 alınarak fosfat tamponu ile 50 mL’ ye tamamlandı. Günlük hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Doku homojenatları seyreltilmeden Tablo 8’de belirtildiği gibi pipetleme yapıldı.

Tablo 8. Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.25	-
Numune	0.50	0.50
H_2O_2	-	0.25

Kuartz küvete hidrojen peroksit ilave edilir edilmez 30 sn boyunca 10 sn aralıklarla 240 nm’deki absorbanstaki düşüş izlendi. Absorbanstaki düşüş 30 sn de 0.03 den az 0.2 den fazla olmamasına dikkat edildi. Katalaz aktivitesinde birim olarak birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 sn’lik zaman aralığı için aşağıdaki eşitlik 2’den yararlanılarak aktivite hesaplandı.

A1= Başlangıç absorbanı

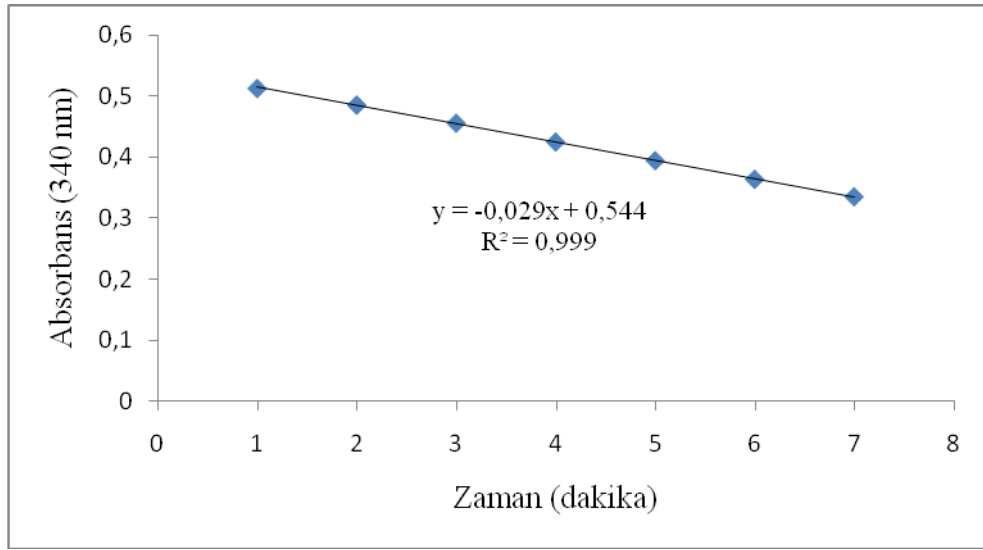
A2= 10 sn sonraki absorbanı

$$k = (2.3/10) \times \log (A1/A2) \text{ sn}^{-1} \quad (2)$$

Yukardaki denkleme göre bulunan k değerleri yağ dokularındaki protein konsantrasyonuna bölünerek gram protein başına katalaz aktivitesi (k/g protein) hesaplandı.

5.2.3.3. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Dokuda GPx ölçümünde Cayman firmasının 703102 nolu GPx spektrofotometrik kit kullanılmıştır. Dokuda GPx ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Elde edilen GPx kontrol grafiği Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. GPx kontrol grafiği

5.2.4. Glutatyon Ölçümü

Antioksidan bir molekül olan glutatyonun ölçümü Solange Cristina Garcia (101) ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) metodunun modifiye edilmesi ile yapılmıştır.

Homojenizasyon Aşaması: Yaklaşık 250 mg yağ dokusu 1.5 mL homojenizasyon tamponu (500 mL lik hacim içerisinde 4.005 g NaCl, 0.1 g KCl, 0.89 g Na₂HPO₄•2H₂O, 0.135 g KH₂PO₄ ve 750 µL/L triton x-100 içeren tampon, pH: 7.4) ile homojenize edildi. Homojenat 3 000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Yağ tabakası altındaki süpernatandan 1 000 µL alınıp üzerine 300 µL kloroform ilave edildi. Karışım vortekslenerek 10 000 g de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatan alınarak derivatizasyon işlemine tabi tutuldu.

HPLC’de Kullanılan Mobil Faz Çözeltilerinin Hazırlanması:

1) 25 mM KH₂PO₄ pH: 3.8: 6.804 g KH₂PO₄ tartıldı 1.5 L saf suda çözüldü. HCl asit ile pH: 3.8’e ayarlandı ve son hacim 2 L ye tamamlandı.

2) Saf metanol

Derivatizasyonda ve Numunelerin Ön İşlemlerinde Kullanılan Çözeltiler:

1) % 15 Trikloroasetik asit (TCA): 1.5 g TCA tartıldı ve hacmi saf su ile 10 mL ye tamamlandı.

2) 0,5 M Tris HCl pH: 8.9: 7.88 g Tris HCl tartılıp bir miktar saf suda çözüldü. pH: 8.9 ayarlandı ve son hacmi 100 mLye tamamlandı.

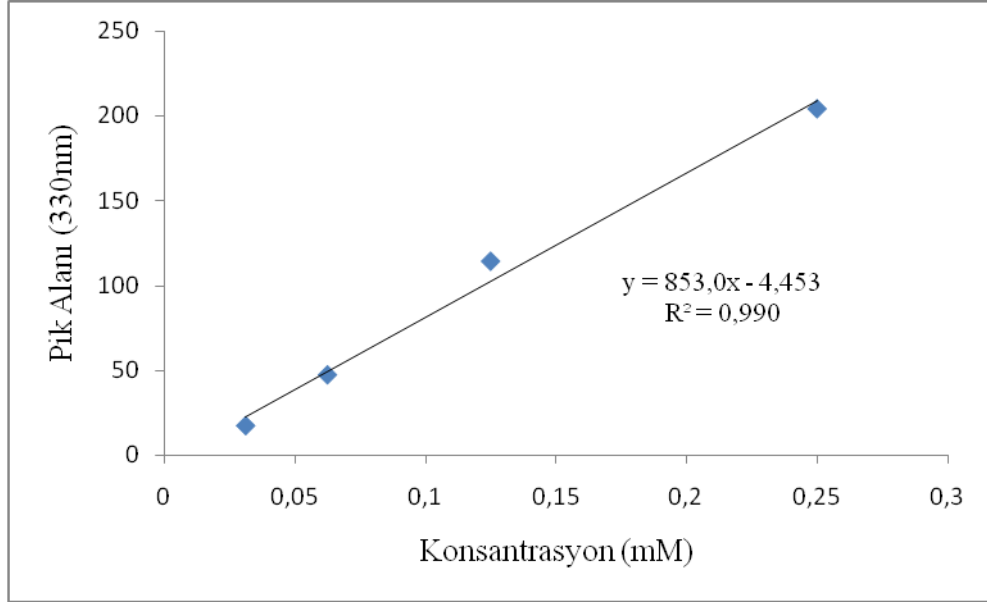
3) 0,5 M K₂HPO₄ pH: 8 ve içerisinde 10mM ditiyonitrobenzoat (DTNB) içeren çözelti: 11.411g K₂HPO₄.3H₂O tartılıp bir miktar saf suda çözüldü. pH: 8’e ayarlandı. 0.396 g DTNB tartılarak çözeltiye ilave edildi. Son hacmi saf suyla 100 mL’ye tamamlandı.

4) 7 M H₃PO₄: 4.72 mL % 85 H₃PO₄’den alınıp saf suyla hacmi 10 mL’ye tamamlandı.

Derivatizasyon Aşaması: 240 µL süpernatant alınıp üzerine 100 µL % 15 TCA ilave edildi ve 1 dk vortekslendi. Ardından numune 13 000 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası numunenin süpernatantından temiz bir tüpe 130 µL alındı ve üzerine 500 µL 0.5 M Tris HCl pH: 8.9 ve 350 µL 0.5 M K₂HPO₄ pH: 8 (10 mM DTNB içeren) çözelti ilave edildi. Hafifçe vortekslenip buz banyosunda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 µL 7 M H₃PO₄ ilave edilip 3 000 g de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant 0.22 µm lik filitreden geçirilerek HPLC sistemine verildi.

Glutasyon Standartının Hazırlanışı: Acros organics tarafından üretilen GSH standartından 15.3 mg tartıldı ve 2.5 mL homojenizasyon tamponunda çözülerek 20 mM lık stok standart hazırlandı. Bu standartlardan çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mM’lık standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlara numunelere uygulanan derivatizasyon işlemi uygulandı.

Örneklerin ve Standartların HPLC’de Çalışılması: Örnekler UV dedektörde 330 nm de 250*4,6 Hypersil gold 5µm kolonda 25 °C sıcaklıkta, 25 mM KH₂PO₄, pH: 3.8 ve Saf metanol ile oluşturulan mobil fazın gradient şekilde oluşan akışıyla 30 dk boyunca çalışıldı. Sisteme 50 µL örnek enjekte edildi. Standartlar yardımıyla örneklerdeki glutasyon miktarı hesap edildi. Dokudaki protein miktarına bölünerek sonuçlar g protein başına mM GSH olarak verildi. Glutasyon standart grafiği Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. Glutasyon standart grafiği

5.2.5. Doku MDA Ölçümü

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemi (102) modifiye edilerek yapıldı. Bu metodun esası, MDA’ nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu molekülün renginin 532 nm’deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Homojenizasyon Aşaması: Yağ dokusunun yaklaşık 150 mg’lık kısmı 2 mL soğuk homojenizasyon çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3 000 rpm’de 10 dk santrifüjlendikten sonra tüpün üst kısmında toplanan yağ tabakası uzaklaştırılarak yağ tabakası altındaki süpernatandan 0,8 ml kısmı temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Aktarılan bu tüp içerisine 400 µl etanol kloroform karışımı (sırasıyla 3:2 oranında) ilave edildi. Elde edilen çözelti vorteksenerek 4 °C 15 000 g de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpte oluşan 3 fazdan en üsteki süpernatant fazı ile en alttaki organik faz temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Aktarılan bu çözelti vorteksenerek kullanıldı.

Malondialdehit Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1) Doku homojenizasyon tamponu: 1.725 g KCl hassas terazide tartıldı ve bir miktar saf suda çözüldü. Oluşan çözeltinin üzerine 0.15 mL Triton X-100 eklendi. 1.5 mg bütillenmiş hidroksitolüen (BHT) 15 mL metanolda çözülerek çözeltiye ilave edildi. Çözeltinin son hacmi saf su ile 150 ml ye tamamlanarak 10 dk azot gazından geçirildi.

2) % 1'lik H_3PO_4 çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL % 85'lik H_3PO_4 alındı ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

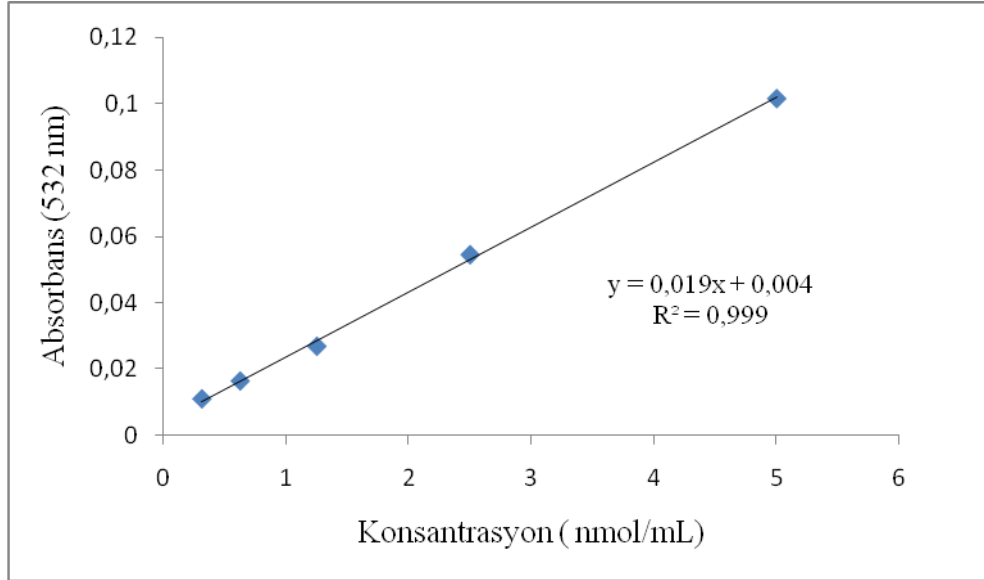
3) Tiyoarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit ilave edilerek magnetik bar yardımıyla karıştırılıp çözüldü.

4) Standart çözeltiler: 82.5 μ L 1,1,3,3 tetrametoksiopropan 0.01 M 50 ml HCl çözeltisine ilave edildi. Çözelti 50 °C' de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hazırladığımız ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.3125 nmol/mL'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: MDA ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 9'a göre pipetlenmiştir. Numune sonuçları standart grafiği kullanılarak hesap edilmiştir ve MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verilmiştir. MDA standart grafiği Şekil 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. MDA ölçümü için reaksiyon karışımı ve yapılan uygulamalar

Çözelti	Yapılan İşlem	Miktar (mL)
Numune (kör, standart, numune)	-	0.5
% 1'lik H_3PO_4	-	3
TBA	-	1
	Vorteks	
	100° C 45 dk inkübasyon	
	4 000 rpm de 10 dk santrifüj	
	300 μ L pleyte yükleme	
	532 nm de okuma	



Şekil 9. MDA standart grafiği

5.2.6. Protein Karbonil Ölçümü

Oksidatif stresin biyomarkırlarından biri olan protein karbonilin ölçümü Griffiths tarafından geliştirilmiş olan HPLC metodunun modifiye şekli ile yapılmıştır (103).

Homojenizasyon Aşaması: Yaklaşık 250 mg yağ dokusu 1.5 mL homojenizasyon tamponu (500 mL lik hacim içerisinde 4.005 g NaCl, 0.1 g KCl, 0.89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.135 g KH_2PO_4 ve 750 $\mu\text{L/L}$ triton x-100 içeren tampon, pH: 7.4) ile homojenize edildi. Homojenat 3 000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Yağ tabakası altındaki süpernatandan 1 000 μL alınıp üzerine 300 μL kloroform ilave edildi. Karışım vortekslenerek 10 000 g de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant kullanıldı.

Protein Karbonil Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

- 1) **20 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin ve %10 trifloroasetik asit içeren çözelti (derivatizasyon çözeltisi):** 5 mL asetik asite bir miktar saf suya ilave edilip 198.14 mg 2,4 dinitrofenilhidrazin çözüldü. Son hacim saf suyla 50 mL'ye tamamlandı
- 2) **% 10 trifloroasetik asit içeren (derivatizasyon blenk çözeltisi):** 5 mL trifloroasetik asit alınarak hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamladı.
- 3) **2 M tris baz (nötralizasyon çözeltisi):** 12.11 g Tris tartılıp son hacmi 50 mL'ye saf suyla tamamlanarak çözüldü.

4) % 12 lik sodyum dodesil sülfat (SDS): 6 g SDS tartılarak son hacmi saf suyla 50 mL'ye tamamlandı ve çözüldü.

5) 200 mM pH: 6.5 Sodyum fosfat tamponu % 1 SDS içeren (mobil faz): 56.78 g Na₂HPO₄ tartıldı. Bir miktar HPLC saflığında saf suda çözüldü. 20 g SDS ilave edilerek SDS'ninde çözülmesi sağlandı. pH: 6.5 olarak ayarlanıp son hacmi 2 litreye tamamlandı.

