

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**METABOLİK SENDROM OLUŞTURULMUŞ RATLARIN
KARACİĞER, YAĞ DOKUSU VE SERUMLARINDA DESNUTRİN İLE
CHEMERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Musa YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ**

**ELAZIĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murad ATMACA

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Nevin İLHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____
..... _____
..... _____

TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda; uzmanlık eğitimimde; mesleki bilgi, beceri, pratik ve teorik anlamda yetiştirmemi sağlayan, tez çalışmalarım sırasında gerekli her türlü desteği ve yardımı benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nevin İLHAN'a,

Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Necip İLHAN'a, Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU'ya, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Prof. Dr. Süleyman AYDIN'a ve Doç. Dr. Dilara KAMAN'a,

Çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında görevli araştırma görevlisi arkadaşlarım ile Biyokimya Laboratuvarında görevli personel arkadaşlarıma, Uzm. Dr. Mehmet KALAYCI'ya, Uzm. Dr. Hakan AYYILDIZ'a, Arş. Gör. Dr. Yalçın CENGİZ'e ve Tıp Fakültesi dönem 3 öğrencisi Yusuf YEL'e,

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Biriminde (FÜDAM) tezimin deneysel çalışmalarını gerçekleştirmemde bana yardımcı olan personele, Veteriner Hekim Zafer ŞAHİN'e, Yusuf DÖĞÜŞ'e ve bu tez çalışmasını TF. 13.12 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelendirme (FÜBAP) birimine,

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında bana olan sevgi ve desteklerini bir an bile eksik etmeyen ve sabırlarını sunan sevgili annem, babam ve kardeşime,

Sadece iyi günümde değil her anımda varlığıyla hayatımı renklendiren benim sevgili, özverili, biricik eşim Selin'e ve kızımız Tuğçe'ye,

Teşekkür etmekten büyük mutluluk ve onur duyarım.

Dr. Musa YILMAZ

ÖZET

Prevalansı Dünya genelinde hızla artan metabolik sendrom (MetS), diyabet ve kalp damar sistemi hastalıklarıyla yakından bağlantılı önemli bir halk sağlığı sorunudur. MetS etyopatogenezinde inflamasyon, insülin direnci, dislipidemi ve peptid yapılı hormonlar gibi çeşitli faktörler olduğu öne sürülse de, altta yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, MetS oluşturulan ratların karaciğer ve yağ dokularında; adipoz trigliserit lipaz (Desnutin/ ATGL) ve chemerin hormonlarının ekspresyonlarının nasıl değiştiğini ve bu değişimin sistemik dolaşımdaki yansımalarının nasıl olduğunu araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 8 haftalık yaklaşık 260-290 gram ağırlığında *Sprague Dawley* cinsi 14 adet rat kullanıldı. MetS grubu ratlar deney boyunca standart rat yemi ve içme suyuna katılan %10 fruktoz ile *ad libitum* olarak beslenirken, kontrol grubu ratlara sadece standart rat yemi verildi. Rutin biyokimyasal parametreler otoanalizörde ölçüldü. Dokuların ve serumların chemerin, Desnutin/ ATGL ve insülin düzeyleri enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. HOMA-IR düzeyleri formül kullanılarak hesaplandı. MetS grubunda serum glukoz, ALT, AST, trigliserit, LDL-K, total kolesterol, insülin, HOMA-IR ve chemerin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek iken ($P < 0,05$), serum HDL-K ve Desnutin/ ATGL düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu tespit edildi ($P < 0,05$). Ayrıca MetS grubundaki ratların karaciğer ve yağ dokularındaki Desnutin/ ATGL ekspresyonlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü ($P < 0,05$), karaciğer ve yağ dokusu chemerin düzeylerinin ise anlamlı bir şekilde yükseldiği tespit edildi ($P < 0,05$).

Sonuç olarak, MetS; chemerin miktarlarının artmasına, Desnutin/ ATGL miktarlarının ise azalmasına neden olmaktadır. Dolayısı ile bu iki hormonun MetS'in patogenezinde doğrudan rol aldığını ve bu bulguların MetS'in altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Metabolik Sendrom, chemerin, Desnutin/ ATGL, karaciğer ve yağ doku

ABSTRACT

Investigation of Serum, Liver and Adipose Tissues Desnutrin with Chemerin Expressions in Rats With Induced Metabolic Syndrome

The metabolic syndrome (MetS) with an ever increasing prevalence around the world is a public health problem directly related to diabetes and cardiovascular system diseases. Although it is asserted that there are various factors such as inflammation, insulin resistance, dyslipidaemia, and peptide hormone in MetS etiopathogenesis, the underlying mechanisms have not been fully clarified yet. Therefore, in this study we aimed to investigate how the expressions of adipose triglyceride lipase (Desnutrin/ATGL) and chemerin hormones change and how the reflections of this change in the systemic circulation are in liver and adipose tissues of rats with MetS.

In this study 14 eight weeks of age *Sprague Dawley* rats with a weight of about 260-290 gr were used. Whilst rats were being fed *ad libitum* with standard rodent chow and 10% fructose added to the potable water during the experiment, the rats in control group were given only rodent chow. Routine biochemical parameters were measured by using autoanalyzer. Levels of chemerin, Desnutrin/ATGL and insulin of tissues and serums were measured by using enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) technique. HOMA-IR levels were calculated benefiting from formula. Whilst levels of serum glucose, ALT, AST, triglyceride, LDL-K, total cholesterol, insulin, HOMA-IR and chemerin are high ($P < 0.05$) in a statistically significant way, levels of HDL-K and Desnutrin/ATGL were determined low ($P < 0.05$) in a significant way compared to the control group. Furthermore, it was determined that the expressions of Destunrin/ATGL in liver and adipose tissues of rats in MetS group decreased in a statistically significant way compared to the control group ($P < 0.05$), the chemerin levels of liver and adipose tissue increased in a statistically significant way ($P < 0.05$).