Derivatizasyon Aşaması: Derivatizasyon işlemleri Tablo 10'da belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 10. Protein karbonil ölçümü için derivatizasyon işlemleri

Reaktifler ve yapılan işlem	Derivatizasyon örneği	Derivatizasyon körü
Örnek	200 µL	200 µL
% 12 lik SDS	200 µL	200 µL
Vorteks	Var	Var
Derivatizasyon çözeltisi	400 µL	-
Derivatizasyon blenk çözeltisi	-	400 µL
Vorteks	Var	Var
Oda ısısında inkübasyon	10 dk	10 dk
Nötralizasyon çözeltisi	300 µL	300 µL
Vorteks	Var	Var

Yukarda tabloda gösterildiği gibi hazırlanan numuneler 50 µL olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. HPLC sisteminde mobil fazın akış hızı dakikada 0.8 mL'ye, sıcaklık 25°C'ye ayarlanıp Tosoh Bioscience markalı TSK-GEL QC-PAK GFC 200, 7.8 mm iç çaplı 15 cm uzunlukta kolon kullanılarak 276 nm ve 360 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda okuma yapılarak çalışma yapılmıştır. Hesaplama aşağıdaki eşitlik 3 kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar mol karbonil/mol protein olarak verilmiştir.

$$\text{protein karbonil} = \frac{50\,000 \times 360 \text{ nm deki area}}{22\,000 \times (270 \text{ nm areası} - (360 \text{ nm area}' s ı \times 0,4))} \text{ mol karbonil/mol protein (3)}$$

5.2.7. Serumda Total Oksidan-Antioksidan Kapasite Ölçümü

Sıçan serumlarında total oksidan ve antioksidan kapasite ölçümleri rel assay diagnostics firmasının kitleri kullanılarak kit protokolüne göre yapılmıştır. TOK ve TAK değerleri kullanılarak eşitlik 4'e göre oksidatif stres indeksi (OSİ) değerleri elde edilmiştir.

$$\text{OSİ (arbitrary unit)} = [(\text{TOK, } \mu\text{mol/L}) / (\text{TAK, } \mu\text{mol Trolox equivalent/L}) \times 100] \quad (4)$$

OSİ sonucu arbitrary unit (prosedüre göre tanımlanmış birim, deneysel, keyfi, değişken birim) olarak ifade edildi.

5.2.8. Protein Tayini

Dokulardaki protein konsantrasyonu modifiye Bradford yöntemine (104) göre yapıldı. Yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek mavi renk oluşturması esasına dayanır.

Protein Tayininde Kullanılan Çözeltilerin hazırlanması:

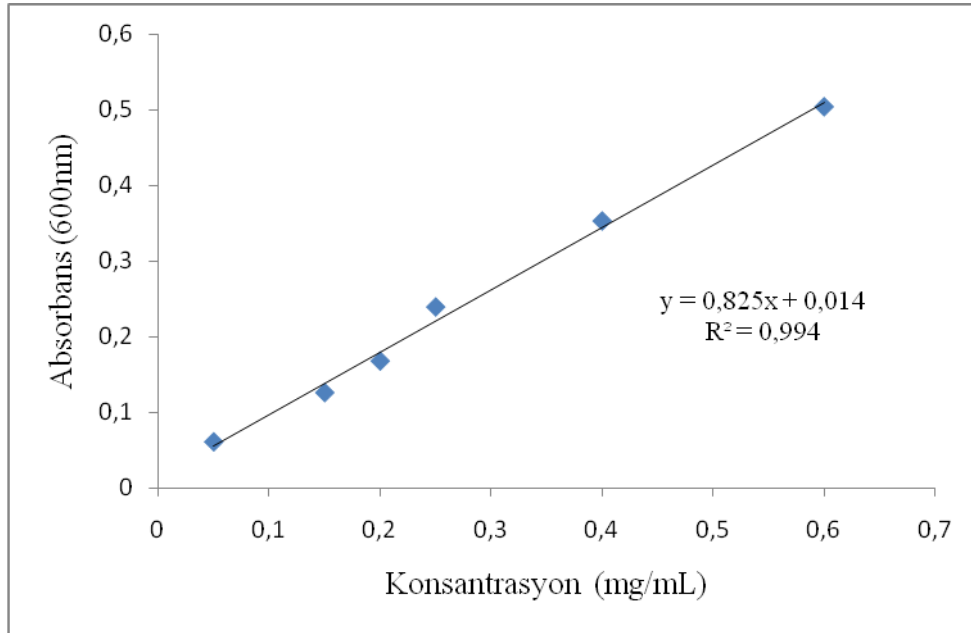
1) Bradford reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 5 mL % 95'lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 10 mL % 85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2) % 20'lik HCl çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 27.03 mL % 37'lik HCl'den alındı son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Kullanılan cam malzemelerdeki olabilecek protein kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi olarak kullanıldı.

3) Standart çözeltiler: Standartlar BSA'dan hazırlandı. 20 mg BSA bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 20 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden SOD hesaplamasında kullanmak için protein tayin standartları 0.6, 0.4, 0.25, 0.2, 0.15, 0.05 mg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Katalaz hesaplamasında kullanmak için protein tayin standartları 0.4, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05 mg/mL konsantrasyonlarında standartlar ve kör hazırlandı. MDA hesaplamasında kullanmak için protein tayin standartları 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/mL konsantrasyonlarında standartlar ve kör hazırlandı. GSH hesaplamasında kullanmak için protein tayin

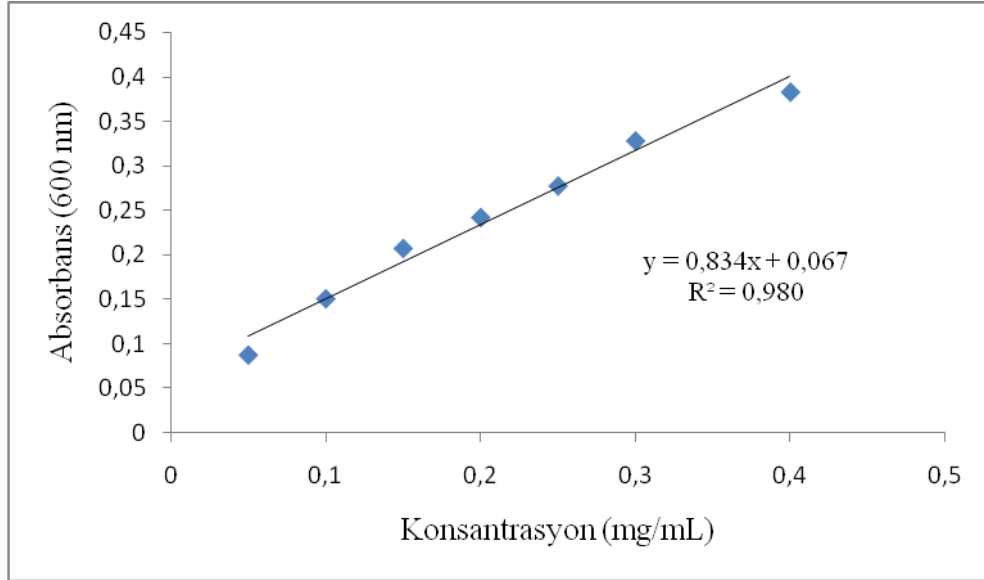
standartları 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 mg/mL konsantrasyonlarında standartlar ve kör hazırlandı.

SOD aktivitesinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 µL Bradford Reaktifi ve 10 µL homojenat tamponu (pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl) ile 2 kat seyreltilmiş numune alındı. Bu miktarlar pleyte yüklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Dilisyon katsayısı ile çarpılıp konsantrasyonlar belirlendi. SOD aktivite hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 10'da gösterilmiştir.



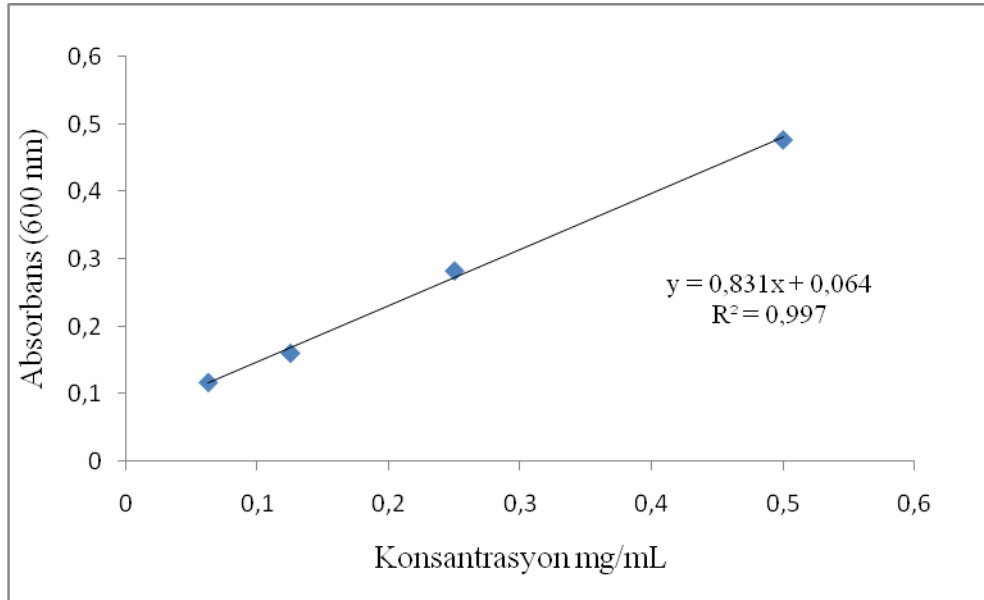
Şekil 10. Protein standart grafiği (SOD için)

CAT aktivitesinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 µL Bradford Reaktifi ve 10 µL numune alındı. Bu miktarlar pleyte yüklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. CAT aktivite hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 11'de gösterilmiştir.



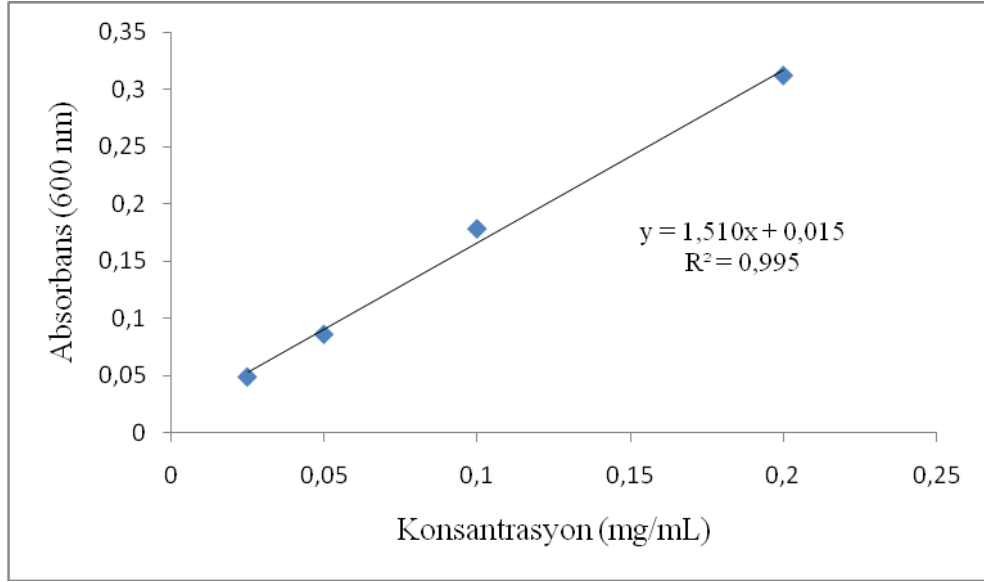
Şekil 11. Protein standart grafiği (CAT için)

GSH düzeyinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 μ L Bradford reaktifi ve 10 μ L numune alındı. Bu miktarlar pleyte yüklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Spektrofotometrede 600 nm’de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. GSH hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Protein standart grafiği (GSH için)

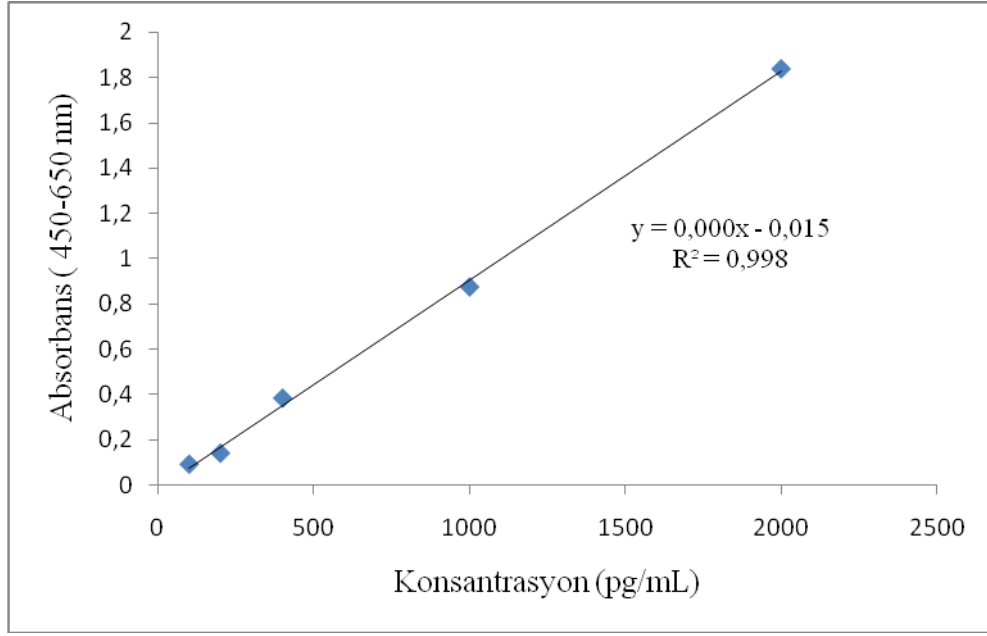
MDA düzeyinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 µL Bradford Reaktifi ve 10 µL numune alındı. Bu miktarlar pleyte yüklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Spektrofotometrede 600 nm’de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı MDA hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 13. Protein standart grafiği (MDA için)

5.2.9. Serumda Leptin Ölçümü

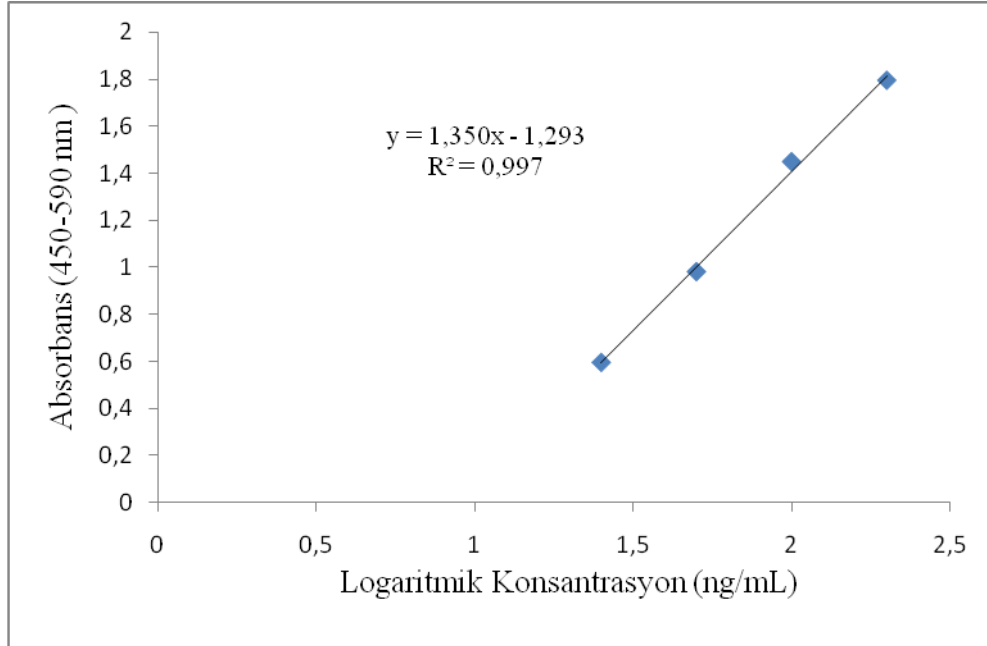
Serum leptin ölçümünde Biovendor firmasının RD291001200R katalog nolu Mouse ve sıçan leptin Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kiti kullanılmıştır. Serumda leptin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 14’de gösterilmiştir.



Şekil 14. Leptin standart grafiği

5.2.10. Serumda Adiponektin Ölçümü

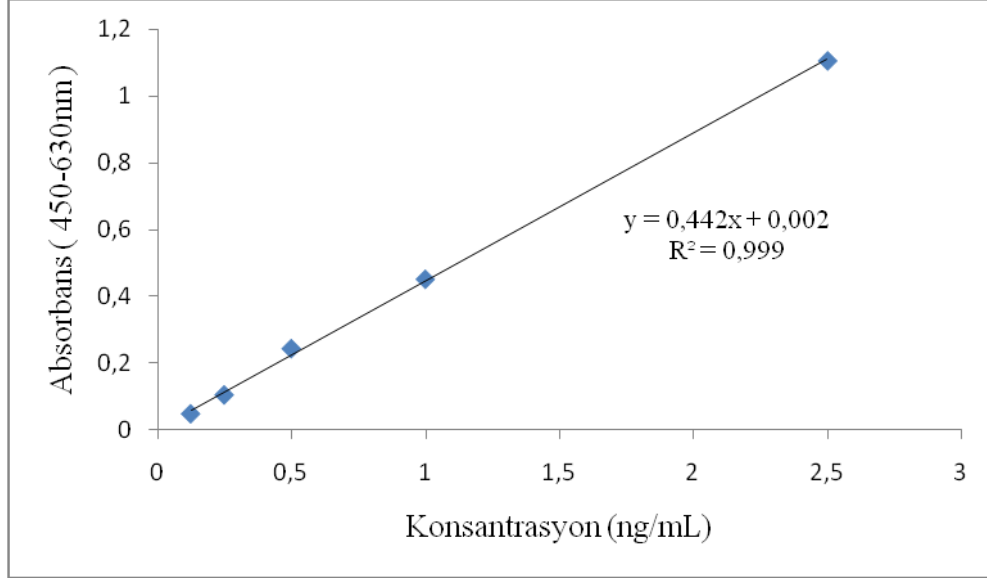
Serum adiponektin ölçümünde Millipore firmasının ezradp-62k katalog nolu sıçan adiponektin ELISA kiti kullanılmıştır. Serumda adiponektin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 15’de gösterilmiştir



Şekil 15. Adiponektin standart grafiği

5.2.11. Serumda Rezistin Ölçümü

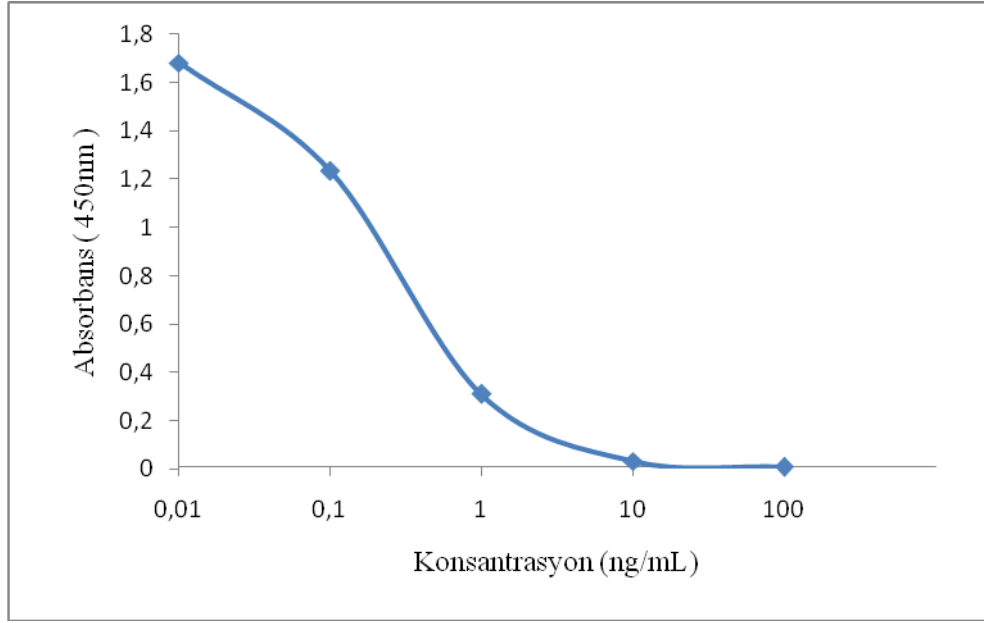
Serum rezistin ölçümünde Biovendor firmasının RD391016200R katalog nolu sıçan resistin ELISA kiti kullanılmıştır. Serumda resistin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 16’da gösterilmiştir.



Şekil 16. Rezistin standart grafiği

5.2.12. Serumda Apelin Ölçümü

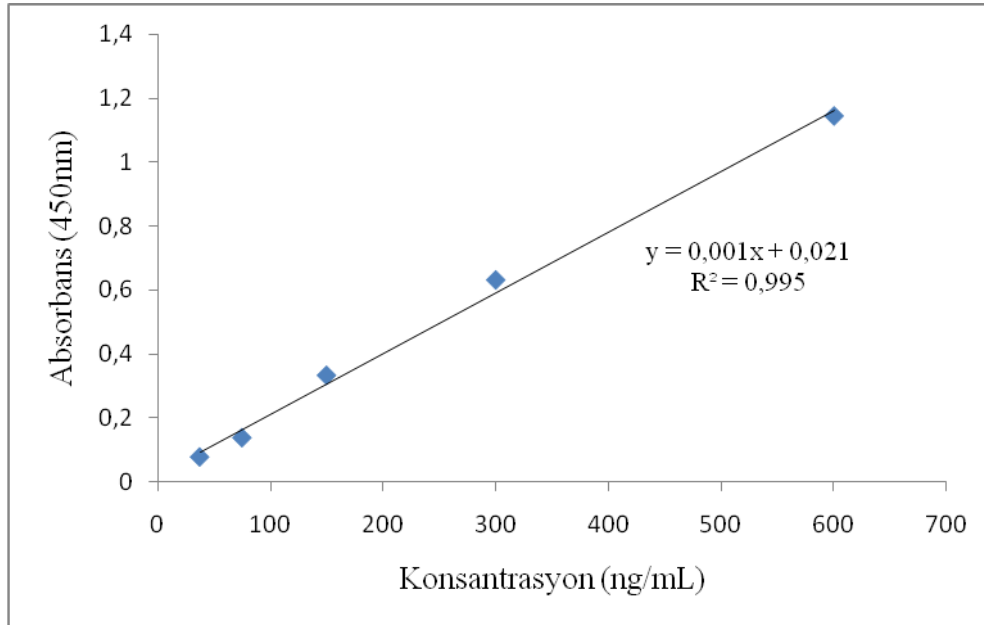
Serum apelin ölçümünde Phoenix pharmaceuticals, inc firmasının EKE-057-23 katalog nolu apelin-12 (human, rat, mous) extraction free EIA kiti kullanılmıştır. Serumda apelin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 17’de gösterilmiştir



Şekil 17. Apelin standart grafiği

5.2.13. Serumda RBP Ölçümü

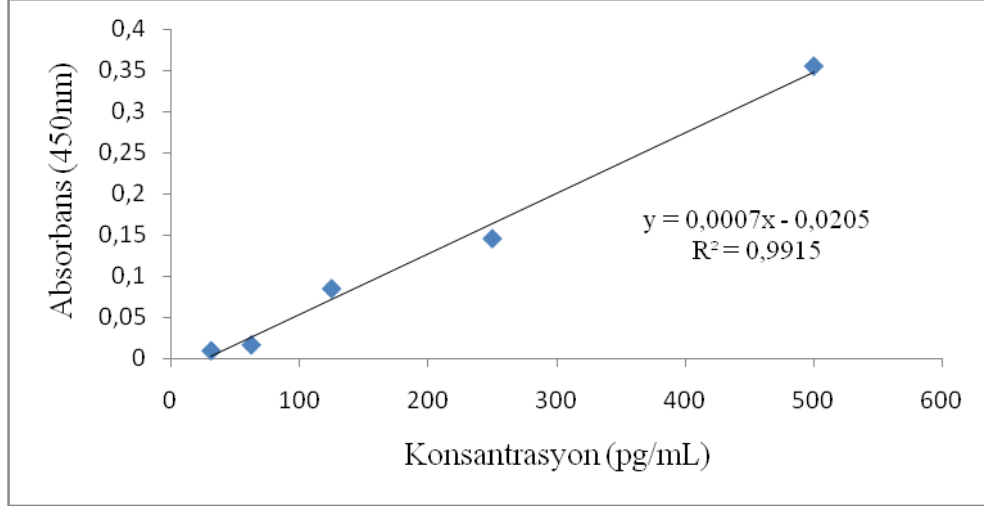
Serum RBP ölçümünde Sun Red firmasının ELISA kiti kullanılmıştır. Serumda RBP ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 18’de gösterilmiştir.



Şekil 18. RBP standart grafiği

5.2.14. Serumda IL-6 Ölçümü

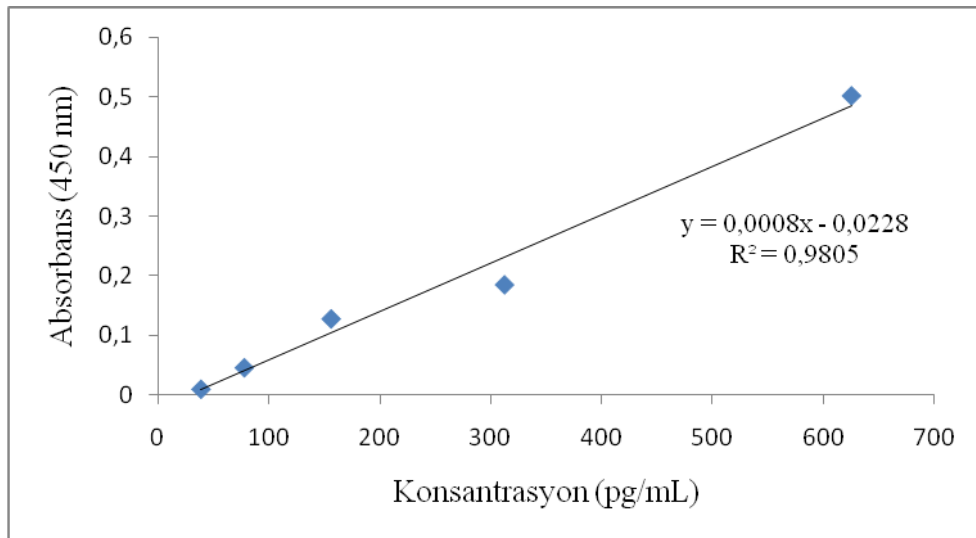
Serum IL-6 ölçümünde eBioscience firmasının ELISA kiti kullanılmıştır. Serumda IL-6 ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 19’da gösterilmiştir.



Şekil 19. IL-6 standart grafiği

5.2.15. Serumda TNF- α Ölçümü

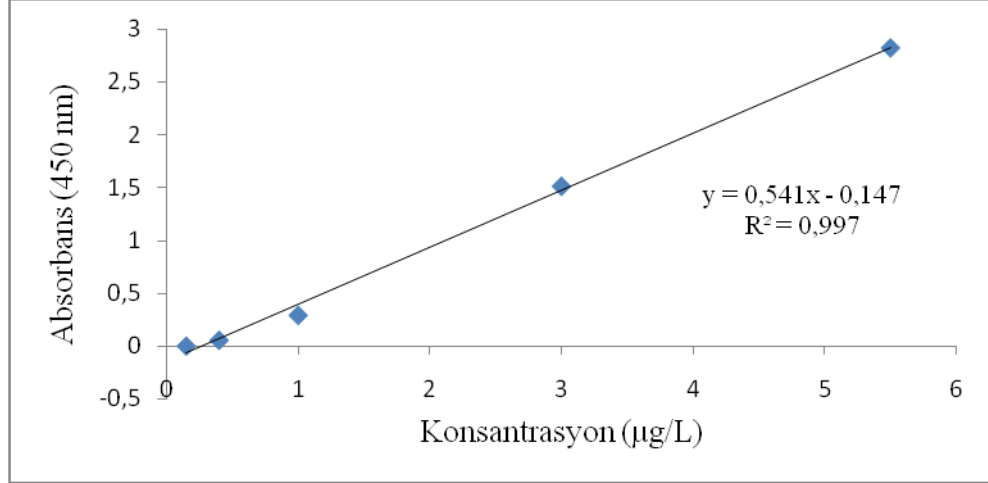
Serum TNF- α ölçümünde eBioscience firmasının ELISA kiti kullanılmıştır. Serumda TNF- α ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 20’de gösterilmiştir.



Şekil 20. TNF- α standart grafiği

5.2.16. Serumda İnsülin Ölçümü

Serum insülin ölçümünde DRG Diagnostik firmasının ELISA kiti kullanılmıştır. Serumda insülin ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Elde edilen standart grafiği Şekil 21’de gösterilmiştir.



Şekil 21. İnsülin standart grafiği

5.2.17. Serumda Glukoz ve Trigliserit Ölçümü

Elde edilen serumlarda, Glukoz ve trigliserit seviyeleri rutin biyokimya laboratuvarında Roche Hitachi Cobas 8000 oto anizöründe ölçülmüştür.

5.2.18. Gen Ekspresyon Analizi

5.2.18.1. Yağ Dokusundan Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu TRIzol total RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Elde edilen RNA örnekleri RNaz’sız suda çözülerek 260/280 nm’de konsantrasyonları ve absorbans oranları nanodrop kullanılarak belirlendi

5.2.18.2. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA’dan cDNA Elde Edilmesi, Çoğaltılması ve Görüntülenmesi

Ekstraksiyon sonunda elde edilen total RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla ticari Roche cDNA sentez kiti kullanıldı. Kit prosedürüne uygun olarak cDNA sentez işlemi yapıldı. Elde edilen cDNA örnekleri aynı gün RT-PCR yapılmak için kullanıldı. Adipokinden adipokine farklı olmakla

beraber 179 - 216 arasında baz çifti uzunluğuna sahip cDNA parçaları çoğaltıldı. RT-PCR'dan sonra örneklerin bir kısmı agaroz jel elektroforezinde yürütülerek reaksiyon kontrol edildi.

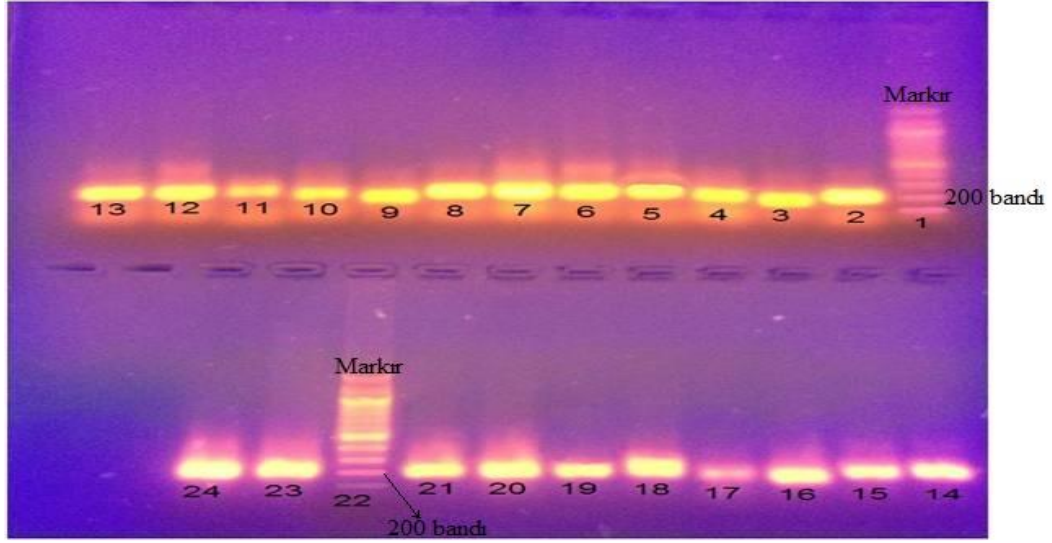
Görüntülemeye Kullanılan Çözeltiler:

1) Tris-asetik asit-EDTA (TAE) elektroforez tamponu: 242 g Tris, 37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar saf suda çözüldü ve üzerine 57.1 asetik asit ilave edildi. 1N NaOH ile pH: 8.5'a ayarlandı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırladığımız Tris-asetikasit-EDTA (TAE) tamponunu 50 kat seyreltildi ve hem elektroforez tamponunu hazırlamada, hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

2) Etidyum Bromür Çözeltisi: 100 mg etidyum bromür 10 mL deiyonize suda çözüldü (10 mg/mL). Buzdolabında (4 °C'de) saklandı.

3) % 1,5'lik agaroz jel hazırlanması: Beher içerisine 0.6 g agaroz 40 mL TAE tamponuna ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında 50 saniye çözünmesi sağlandı. Elde edilen jele 2 µL etidyum bromür eklendi ve hazırlanan agaroz jel kalıbına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi.

Ürünlerin Jele Yüklenmesi: Her bir örnekten 3 µL alınıp 3 µL yükleme boyası ile karıştırıldı ve elektroforez tankındaki agaroz jele zarar verilmeden kuyucuklara yüklendikten sonra 100 voltta 30 dk ürünlerin göçü sağlandı. Yürütme işleminin sonunda elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve kaydedildi. Jel görüntülerinde yaklaşık 200 baz çifti civarında ürünlerin çoğaldığı gözlemlendi. Agaroz jeldeki ürünlerin görüntüsü Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 22. RT-PCR'dan sonra agaroz jelde ürünlerin görüntüsü

Görüntülemek için agaroz jele yüklenen örnekler Tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo 11. Agaroz jele yüklenen örnekler

Örnek No	Doku Türü	Adipokin Türü
1	Markır (100-1500)	Markır (100-1500)
2	Visseral doku	Leptin
3	Visseral doku	Adiponektin
4	Visseral doku	NADPH oksidaz
5	Visseral doku	Apelin
6	Visseral doku	Rezistin
7	Visseral doku	Beta Aktin
8	Perirenal doku	Leptin
9	Perirenal doku	Adiponektin
10	Perirenal doku	NADPH oksidaz
11	Perirenal doku	Apelin
12	Perirenal doku	Rezistin
13	Perirenal doku	Beta Aktin
14	Subkutan doku	Leptin
15	Subkutan doku	Adiponektin
16	Subkutan doku	NADPH oksidaz
17	Subkutan doku	Apelin
18	Subkutan doku	Rezistin
19	Subkutan doku	Beta Aktin
20	Subkutan doku	Apelin
21	Subkutan doku	Rezistin
22	Markır (100-1500)	Markır (100-1500)
23	Visseral doku	Beta Aktin
24	Visseral doku	Leptin

5.2.18.3. RT- PCR

RT-PCR’da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarlarıyla orantılı olarak artan floresans boyanın verdiği sinyalin izlenmesiyle belirlenir. RT-PCR’da ilgili genlerin ekspresyonlarını belirlemek için SYBR Green boyası kullanıldı. RT-PCR işlemi Roche LightCycler 480 II marka cihazda katalog no: 12 239 264 001 DNA master SYBR green I qRT-PCR kiti prosedürü doğrultusunda yapıldı.

Sonuçların hesaplanmasında her bir örneğin hedef genlerini (adipokinleri) o örneğin referans genine (beta aktine) orantılayarak relatif kantifikasyon yapıldı. Kontrol grubuna göre artış ve azalışlar belirlendi. Arbitrary unit olarak ifade edildi. Çalışmamızda kullandığımız primerler Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer Adı		Primer Dizisi
Leptin	İleri primer	5’-AAA ACC CTC ATC AAG ACC ATT G-3’
	Geri primer	5’-TCT CCA GGT CAT GAG CTA TCT G-3’
Adiponektin	İleri primer	5’-TCA TTC CTG TCT GTA CGA GTG C-3’
	Geri primer	5’-CAT CCA ACC TGC ACA AGT TTC-3’
Apelin	İleri primer	5’-GCT CTG GCT CTC CTT GAC TG-3’
	Geri primer	5’-AGC CCT TCA ATC CTG CTT TAG-3’
Rezistin	İleri primer	5’-TTT CCT TTT CTT CCT TGT CCTG-3’
	Geri primer	5’-GAG CAG CTA GTG ACG GTT GTG-3’
NADPH Oksidaz	İleri primer	5’-GGA ATC TCC TCT CCT TCC TCAG-3’
	Geri primer	5’-GCT ACT GAA TAT GGG TCC GAAG-3’
Beta Aktin	İleri primer	5’-TAC AAC CTT CTT GCA GCT CCTC-3’
	Geri primer	5’-AGG AGT CCT TCT GAC CCA TACC-3’

cDNA’ları oluşturulan her bir örnek için Tablo 13’deki gibi pipetlemeler yapıldıktan sonra Light Cyler 480 II (Roche, Germany) cihazında Tablo 14’deki program eşliğinde RT-PCR yapıldı.

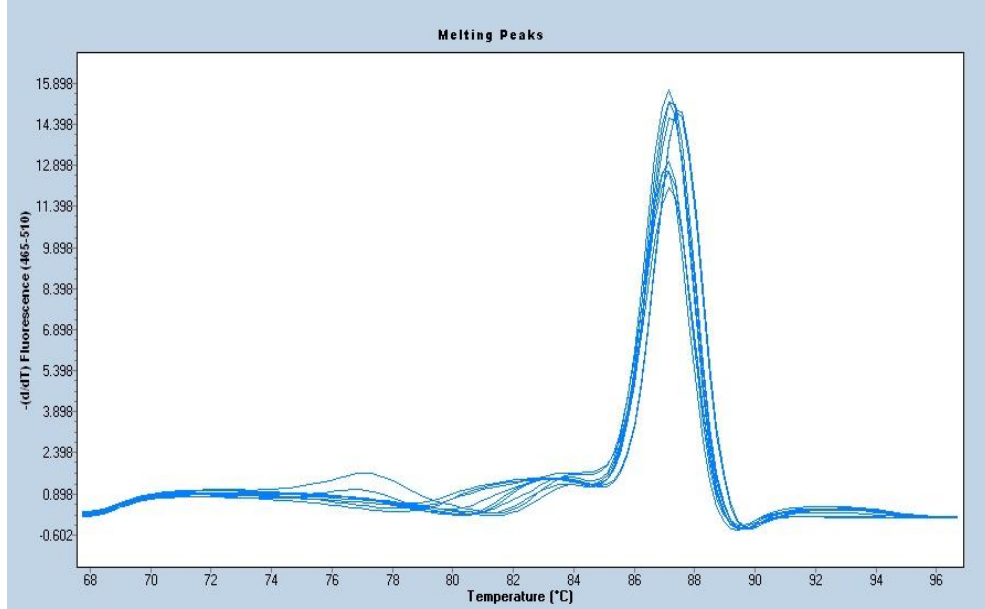
Tablo 13. Örneklerin RT-PCR için hazırlanması

Enzimler İçin Eklenecek Reaktifler	Bir Örnek için hacim	54 Örnekte her bir gen için hacim
RNaz'sız su	12.8 µL	691.2 µL
MgCl (25 mM)	1.2 µL	64.8 µL
10 µM ileri primer (500 nM final)	1 µL	54 µL
10 µM geri primer (500 nM final)	1 µL	54 µL
DNA Master SYBR Green 10x (mix vial 1)	2 µL	108 µL
cDNA (her örnek için)	2 µL	-

Tablo 14. RT-PCR Protokolü

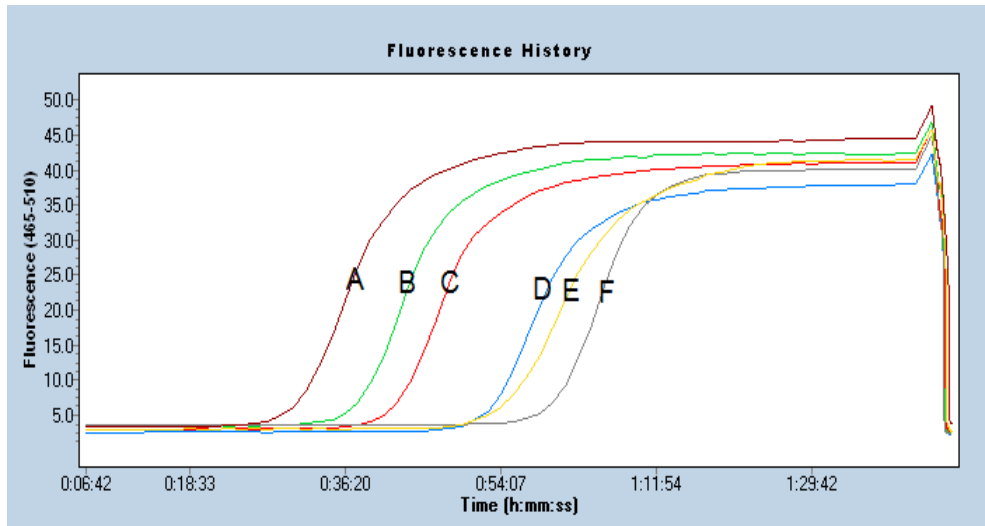
Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön inkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon	
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrileri	
Soğutma	1	-	
Hedef Sıcaklık (°C)	Elde Etme Modu	Süre(hh:mm:ss)	Sıcaklık Artış Hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	00:08:00	4.4
Amplifikasyon			
95	-	00:00:10	4.4
60	-	00:00:07	2.2
72	-	00:00:08	4.4
Erime Eğrisi			
95	-	00:00:00	2.0
65	-	00:00:15	2.0
97		Devamlı	
Soğuma			
40	-	00:00:30	2.0

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz RT-PCR sonuçlarına göre kullandığımız primerlerin çalışmamıza uygun olduğu ve yan ürün oluşturmadığı gözlemlendi. Buna ilişkin örnek leptin erime noktası grafiği Şekil 23’de gösterilmiştir.



Şekil 23. Leptin için erime noktası grafiği

RT-PCR çalışmasında adipokinlere ait amplifikasyon grafiği Şekil 24’de gösterilmiştir. Grafikteki harflerin karşılıkları sırasıyla A: beta aktin, B: adiponektin, C: rezistin, D: leptin, E: apelin, F: NADPH oksidaz’dır.



Şekil 24. Amplifikasyon eğrileri

5.2.19. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

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

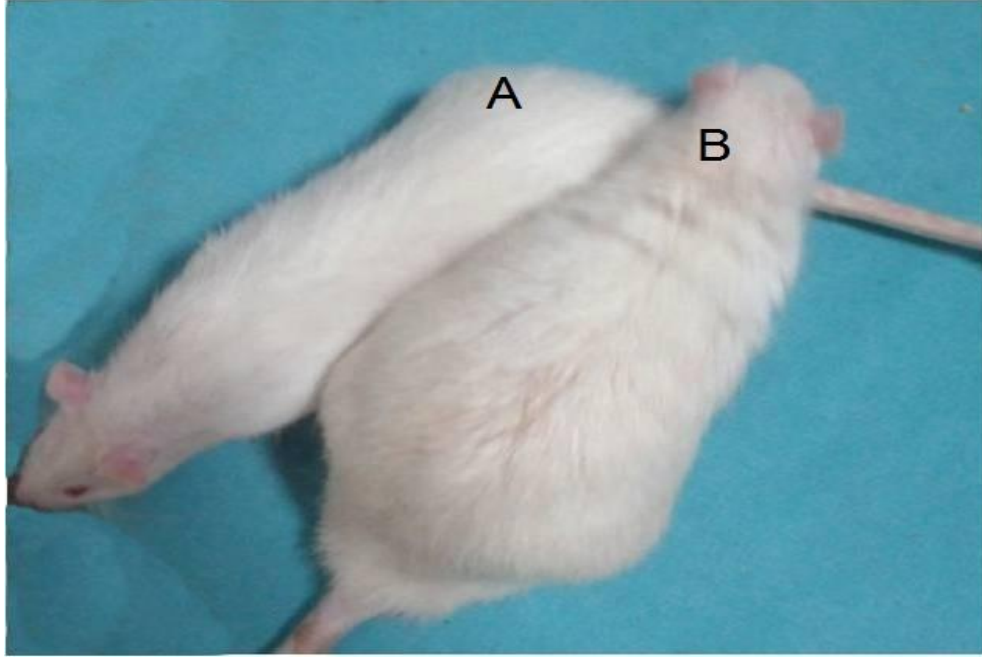
6. BULGULAR

6.1. Morfolojik Bulgular

Çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden 6-8 haftalık 150-200 g Sprague-Dawley ırkı 18 adet erkek sıçan alınıp yine aynı yerde deneyler için 12 saatlik karanlık-aydınlık ortam sağlanarak toplam 85 gün barındırılıp beslenmiştir. Tüm sıçanlar alındıktan sonra ilk 15 gün standart sıçan yemi ile beslenmiştir. Sıçanlar bu beslenme periodundan sonra üç gruba ayrılarak gruplarına uygun sıçan yemleri ile 70 gün boyunca beslenmiştir. Ayrıca, NAC grubunun içme suyuna 2 g/L NAC ilave edilmiştir. Sıçanların beslenme programı başlangıcındaki ve sonundaki görüntüleri Şekil 25 ve Şekil 26’da görülmektedir.



Şekil 25. Beslenme periodunun başlangıcındaki sıçanların görünüşü



Şekil 26. Beslenme programı sonunda sıçanların görüntüsü A) kontrol, B) obez

Çalışmamızda uyguladığımız beslenme periyodu sonucu ağırlık değişimleri, glukoz, TG, insülin ve OSİ düzeyleri Tablo 15’de verilmiştir.

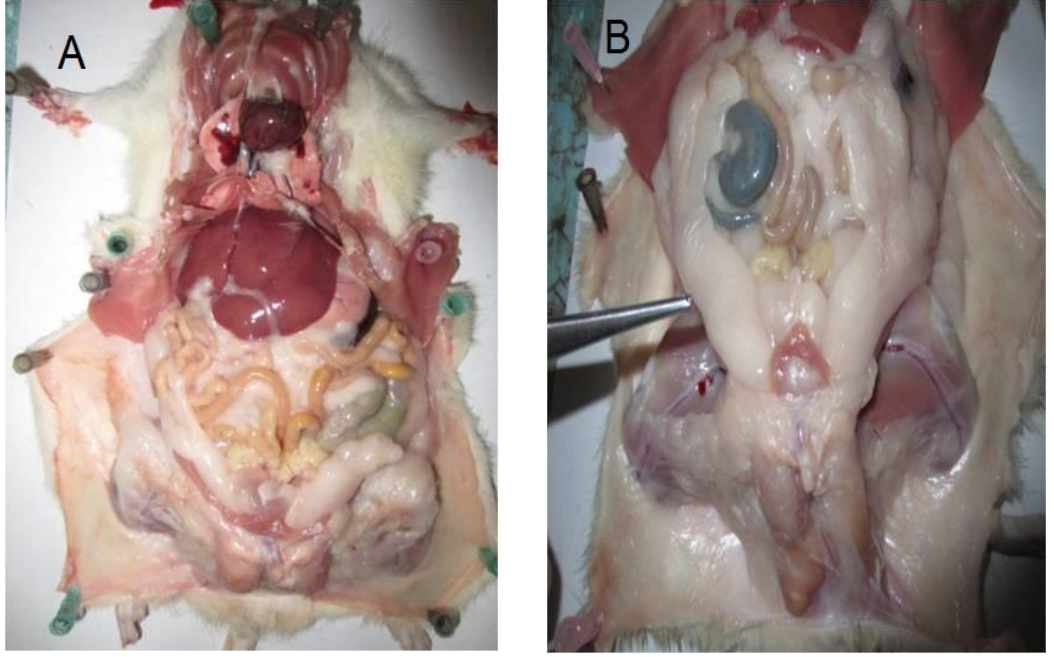
Tablo 15. Ağırlık, glukoz, TG, insülin ve OSİ değişiklikleri

	Kontrol Grubu	Obez Grubu	NAC Grubu
Başlangıç ağırlığı (g)*	285 ± 21.3	283.5 ± 25.2	284.5 ± 21.47
Deney sonu ağırlık (g)	450.3 ± 31.3	517.8 ± 19.9	514.0 ± 65.2
Glukoz (mg/dL)	130.3 ± 7.6	150.0 ± 12.5	160.1 ± 16.8
TG (mg/dL)	177.8 ± 47.9	188.6 ± 5.9	153.1 ± 44.7
İnsülin (p mol/L)	298.1 ± 97	293.2 ± 59.9	304.1 ± 114.1
OSİ (arbitrary unit)	694.6 ± 175	648 ± 108.8	569.7 ± 185.5

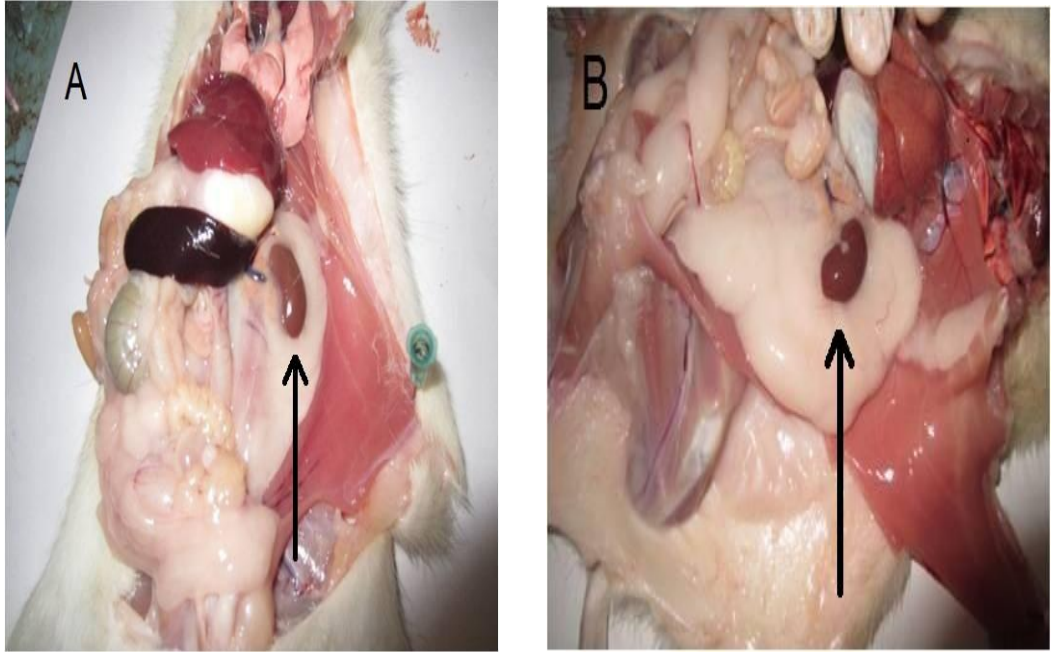
* 15 günlük ön beslemeden sonraki ağırlık

Besleme programı sonunda, çalışma gruplarından obez ve NAC grubu kontrol grubuna göre daha fazla kilo almış olarak tespit edildi ($p=0.018$). Serum glukoz düzeyleri obez ve NAC grubunda daha yüksek gözlemlendi ($p=0.004$). TG, insülin ve OSİ yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Obez ve NAC gruplarının tüm lokal yağ dokuları morfolojik olarak kontrol grubuna göre daha büyük olduğu, obez grubu ile NAC grubu arasında ise yağ dokusu büyüklüğü açısından

belirgin bir farklılığın olmadığı gözlemlendi. Yağ dokularında meydana gelen morfolojik değişiklikler Şekil 27, 28 ve 29’da verilmiştir.



Şekil 27. Visseral yağ dokusu A) kontrol, B) obez



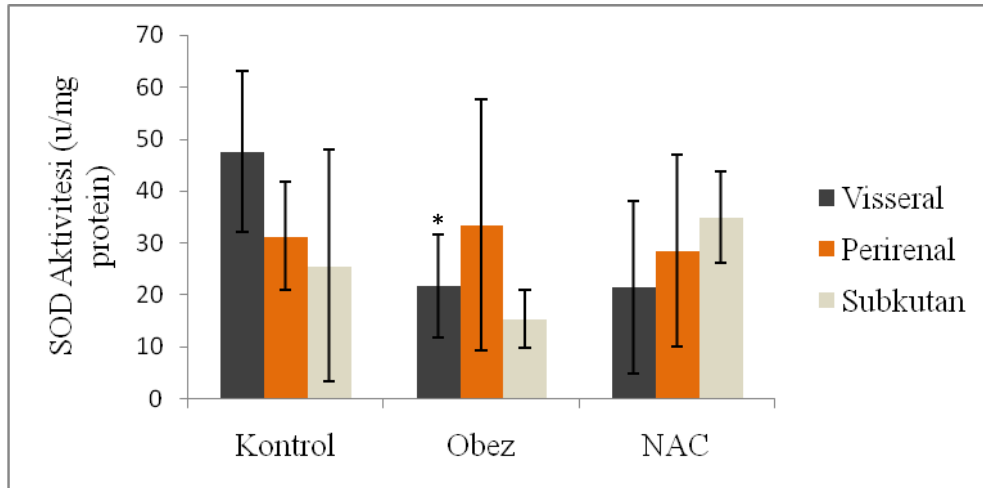
Şekil 28. Perirenal yağ dokusu A) kontrol, B) obez



Şekil 29. Subkutan yağ dokusu

6.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Ölçüm Sonuçları

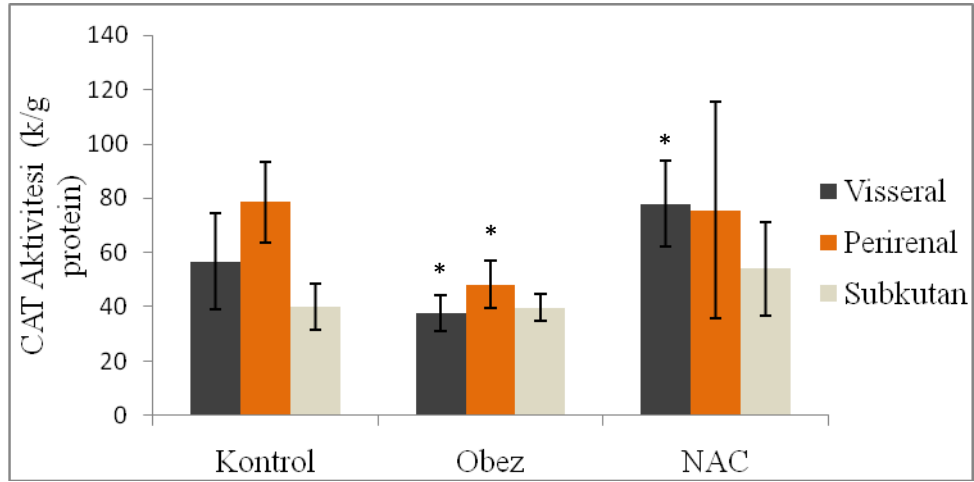
Yağ dokularında SOD aktivite ölçümleri modifiye Sun ve Oberley yöntemiyle yapıldı (99). Gruplar SOD aktivitesi yönünden değerlendirildiğinde, obez grupta visseral yağ dokusunda SOD değeri kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.009$). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı (Şekil 30).



Şekil 30. SOD aktivite sonuçları

6.3. Katalaz Aktivite Ölçüm Sonuçları

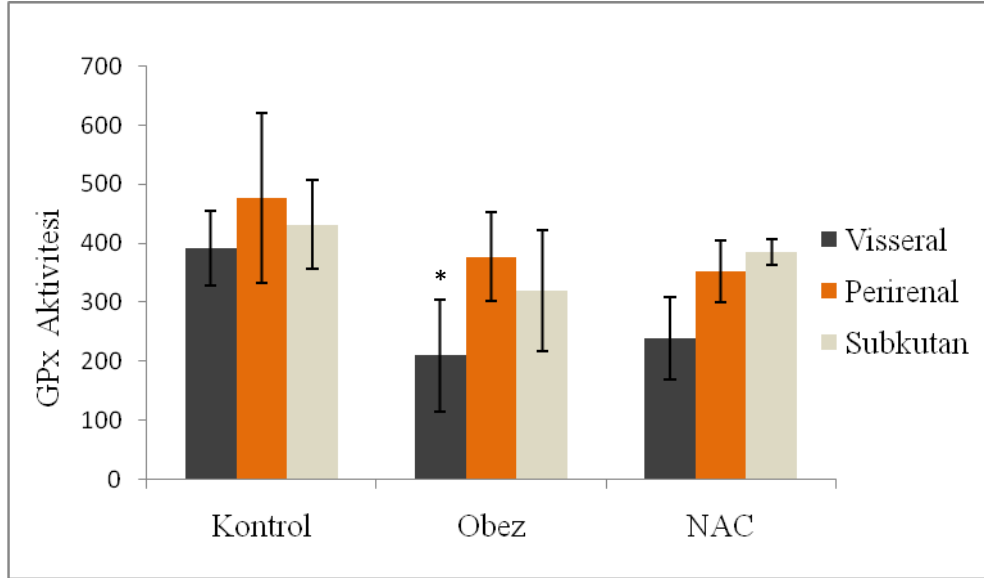
Yağ dokularında CAT aktivite ölçümleri modifiye Aebi yöntemiyle yapıldı (100). Gruplar CAT aktivitesi yönünden değerlendirildiğinde obez grupta visseral ve perirenal yağ dokusunda CAT aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.009$, $p=0.002$). Ayrıca NAC uygulanan grupta visseral yağ dokusunda obez ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek CAT aktivitesi gözlemlendi ($p=0.004$) (Şekil 31).



Şekil 31. CAT aktivite sonuçları

6.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Ölçüm Sonuçları

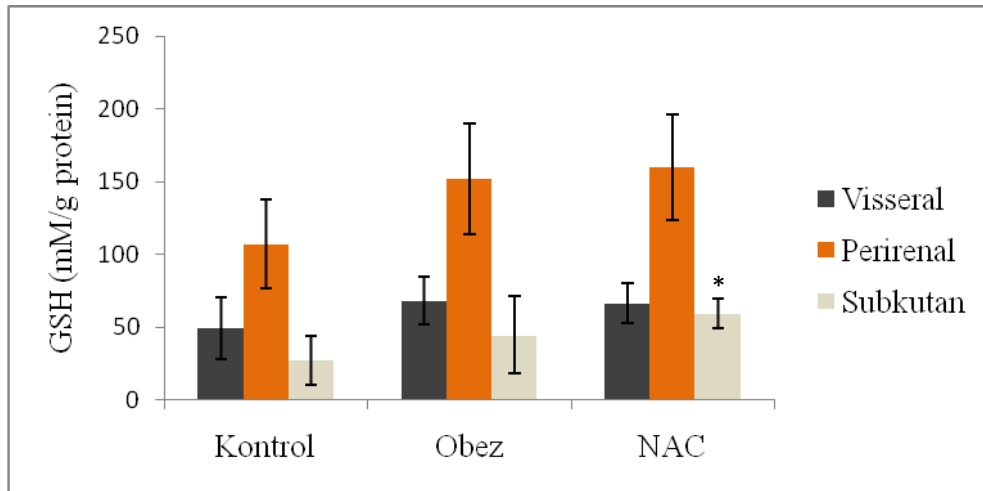
Yağ dokularında GPx aktivite ölçümleri Cayman firmasının ticari spektrofotometrik kiti ile yapıldı. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, obez ve NAC grubunun tüm yağ dokularında GPx aktivitesi kontrole göre daha düşüktü. Ancak obez grubun visseral yağ dokusunda bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.002$). Subkutan ve perirenal dokularda GPx yönünden gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 32).



Şekil 32. GPx aktivite sonuçları

6.5. GSH Ölçüm Sonuçları

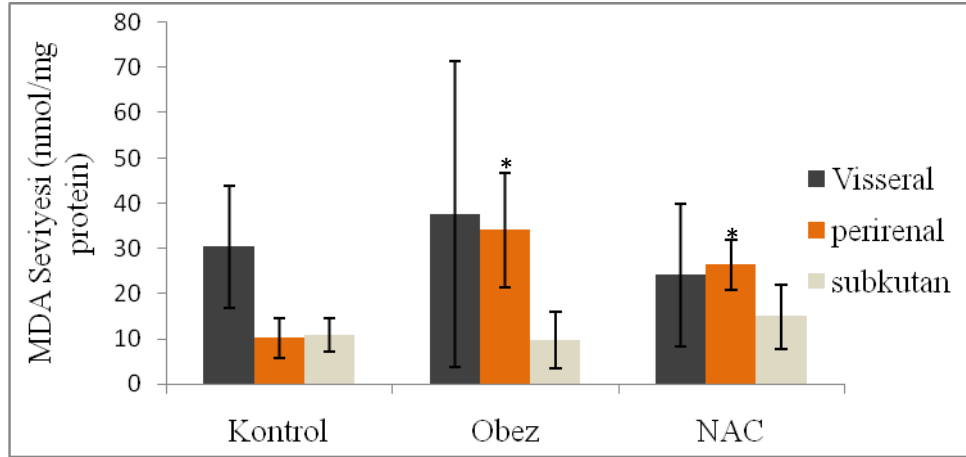
Yağ dokularında GSH ölçümleri Solange Cristina Garcia ve arkadaşlarının geliştirdiği HPLC metodunun modifiye yöntemi ile yapıldı (101). Çalışma grupları GSH seviyesi yönünden değerlendirildiğinde, NAC grubunun subkutan yağ dokusunda GSH miktarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha fazla olduğu tesbit edildi ($p=0.032$). Diğer gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmedi (Şekil 33).



Şekil 33. GSH sonuçları

6.6. MDA ölçüm sonuçları

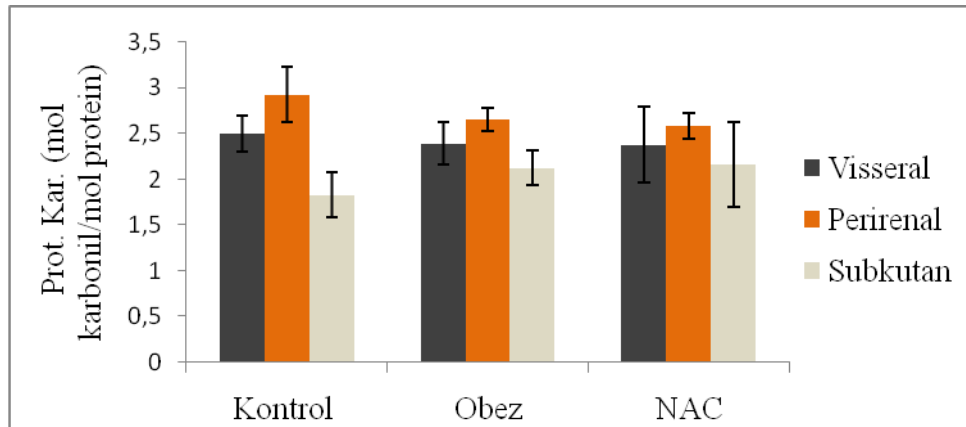
Yağ dokularında MDA ölçümleri modifiye Mihara ve Uchiyama yöntemiyle yapıldı (102). Yapılan istatistiksel analizler sonucu, obez ve NAC grubunun perirenal yağ dokusunda MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksel olduğu belirlendi ($p=0.004$). Diğer dokularda MDA yönünden gruplar arasında farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 34).



Şekil 34. Doku MDA seviyeleri

6.7. Protein Karbonil Ölçüm Sonuçları

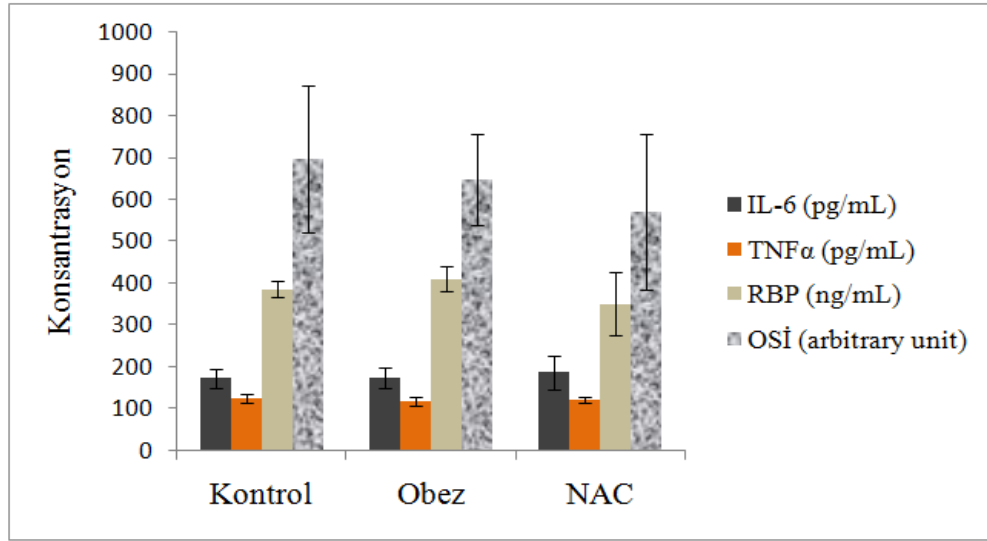
Yağ dokularında yapılan protein karbonil ölçümleri Griffiths tarafından geliştirilmiş olan HPLC metodunun modifiye şekli ile yapılmıştır (103). Protein karbonil grubu seviyeleri yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 35).



Şekil 35. Protein karbonil sonuçları

6.8. IL-6, TNF α , OSİ, RBP Ölçüm Sonuçları

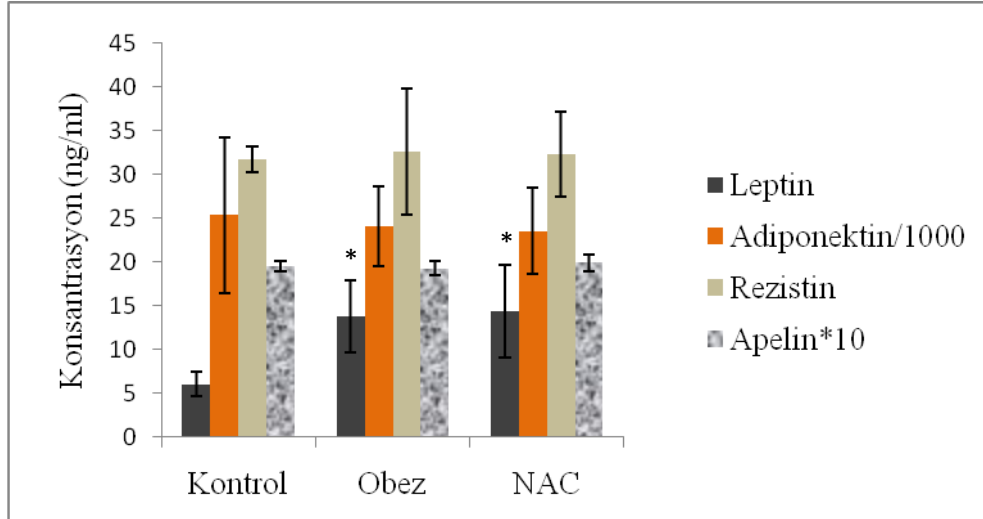
Serum numunelerinde IL-6 eBioscience, TNF- α eBioscience, RBP-4 Sun Red firmasının ELISA kiti ile ölçüldü. Rel firmasının ticari kitiyle TAK ve TOK ölçülerek OSİ değeri bulundu. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, IL-6, TNF- α , RBP, OSİ seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Şekil 36).



Şekil 36. IL-6, TNF- α , RBP, OSİ sonuçları

6.9. Adipokin Ölçüm Sonuçları

Serum numunelerinde leptin Biovendor, adiponektin Millipore, rezistin Biovendor, apelin Phoenix Pharmaceuticals, firmalarının ticari ELISA kiti ile ölçüldü. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, obez ve NAC grubunda leptin seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksel olduğu belirlendi ($p=0.003$). Diğer ölçülen adipokinler yönünden gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 37).



Şekil 37. Adipokin seviyeleri

6.10. Ölçülen Oksidatif Stres Belirteçleri, Antioksidan Enzimler, Antioksidan Bileşikler, Adipokinlerin Ortalamaları ve Standart Sapma Değerleri

Ölçülen oksidatif stres belirteçleri, antioksidan enzimler ve antioksidan bileşikler ve adipokinlerin ortalamaları ve standart sapma değerleri Tablo 16 -19'da verilmiştir.

Tablo 16. Visseral yağ dokusunda MDA, SOD, CAT, protein karbonil ve GSH ortalamaları ve standart sapmaları

Parametre	Visseral Yağ Dokusu		
	Kontrol	Obez	NAC
MDA (nmol/mg protein)	30.4 ± 13.4	37.6 ± 33.9	24.1 ± 16.3
SOD (u/mg protein)	47.53 ± 15.51	21.7 ± 13.2	21.49 ± 16.6
CAT (k/g protein)	56.78 ± 17.7	37.77 ± 6.5	78 ± 35.5
GPx nmol/dk/mL	391.93 ± 63.93	209.32 ± 93.95	238.81 ± 69.96
Protein Karbonil (mol kar./mol protein)	2.5 ± 0.31	2.39 ± 0.23	2.38 ± 0.8
GSH (mM/gprotein)	49.4 ± 21.32	68.3 ± 16.60	66.12 ± 13.68

Tablo 17. Perirenal yağ dokusunda MDA, SOD, CAT, protein karbonil ve GSH ortalamaları ve standart sapmaları

Perirenal Yağ Dokusu			
Parametre	Kontrol	Obez	NAC
MDA (nmol/mg protein)	10.3 ± 7.9	34.1 ± 12.69	26.41 ± 5.63
SOD (u/mg protein)	31.28 ± 10.43	33.46 ± 24.15	28.34 ± 18.46
CAT (k/g protein)	78.58 ± 14.91	48.3 ± 8.7	75.65 ± 39.85
GPx nmol/dk/mL	476.26 ± 143.75	376.37 ± 75.26	352.94 ± 52.58
Protein Karbonil (mol kar./mol protein)	2.93 ± 0.3	2.65 ± 0.65	2.58 ± 0.14
GSH (mM/gprotein)	107.2 ± 30.9	152 ± 42.3	160 ± 36.57

Tablo 18. Subkutan yağ dokusunda MDA, SOD, CAT, protein karbonil ve GSH ortalamaları ve standart sapmaları

Subkutan Yağ Dokusu			
Parametre	Kontrol	Obez	NAC
MDA (nmol/mg protein)	10.88 ± 3.7	9.7 ± 6.5	15 ± 7.8
SOD (u/mg protein)	25.58 ± 21	15.39 ± 8.2	34.98 ± 8.7
CAT (k/g protein)	40.15 ± 8.6	39.78 ± 20.3	54.1 ± 17.3
GPx nmol/dk/mL	432.02 ± 74.68	319.33 ± 102.24	385.41 ± 22.04
Protein Karbonil (mol kar./mol protein)	1.83 ± 0.32	2.12 ± 0.42	2.16 ± 0.46
GSH (mM/gprotein)	27.32 ± 16.97	44.55 ± 26.49	59.37 ± 10.07

Tablo 19. Deney gruplarındaki adipokinlerin ortalamaları ve standart sapmaları

Adipokinler	Kontrol	Obez	NAC
Leptin (ng/mL)	6.09 ± 1.37	13.79 ± 4.05	14.38 ± 5.32
Adiponektin (µg/mL)	25.4 ± 7.9	24.1 ± 4.1	23.6 ± 4.9
Rezistin (ng/mL)	31.78 ± 1.3	32.65 ± 7.2	32.33 ± 4.4
Apelin (ng/mL)*10	19.5 ± 0.6	19.3 ± 0.8	19.9 ± 0.9
RBP (ng/mL)	385 ± 19.4	409.6 ± 30.3	349.9 ± 74.7
IL-6 (pg/mL)	172.3 ± 23.6	174.2 ± 24.6	187.1 ± 40.2
TNF-α (pg/mL)	123.9 ± 10.5	117.5 ± 10.5	121 ± 6.9

Obez grupta perirenal CAT ile leptin arasında pozitif korelasyon vardır ($r=0.94$, $p=0.005$). Obez grupta visseral glutatyon ile leptin arasında negatif korelasyon vardır ($r=-0.88$, $p=0.019$). Obez de perirenal MDA ile adiponektin arasında negatif korelasyon vardır ($r=-0.82$, $p=0.042$). NAC grubunda Subkutan karbonil grubu ile adiponektin arasında negatif korelasyon vardır ($r=-0.9$, $p=0.037$). Obez grupta rezistin ile subkutan GSH arasında pozitif korelasyon vardır ($r=0.94$, $p=0.005$). NAC grubunda perirenal glutatyon ile rezistin arasında pozitif korelasyon vardır ($r=0.94$, $p=0.005$). Obez grupta perirenal SOD ile apelin arasında pozitif korelasyon vardır ($r=0.88$, $p=0.019$). Obez grubunda TNF-α ile subkutan GPx arasında negatif korelasyon vardır ($r=-0.829$, $p=0.042$). Korelasyonlar Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20. Adipokinlerle doku parametreleri arasındaki korelasyon tablosu

Adipokinler	Perirenal CAT	Visseral GSH	Perirenal MDA	Subkutan Karbonil	Subkutan GSH	Perirenal GSH	Perireal SOD	Subkutan GPx
Leptin	$r=0.94^*$ $p=0.005$	$r=-0.88^*$ $P=0.019$						
Adiponektin			$r=-0.82^*$ $P=0.042$	$r=-0.9^{**}$ $P=0.037$				
Rezistin					$r=0.94^*$ $P=0.005$	$r=0.94^{**}$ $P=0.005$		
Apelin							$r=0.88^*$ $P=0.019$	
TNF- α								$r=-0.829^*$ $P=0.042$

*Obez grup ** NAC grup

Rezistin ile IL-6 arasında pozitif korelasyon ($r=0.829$, $p=0.042$), Apelin ile TNF- α arasında negatif korelasyon ($r=-0.829$, $p=0.042$), İnsülin ile adiponektin arasında negatif korelasyon ($r=-0.886$, $p=0.019$), OSİ ile adiponektin arasında negatif korelasyon ($r=-0.829$, $p=0.042$) tesbit edilmiştir. Korelasyonlar Tablo 21’de verilmiştir.

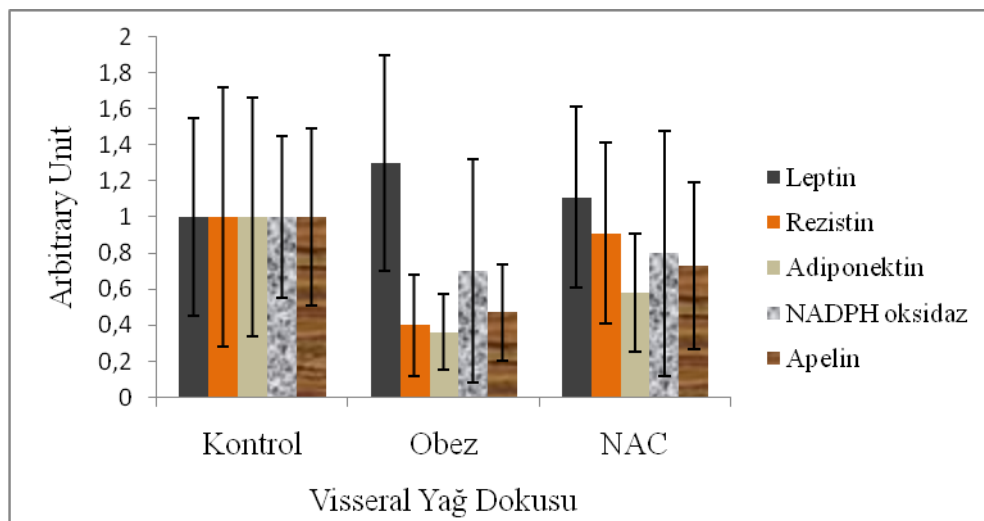
Tablo 21. Sitokinler arasındaki korelasyon tablosu

	Rezistin	Apelin	Adiponektin
IL-6	$r=0.829^*$ $p=0.042$		
TNF-α		$r=-0.829^*$ $p=0.042$	
İnsülin			$r=-0.886^*$ $p=0.019$
OSİ			$r=-0.829^*$ $p=0.042$

*Obez grup

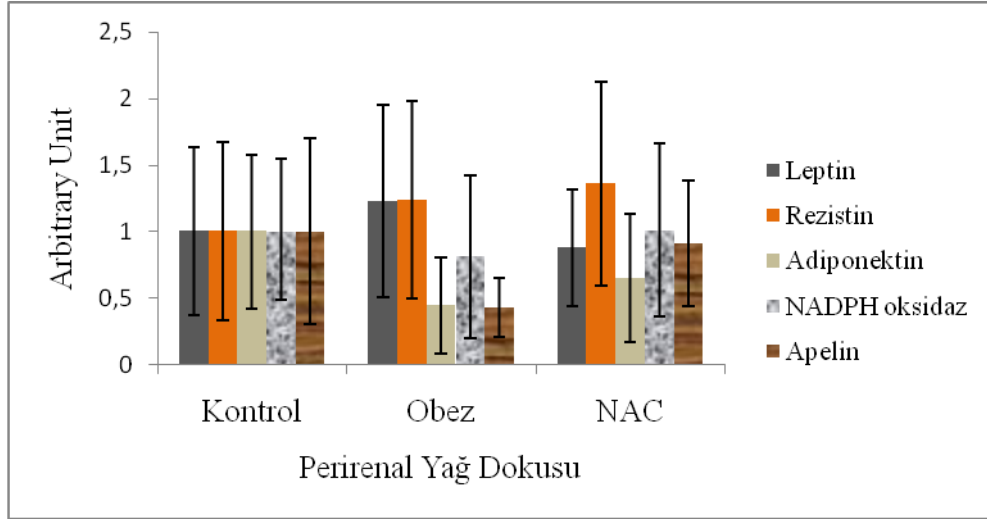
6.11. Yağ Dokularında Gen Ekspresyon Sonuçları

Visseral, perirenal ve subkutan yağ dokularındaki leptin, rezistin, adiponektin, apelin ve NADPH oksidaz gen ekspresyonları kontrol gruplarının katları olarak Şekil 38, 39 ve 40’da verilmiştir.



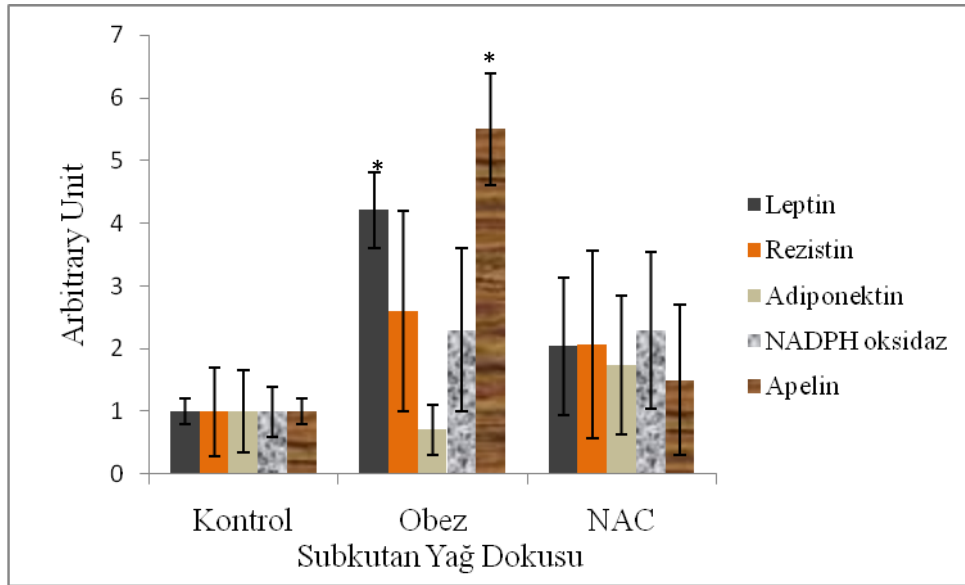
Şekil 38. Visseral yağ dokusundaki gen ekspresyonları

Yapılan istatistiksel analizler sonucu, visseral yağ dokusunda gruplar arasında gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 39. Perirenal yağ dokusundaki gen ekspresyonları

Yapılan istatistiksel analizler sonucu, perirenal yağ dokusunda gruplar arasında gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 40. Subkutan yağ dokusundaki gen ekspresyonları

Yapılan istatistiksel analizler sonucu, obez grupta subkutan yağ dokusunda leptin ve apelin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p=0.04$, $p=0.03$). Diğer parametreler arasında bir anlamlılık gözlemlenmedi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite gittikçe artan insidansı ile önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Obezitenin biyokimyasal mekanizmalarını anlamak ve uygun tedavi protokolleri oluşturabilmek için *in vivo* ve *in vitro* modellerde birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucu yağ dokusu enerjinin depolandığı bir organ olmasının ötesinde, fizyolojik ve patolojik olayları düzenleyen birçok faktörü salgılayan bir endokrin organ olarak önem kazanmıştır. Obezite ile birlikte yağ dokusunda ki artış yağ hücresinden salgılan adipokin profilinde değişikliğe sebep olmaktadır. Yağ dokusunda oluşan inflamasyon ve adipokin profilindeki değişiklikler diyabet, yüksek tansiyon, kanser ve kalp damar hastalıklarını beraberinde getirmektedir (17, 98).

Rodentlerde farklı diyet modelleri ile obezite oluşturmak mümkündür. Çevresel indüklenmiş obezite modelinde enerji açısından yüksek kalori değerine sahip beslenme programı uygulanır (1). Bu obezite modeli küçük farklılıklarla beraber literatürde değişik şekillerde ifade edilmektedir. Matthias Tschöp ve arkadaşlarına göre diyet içeriğinin % 40'ı yağdan, % 40'ı karbohidrattan, % 20'si proteinden oluşması gerekirken (1), Roland Buettner ve arkadaşlarına göre vücuda alınan enerjinin % 42'si yağdan, % 39'u karbohidrattan, % 19'u proteinden sağlanmaktadır (2). Kamal A Amin ve arkadaşlarına göre ise diyet içeriğinin % 46'sı yağ, % 24'ü karbohidrat, % 20.3'ü proteinden, ve % 9.7'si diğerlerinden oluşması gerektiği söylenmektedir (105).

Deneyde kullandığımız yüksek yağlı diyet insülin rezistansı ve hiperglisemi ile karakterizedir (diyet içeriği Tablo 5, Tablo 6 da verilmiştir). Yüksek karbohidrat içerikli diyetle göre daha fazla kilo kazanımına sebep olur ve çoğunlukla TG miktarlarında önemli değişikliğe sebep olmaz (17). Yaptığımız çalışmada, Research Dietten temin ettiğimiz yüksek yağlı sıçan yemiyle beslenen iki grupta da standart sıçan yemi ile beslenen kontrol grubuna göre anlamlı derecede kilo aldığı gözlemlendi ($p=0.018$) (Tablo 15). Sakrifikasyon işleminden sonra yapılan gözlemlerde de çalışmaya dahil edilecek tüm yağ dokularında ciddi artışlar olduğu görüldü (Şekil 25-29). Glukoz ve TG ölçümleri sonucunda glukoz seviyelerinin obez ve NAC grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu ($p=0.004$), TG yönünden ise bir farklılık olmadığı görüldü. İnsulin yönünden de gruplar arasında bir farklılık gözlenmedi.

Oksidatif stres doku oksidanları ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması ile oluşur. Obezite, orta dereceli inflamasyonla seyreden bir hastalıktır ve inflamasyonun tetiklediği oksidatif stresin kalp-damar hastalıkları, diyabet ve metabolik sendrom gibi obezitenin komplikasyonlarının altında yatan mekanizmalardan biri olduğu bildirilmiştir (8, 98).

Obezitede oksidatif strese katkıda bulunan çeşitli muhtemel mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar hiperglisemi, vücut ağırlığını taşımak için artan kas aktivitesi, yüksek doku lipid seviyeleri, yetersiz antioksidan savunma, kronik inflamasyon, endotelial ROS üretimi ve hiperleptinemidir (98) .

Hiperglisemi durumunda organizmada oluşan ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak posreseptör sinyaller oluşturur ve ROS üretimini artırır. Ayrıca AGEs ler hücre içi sinyal yolak kaskatını başlatan NF-kB gibi hücre içi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. NF-kB protein kinaz C yi, sorbitol üretimini, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) ve Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-I)'in transkripsiyonunu aktive eder. Bu intrasellüler moleküllerin aktivasyonu sonucu ROS üretilir (98) .

İntrasellüler glukoz yükselmesi glukozdan sorbitolün oluştuğu poliol yolunu aktive eder. Sorbitol varlığının oksidatif hasara neden olduğu ve stres genlerini aktive ettiği hayvan çalışmalarında tesbit edilmiştir. Hiperglisemi aynı zamanda NADPH oksidaz aktivitesini artırır ve özellikle endotelde $O_2^{\bullet}$ üretilir (98). Poliol yolunun aktivasyonu ortamdaki NADPH kullanımını artırır ve NADPH azalır. Glutasyon redüktaz enziminin substratı olan NADPH azaldığı için GSSG yeterince GSH haline getirilemez ve ROS üretiminde artış olur (106). Son dönemlerde yapılan çalışmalar, obez farelerin yağ hücrelerine glukoz alınımadaki yükselmenin yağ hücrelerinin içinde bile ROS oluşumunda artışa neden olduğunu göstermiştir (98) .

Obez bireylerdeki ağırlık artışından dolayı artan kas aktivitesi hipoksantinin ürata dönüşümü ve elektron transport zinciri aktivitesindeki artış dahil, serbest radikalleri üreten metabolik yolları aktive edebilmektedir. Ağırlık artışından dolayı solunumun artmasıyla hızlanan elektron transferi elektron transfer zincirinden bazı elektronların sızmasına neden olabilmektedir ve bu da kısmen indirgenmiş oksijenden $O_2^{\bullet}$ ve H_2O_2 formunda ROS ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Aynı miktarda yük altında yürüme

aktivitesi esnasında obez bireyler obez olmayanlara göre % 38 daha fazla oksijen tüketmektedir. Bu değerin egzersiz sonrası lipid hidroperoksitle korale olduğu tesbit edilmiştir (98) .

Enzimatik ve non enzimatik antioksidan savunma dokuda oksidan-antioksidan dengeyi sürdürmek için kritik öneme sahiptir. Yapılan birçok çalışma da obezlerde E vitamini, C vitamini, karotenler, fitokimyasallar, çinko, bakır, selenyum, SOD, CAT ve GPx obez olmayan bireylere göre daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle obezlerde antioksidan savunma yetersizliği ortaya çıkmaktadır (98) .

Visseral obezitede plazma serbest yağ asitlerinde yükselme olduğu tesbit edilmiştir. Serbest yağ asitleri kan glukozunu yükseltmektedir. Endotelial ve düz kas hücre kültürlerinde protein kinaz C yolağı vasıtasıyla nitroksit radikallerini ürettiği tesbit edilmiştir. Aynı zamanda hücre kültüründe serbest yağ asitlerinin lökositlerde oksidatif solunum patlamasına neden olarak ROS üretiminde artışa neden olduğu tesbit edilmiştir (98).

İnsan ve hayvan vasküler endotelial hücrelerinde NO sentaz, ksantin oksidoredüktaz, NADPH oksidaz dahil oksidan molekül üretiminin çeşitli enzimatik kaynakları vardır. Endotelial süperoksitin ana kaynağı NADPH oksidazdır. NADPH renin anjiyotensin sistemi gibi hormonlarla ve sitokinlerle modifiye edilebilir. Örneğin anjiyotensin II ile uyarılmış hipertansiyon endotelial süperoksit seviyelerini önemli derecede yükseltir. Endotelde süperoksit oluşumunda ksantin oksidoredüktazın fonksiyonu ise azdır (98) .

Leptin endotelial hücre kültürlerinde ROS oluşumunu uyarmaktadır. Leptin enjekte edilmiş sıçanlarda yapılan çalışmada kontrollere göre daha yüksek MDA, izoprostan, ve protein karbonil tesbit edilmiştir. Bu durumun kontrollere göre daha düşük antioksidan savunmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. NADPH oksidaz üretimini artırır. NADPH oksidaz $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna neden olmaktadır (98) .

Yağ dokusu vücutta farklı bölgelerde lokalize olmuştur. Bu farklı lokalizasyon farklı fonksiyonları da beraberinde getirmektedir. Genel olarak deri altı yağ dokusu TG depolanmasında, visseral yağ dokuları da metabolik faaliyetlerin düzenlenmesinden sorumludur. Salgılanan adipokinler yönünden de dokular arasında farklılıklar vardır (4).

Çalışmamızda ölçtüğümüz adipokinlerden leptin seviyelerini obez ve NAC grubunda kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0.003$) (Tablo 19, Şekil 37). Ayrıca plazma leptin seviyeleri ile visseral yağ dokusundaki GSH arasında negatif korelasyon gözlemlendi ($p=0.019$) (Tablo 20). Bu dokuda, SOD aktivitesinde de anlamlı bir azalma bulunmaktaydı ($p=0.009$) (Şekil 30). Leptin başlıca subkutan dokudan salgılanan ve obezite ile birlikte serumda konsantrasyonu artan bir proteindir. Enerji sarfiyatı ve iştahın düzenlenmesinde rol alır. Subkutan dokudaki yağ kitlesi ile orantılı olarak salgılanır (17). Gen ekspresyonu çalışmamızda da subkutan dokuda obez grupta 4,5 katlık bir leptin artışı gözlemlenmiştir ($p=0.004$) (Şekil 40). Sonuçlarımıza göre, her ne kadar visseral yağ dokusundaki SOD ve GSH plazma leptin seviyeleri ile korele olsa da, obeziteye bağlı plazma leptin seviyesindeki artışın subkutan yağ dokusu kaynaklı olduğu görüldü.

Adiponektin insülin duyarlılığını artıran ve obez bireylerde vücut ağırlığı ile negatif korelasyon gösteren bir proteindir. Visserel yağ dokusunda ekspresyonu subkutan dokudan daha fazladır (4, 17). Çalışmamızda serum adiponektin seviyeleri yönünden bir fark gözlemlenmezken gen ekspresyonu yönünden çalışılan tüm yağ dokularında adiponektin sentezi düşük bulunmuştur, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 37-40). Barnea ve arkadaşları yüksek yağlı diyetle besledikleri farelerde benzer sonuçları bulmuştur (107). Dokularda adiponektin ekspresyonları düşük bulunurken plazma adiponektin konsantrasyonlarında değişim gözlemlenmemiştir. Williams ve arkadaşları epididimal yağ dokusunda yaptıkları çalışmada, uzun dönem (16 hafta) yüksek yağlı diyetle besledikleri sıçanlarda epididimal dokuda adiponektin mRNA seviyelerinde azalma bulurken, plazma adiponektin seviyeleri anlamlı derecede daha yüksek gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada, kısa dönemde ise hem plazma hem de mRNA seviyeleri daha düşük bulunmuştur (108). Ekspresyon ve plazma değerleri arasındaki bu fark uzun dönemde adiponektinin post-transkripsiyonel mekanizmasının yeniden düzenlenmesinin sonucu olabilir. Yapılan çalışmalarda adiponektin ile oksidatif stres markırları arasında negatif korelasyon gösterilmiştir (8). Bizim sonuçlarımızda da obez grupta OSİ ile adiponektin arasında negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir ($r=-0.829$, $p=0.042$) (Tablo 21). Ayrıca yukarıda belirtildiği gibi adiponektin insülin duyarlılığını artıran bir proteindir. Obez grupta insülin seviyeleri ile adiponektin

seviyeleri arasında yine negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.886$, $p=0.019$) (Tablo 21).

Rezistin insülin rezistansını ve glukoz intoleransını uyaran bir proteindir. Obezite ile miktarının arttığını ifade eden çalışmalar olmakla beraber atletlerde de yüksek resisitinin miktarları gözlenmiştir. İnsanlarda resistinin sentez yeri makrofajlar, rodentlerde beyaz yağ dokusudur (17, 109). Çalışmamızda serum resisitinin seviyeleri yönünden herhangi bir fark bulunmadı. Ancak, obez grupta subkutan ve NAC grubunda perirenal yağ dokusundaki GSH seviyeleri ile plazma rezistin miktarı arasında pozitif korelasyon gözlemlendi ($r=0.94$, $p=0.005$) (Tablo 20). Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, perirenal ve subkutan dokuda mRNA ekspresyonunun artmış olması göz önüne alındığında bu iki dokuda da rezistin sentezi ile GSH arasında sentezi düzenleyen bir mekanizmanın olma ihtimali yüksektir.

Apelin kalp, karaciğer, akciğer, beyin, böbrek ve yağ dokusu gibi bir çok organda sentezlenen ve kardiovasküler fonksiyonu ve sıvı hemostazını düzenleyen, dolaşımda farklı amino asit sayılarına sahip izoformları olan bir proteindir (109). Obez grupta subkutan yağ dokusunda apelin mRNA ekspresyonu artmış almasına rağmen ($p=0.03$) (Şekil 40), serumda yaptığımız ölçümlerde apelin miktarında herhangi bir farklılık bulamadık (Şekil 37). Martinez ve arkadaşları kafeterya diyeti ile besledikleri sıçanlarda yaptıkları çalışmada, subkutan yağ dokusunda apelin ekspresyonunu retroperitoneal yağ dokusundan daha fazla bulmuşlardır (110). C vitamini verilen grupta mRNA seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda NAC uygulanan grupta subkutan yağ dokusunda apelin mRNA ekspresyonu obez gruba göre daha düşük bulunmuştur. Yukarıda da bahsedildiği gibi apelin yağ dokusunun dışında birçok dokuda da sentezlenmektedir. Subkutan dokudaki artışa rağmen diğer dokularda ekspresyonun azalmasına bağlı olarak serum apelin seviyelerinde değişiklik meydana gelmemiş olabilir. Apelin ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu peptidin kardiyomiyositlerde serotonin ile uyarılan oksidatif strese karşı hücreyi koruduğu ve bunu CAT aktivitesini ve gen ekspresyonunu artırarak yaptığı ortaya konmuştur. Yine farelere 0.1 $\mu\text{mol/kg/gün}$ dozda, dört hafta boyunca apelin uygulamasının plazma MDA seviyelerini azaltırken CAT aktivitesini miyokartta arttırdığı gözlenmiştir (111). Obez grupta perirenal SOD ile plazma apelin seviyesi arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir ($r=0.88$, $p=0.019$)

(Tablo 20). Yine obez grupta TNF- α ile apelin arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir ($r=-0,82$, $p=0.42$) (Tablo 21). Obezite gözlenen oksidatif stresin ve inflamasyonun önemli bir nedeni olan TNF- α ile apelin arasındaki negatif korelasyon antioksidan özelliği olan apelinin miktarının azalmasına ve oksidatif stresin etkisinin daha belirgin olmasına katkı sağlayabilir.

Obezitede kronik inflamasyonun varlığı kabul edilir. İnflamasyon inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu, C-reaktif protein (CRP) nin üretimi, lökosit sayısında ve aktivitesinde artmayla karakterizedir. Yağ dokusu IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri eksprese eder (98). Çalışmamızda TNF- α ve IL-6 seviyeleri yönünden gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 19). Obezitede miktarı artan bu sitokinlerin ana kaynağı yağ hücrelerinden daha çok stroma vasküler dokudur. Bu dokuda özellikle serbest yağ asitleri bu sitokinlerin ekspresyonlarını düzenlemektedir. Dolayısıyla diyet yağ asitlerinin çeşitliliği sitokin üretimini etkilemektedir. Özellikle ω -3 yağ asitleri antiinflamatuvar etki göstermektedir (112). Çalışmamızda bu sitokinlerin seviyesinde değişiklik olmaması kullandığımız yüksek yağ içerikli diyetteki yağ asitlerine bağlı olabilir. Ancak, diyetin yağ asiti kompozisyonu bilinmediği için bu etkiyi tam olarak değerlendirebilmek mümkün olamamaktadır. Yine visseral yağ dokularından sentezlenen ve diyetle bulunan retinoik asit içeriğinden etkilenen, tip II diyabet patogenezinde önemli rolü olduğu iddia edilen RBP-4 miktarı obez grupta yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 19).

Çalışmamızda, oksidatif stres göstergesi olarak kullandığımız MDA ve protein karbonil grubu yönünden değerlendirme yapıldığında obez ve NAC grubunun birer dokusu hariç gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 34,35). MDA ölçümlerinde tüm yağ dokularında MDA seviyeleri obezlerde daha yüksekti (Şekil 34). Ancak, sadece obez ve NAC grubunda perirenal yağ dokusunda MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu ($p=0.004$) (Şekil 34). NAC uygulanan gruplarda MDA seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek, obez gruba göre daha düşüktü. Ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmamasında büyük standart sapma değerlerinin etkili olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 34). Dokular arasındaki yağ asidi içeriğinin farklı olması ve doymuş ve doymamış yağ asidi

içerikleride dokularda biriken yağların bileşimini etkileyeceği için (17) oksidasyona duyarlılıklarını da etkilemesi bu süreçte önemli olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kloroform ekstraksiyonu sırasındaki zorluklar ve yüksek lipid içeriğinin interferansı ölçümlerin hassasiyetini etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, MDA'nın TBA ile oluşturduğu renkli kompleks spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilmiştir. Yağ dokusu yüksek lipid içeriği ve kloroform ekstraksiyonundaki zorluklardan dolayı bu yöntem için uygun olmayabilir. MDA seviyelerinde gözlenen değişikliklerde yüksek standart sapmayı ve TBA ile reaksiyona giren diğer aldehit türlerinin etkisini azaltmak için yağ dokusunda MDA ölçümleri HPLC kullanılarak floresan dedektörde yapılabilir.

NADPH oksidazın yanı sıra diğer adipokinlerin gen ekspresyonları değerlendirildiğinde gruplar arasında değişiklikler olmakla beraber yine büyük standart sapmalardan dolayı istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır (Şekil 38-40). Bunda kullanılan RNA izolasyon kitlerine yüksek lipid içeriğinin olumsuz etkileri ve kullanılan dokuların, özellikle subkutan yağ dokusunun doku içeriğinin homojen olmamasına bağlı olarak homojenizasyon standardizasyonu sırasında yaşanan zorluklar etkili olabilir. Ayrıca yağ dokusunun donma noktasının diğer dokulara göre daha düşük olması, homojenizasyon sırasında dokunun çok hızlı çözünmesine bu yüzden de diğer dokulara nazaran daha fazla RNA kaybı ve kırıklarına sebep olabileceği düşünülmektedir.

Diyetle indüklenmiş obez modellerde antioksidan enzimlerdeki azalış farklı türdeki deney hayvanlarında ve farklı yağ dokularında gösterilmiştir. Bu çalışmalarda C vitamini, E vitamini gibi antioksidanların etkinliği de incelenmiştir. Sonuçlarımız bahsedilen çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (110, 113). Tüm antioksidan enzim ölçümlerinde obez gruptaki değerler kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Ancak sadece visceral yağ dokusunda obez gruptaki düşüşler her üç enzim için de (SOD, CAT, GPx) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 30-32). Obeziteye bağlı yağ dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı diğer çalışmalarda da ifade edilmiştir (98). Bu azalış obezite ile birlikte yağ dokusunda seyreden oksidatif stresin önemli bir kaynağıdır. NAC uygulaması ile birlikte her üç enzimin aktivitesinde artış gözlenmiş ancak bunlar anlamlı bulunamamıştır. GSH yönünden gruplar

değerlendirildiğinde, obez grupta GSH'nin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu artış doku içinde artan ve oksidasyona yatkın lipidlerin oksidasyonunu engellemek için canlının geliştirdiği bir dekompenzasyon mekanizması olabilir. NAC uygulamasının yağ dokularında GSH miktarını genel olarak artırdığı (Şekil 33) ancak subkutan dokuda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görüldü. Bu sonuç NAC'ın glutatyon öncülü bir bileşik olmasından kaynaklanmaktadır (96).

Ölçülen oksidan ve antioksidan belirteçler ile salgılanan adipokinler arasındaki ilişki incelendiğinde (Tablo 20), bulunan korelasyonlarda adiponektin ile perirenal MDA ve subkutan karbonil grubu arasındaki ilişki kayda değerdir. Adiponektinin seviyelerinin oksidatif stresle ters ilişkili olduğu görülmüştür. Benzer sonuç Shen ve arkadaşlarının E vitamini kullanarak yaptığı araştırmada da tespit edilmiştir (8, 113).

Sonuç olarak, yüksek yağ içerikli diyetle uyardığımız obez modellerde, farklı bölgelerde lokalize olmuş yağ dokularında, oksidatif stres ve antioksidan enzim profillerinin değişkenlik gösterdiğine, bazı adipokinlerin diyetten etkilendiğine, oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan enzimler ile bazı adipokinler arasında ilişki olduğuna, NAC uygulamasının ölçülen adipokinlere, yağ dokularında görünen oksidatif stres ve antioksidan enzim seviyelerine ciddi bir etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tschop M, Heiman ML, (2001). Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 307-319.
2. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC, (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15: 798-808.
3. Gema Fröhbeck (2001). *Adipose Tissue Protocols. Overview of Adipose Tissue and Its Role in Obesity and Metabolic Disorders.* (Ed: Kaiping Yang). New jersey, 1-22.
4. Ibrahim MM, (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11: 11-18.
5. Sethi JK, Vidal-Puig AJ, (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48: 1253-1262.
6. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE, (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 54: 1847-1856.
7. MacDougald OA, Burant CF, (2007). The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metab* 6: 159-161.
8. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M *et al.*, (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
9. Trayhurn P, Beattie JH, (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60: 329-339.
10. Kershaw EE, Flier JS, (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556.
11. Wajchenberg BL, (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21: 697-738.
12. 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.
13. Karbonits M, (2008). *Obesity and Metabolism* 92-260.
14. Haslam DW, James WP, (2005). Obesity. *Lancet* 366: 1197-1209.
15. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR, (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256.
16. Kushner R.F BDH, (2007). *Treatment of the Obese Patient.* 86-140.

17. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR, (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research* 39: 715-728.
18. Morrison RF, Farmer SR, (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
19. Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR, (2008). Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6: 343-368.
20. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P41159>. [Accessed 10 December 2012].
21. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P50596>. [Accessed 10 December 2012].
22. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15848>. [Accessed 10 December 2012].
23. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B, (2004). Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 219: 9-15.
24. samuel T. Nadler jPS, Kathryn L. Schueler, Gene Tanimoto, Brian S. Yandell, Alan D.Attie, (2000). The Expression of Adipogenic Genes is Decreased in Obesity and Diabetes Mellitus. *PNAS* 97: 11371-11376.
25. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA, (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930-1935.
26. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M *et al.*, (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295.
27. Kadowaki T, Yamauchi T, (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26: 439-451.
28. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H *et al.*, (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103: 1057-1063.

29. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N *et al.*, (2002). Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106: 2767-2770.
30. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S, (2005). Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 109: 243-256.
31. Lazar MA, (2007). Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res* 39: 710-716.
32. Banerjee RR, Lazar MA, (2003). Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med (Berl)* 81: 218-226.
33. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA, (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312.
34. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG *et al.*, (2001). A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 502-506.
35. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF, (2000). Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 74: 34-41.
36. Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllyla S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuholta J *et al.*, (2002). Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 91: 434-440.
37. Kleinz MJ, Davenport AP, (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 107: 198-211.
38. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C *et al.*, (2001). Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 1538: 162-171.
39. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S *et al.*, (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 471-476.
40. O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ, (2000). Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 1492: 72-80.
41. Mesmin C, Dubois M, Becher F, Fenaille F, Ezan E, (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the

- expected circulating apelin peptides in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24: 2875-2884.
42. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M, (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 99: 87-92.
 43. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernandez-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Bernardi M, Arroyo V, Jimenez W, (2008). The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* 48: 1193-1201.
 44. Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, Leschnik M, Leibbrandt A *et al.*, (2007). Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res* 101: e32-42.
 45. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y, (2004). Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 18: 1909-1911.
 46. Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y, (2002). Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 539-545.
 47. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA, (2006). Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 296: 177-189.
 48. Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, Knibiehler B, Audigier Y, (2002). Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev* 110: 183-186.
 49. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, Hinuma S, Baba A, (2004). Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 395-400.
 50. Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H, (2007). Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 148: 2690-2697.
 51. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I *et al.*, (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146: 1764-1771.

52. Lee DK, George SR, O'Dowd BF, (2006). Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol Sci* 27: 190-194.
53. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05231>. [Accessed 10 December 2012].
54. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P20607>. [Accessed 10 December 2012].
55. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD, (1997). Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 6: 929-955.
56. Eder K, Baffy N, Falus A, Kulop AF, (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation research*
57. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01375>. [Accessed 10 December 2012].
58. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/E7DB74>. [Accessed 10 December 2012].
59. Idriss HT, Naismith JH, (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique* 50: 184-195.
60. Zeyda M, Stulnig TM, (2009). Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology* 55: 379-386.
61. van Harmelen V, Dicker A, Ryden M, Hauner H, Lonnqvist F, Naslund E, Arner P, (2002). Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. *Diabetes* 51: 2029-2036.
62. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02696>. [Accessed 10 December 2012].
63. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06768>. [Accessed 10 December 2012].
64. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04916>. [Accessed 10 December 2012].
65. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02753>. [Accessed 10 December 2012].
66. Kloting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schon MR *et al.*, (2007). Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 6: 79-87.

67. Akyol Ö, (2004). Şizofrenlerde Oksidatif Sres. Kocatepe Tıp Dergisi 5: 15-25.
68. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK, (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 28.
69. McCord JM, (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 26: 351-357.
70. Sinatra ST, DeMarco J, (1995). Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn Med* 59: 579-588.
71. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N, (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15: 316-328.
72. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23-38.
73. Ray R, Shah AM, (2005). NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 109: 217-226.
74. Van Heerebeek L, Meischl C, Stooker W, Meijer CJ, Niessen HW, Roos D, (2002). NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol* 55: 561-568.
75. İşbir T, (1994). Antioksidan Sistemler, Endotel. 92-98.
76. Benzer F. OST, (2003). Fasciola Hepaticale Enfekte Koyunlarda Lipit Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 27: 657-661.
77. Galinier A, Carriere A, Fernandez Y, Caspar-Bauguil S, Periquet B, Periquet A, Penicaud L, Casteilla L, (2006). Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats. *FEBS Lett* 580: 6391-6398.
78. Folz RJ, Guan J, Seldin MF, Oury TD, Enghild JJ, Crapo JD, (1997). Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 393-403.
79. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA, (1996). Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry* 35: 4287-4297.

80. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00441>. [Accessed 10 December 2012].
81. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04179>. [Accessed 10 December 2012].
82. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P07632>. [Accessed 10 December 2012].
83. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P07895>. [Accessed 10 December 2012].
84. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08294>. [Accessed 10 December 2012].
85. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q08420>. [Accessed 10 December 2012].
86. Antonyuk SV, Strange RW, Marklund SL, Hasnain SS, (2009). The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding. *J Mol Biol* 388: 310-326.
87. Goyal MM, Basak A, (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* 1: 888-897.
88. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04040>. [Accessed 10 December 2012].
89. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04762>. [Accessed 10 December 2012].
90. Akkuş İ, (1995). Serbest Radikal ve Fizyolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya 1-128.
91. Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG, (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1295: 222-238.
92. Electronic resources [online]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_peroxidase. [Accessed 10 December 2012].
93. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P36969>. [Accessed 10 December 2012].
94. Anderson ME, (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 111-112: 1-14.
95. Electronic resources [online]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione>. [Accessed 10 December 2012].

96. Kelly GS, (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 3: 114-127.
97. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H, (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 53: 169-180.
98. Vincent HK, Taylor AG, (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 30: 400-418.
99. Sun Y, Oberley LW, Li Y, (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497-500.
100. Aebi H, (1987). *Methods of Enzymatics Analysis*. 3: 273-285.
101. Garcia SC, Schott K, Charao M, Moro A, Bulcao R, Grotto D, Valentini J, Bohrer D *et al.*, (2008). Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients. *Biomed Chromatogr* 22: 460-468.
102. Mihara M, Uchiyama M, (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271-278.
103. Griffiths HR, *Measuring in Vivo Oxidative Damage, A Pratical Approach*. Willey,
104. Bradford MM, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
105. Amin KA, Nagy MA, (2009). Effect of Carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetol Metab Syndr* 1: 17.
106. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK, (2003). Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14: S233-236.
107. Barnea M, Shamay A, Stark AH, Madar Z, (2006). A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression. *Obesity (Silver Spring)* 14: 2145-2153.
108. Naderali EK, Estadella D, Rocha M, Pickavance LC, Fatani S, Denis RG, Williams G, (2003). A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clin Sci (Lond)* 105: 403-408.
109. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ, (2010). The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 323: 20-34.
110. Garcia-Diaz D, Campion J, Milagro FI, Martinez JA, (2007). Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers. *Mol Cell Biochem* 305: 87-94.

111. Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, Kunduzova O, (2010). Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 584: 2363-2370.
112. Cawthorn WP, Sethi JK, (2008). TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett* 582: 117-131.
113. Shen XH, Tang QY, Huang J, Cai W, (2010). Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 235: 47-51.

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 : "Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusunda Oksidan-Antioksidan Dengenin İncelenmesi"
Çalışmacılar : Doç.Dr.Ahmet ALVER, Arş.Gör.Cemil KAHRAMAN,
Yük.Lis.Öğr.Akın BODUR
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya ABD.

Etik Kurul Dosya No 2010/39	Etik Kurul Toplantı Tarihi 02.11.2010	Etik Kurul Toplantı No 2010/20	Etik Kurul Karar No 3
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında "Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusunda Oksidan-Antioksidan Dengenin İncelenmesi" başlığını taşıyan tez 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. (02.11.2010)

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

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı Adı : KAHRAMAN Cemil
Doğum tarihi ve yeri : 14.04.1975 Vakfikebir
Medeni hali : Evli
Telefon : 0534 826 51 45
E- Posta : cemilce75@hotmail.com
Yazışma adresi : Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı

EĞİTİM BİLGİLERİ

	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	: K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2013
Yüksek lisans	: A.İ.B.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2003
Lisans	: İstanbul Üniversitesi	2001
Lise	: Trabzon İmam Hatip Lisesi	1997

AKADEMİK MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (yıl)
Araştırma Görevlisi	Düzce Üniversitesi	6
Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	6

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Obezite

YAYINLAR BİLDİRİLER

1. Yavuz O, Yavuz T, Kahraman C, Yeşildal N, Bundak R (2004). The relationship between iron status and thyroid hormones in adolescents living in an iodine deficient area. J Pediatr Endocrinol Metab.1443-1449.
2. Alver A, İmamoğlu M, Mentese A, Şentürk A, Samut Bülbül S, Kahraman C, Sümer A,(2013). Malondialdehyde and CA II autoantibody levels are elevated in children with undescended testes. World j. Urol
3. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C, (2013). Effects of Resveratrol on Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats, The ScientificWorld Journal, 1-6
4. (Poster P0043) E. Baltacıoglu, M. Aslan Kehribar, P. Göker, O. Saraç Atagün, A. Alver, C. Kahraman, E. Karabulut (2012). Relationship between total oxidant status and bone resorption markers in serum and gingival crevicular fluid in patients with periodontitis
5. (Poster P070, Biyokimya Kongresi 2012) İnce İ, Alver A, Canpolat S, Saral S, Kahraman C, (2012). Kronik apelin uygulamasının karaciğer antioksidan enzimleri (CAT, SOD, GSH-PX) üzerine etkisinin incelenmesi.
6. (Poster, P074, Biyokimya Kongresi 2012) Kahraman C, Saral S, İnce İ, Bodur A, Canpolat S, Alver A (2012). Ratlarda kronik apelin uygulamasının serum melatonin seviyelerine etkisi
7. (Poster Biyokimya Kongresi 2013) Kahraman C, Alver A,İnce İ (2013). Diyetle indüklenmiş obezitede n-asetilsistein uygulamasının leptin sentezi ve gen ekspresyonu üzerine etkisi
8. (Poster Biyokimya Kongresi 2013) Kahraman C, Alver A , Şentürk A. (2013) Diyetle indüklenmiş obezitede n-asetilsistein uygulamasının rezistin sentezi ve gen ekspresyonu üzerine etkisi

HOBİLER

Futbol, trekking (doğa yürüyüşü)