Consequently, MetS causes chemerin amounts to increase, Desnutrin/ATGL amounts to decrease. Therefore, we consider that these two hormones take part in pathogenesis of the MetS directly and these findings can help to clarify the mechanisms underlying the MetS.

Key words: Metabolic syndrome, chemerin, desnutrin/ATGL, liver, adipoz tissue

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-------------|
| BAŞLIK SAYFASI | |
| DEKANLIK ONAYI | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| TABLO LİSTESİ | ix |
| ŞEKİL LİSTESİ | x |
| KISALTMALAR LİSTESİ | xiii |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Metabolik Sendrom | 1 |
| 1.1.1. Metabolik Sendrom Tanımı ve Tanı Kriterleri | 1 |
| 1.1.2. Metabolik Sendrom Terminolojisi ve Kısa Tarihçesi | 2 |
| 1.1.3. Farklı Tanı Kriterleriyle Metabolik Sendrom | 2 |
| 1.1.4. Metabolik Sendromun Epidemiyolojisi | 6 |
| 1.1.5. Metabolik Sendrom Etyopatogenezi | 7 |
| 1.2. Deneysel Olarak Oluşturulan Metabolik Sendrom Modelleri | 9 |
| 1.2.1. Yağ İçeriği Fazla Olan Diyet İle Oluşturulan Metabolik Sendrom | 9 |
| 1.2.2. Karbonhidrat ve Yağ İçeriği Yüksek Olan Diyet ile Oluşturulan Metabolik Sendrom | 9 |
| 1.2.3. Sukroz ile Oluşturulan Metabolik Sendrom | 10 |
| 1.2.4. Fruktoz ile Oluşturulan Metabolik Sendrom | 11 |
| 1.3. Fruktoz Biyokimyası ve Metabolik Sendrom | 11 |
| 1.3.1. Fruktozun Yapısı | 11 |
| 1.3.2. Fruktozun Absorbsiyonu | 12 |
| 1.3.3. Fruktozun Metabolizması | 12 |
| 1.4. Karaciğer 'in Metabolik Sendromdaki Rolü | 14 |
| 1.5. Yağ dokusunun Metabolik Sendromdaki Rolü | 15 |
| 1.6. Chemerin | 16 |
| 1.6.1. Sentezlenmesi ve Salgılanması | 16 |
| 1.6.2. Proteolitik Süreçler | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 1.6.3. Reseptörler ve İletişim (Sinyalizasyon) | 19 |
| 1.6.4. İnflamasyonda Chemerin'in Rolü | 20 |
| 1.7. Desnutrin/ATGL ve Yağ Metabolizması | 22 |
| 1.7.1. Lipolizin Düzenlenmesi | 23 |
| 1.7.2. Lipolizdeki Klasik Enzim: Hormon Sensitif Lipaz | 25 |
| 1.7.3. Desnutrin/ATGL: Lipolizde Yeni Bir Hormon | 25 |
| 1.7.3.1. Desnutrin/ATGL Enzimolojisi | 26 |
| 1.7.3.2. Desnutrin/ATGL Geni, mRNA'sı ve Protein Yapısı | 26 |
| 1.7.3.3. Desnutrin/ATGL'nin Fizyolojik Fonksiyonu | 28 |
| 1.7.3.4. Desnutrin/ATGL'nin Regülasyonu | 30 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 32 |
| 2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Protokolü | 32 |
| 2.2. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması | 33 |
| 2.3. Dokuların Homojenizasyonu | 33 |
| 2.4. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümleri | 34 |
| 2.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yönteminin Temel Presibi ve Biyolojik Numelerin Analizleri | 34 |
| 2.5.1. Chemerin ELISA Çalışması | 37 |
| 2.5.1.1. Reaktiflerin Hazırlanışı | 38 |
| 2.5.1.2. Analiz Aşaması | 39 |
| 2.5.1.3. Okuma Aşaması | 40 |
| 2.5.2. Desnutrin/ATGL Elisa Çalışması | 41 |
| 2.5.2.1. Reaktiflerin Hazırlanışı | 42 |
| 2.5.2.2. Analiz Aşaması | 43 |
| 2.5.2.3. Okuma Aşaması | 45 |
| 2.5.3. Rat İnsülin ELISA Çalışması | 46 |
| 2.5.3.1. Reaktiflerin Hazırlanışı | 47 |
| 2.5.3.2. Analiz Aşaması | 47 |
| 2.5.3.3. Okuma Aşaması | 49 |
| 2.6. Western Blot Çalışma Protokolü | 50 |
| 2.6.1. Qubit Fluorometre ile Protein Miktarlarının Tayini | 51 |
| 2.6.2. Jele Yüklenecek Protein Örneklerinin Hazırlanması | 53 |

| | |
|--|------------|
| 2.6.3. Dikey Jel Elektroforez Sistemi Kullanımı | 55 |
| 2.6.4. iBlot Dry Blotting System ile Blotlama İşlemi | 56 |
| 2.6.5. Kromojenik Western Blot İmmünoanalizasyon Kit Prosedürü | 56 |
| 2.7. İstatistiksel Değerlendirme | 58 |
| 3. BULGULAR | 59 |
| 3.1. Biyokimyasal Parametreler | 59 |
| 3.1.1. Rutin Biyokimyasal Parametreler | 59 |
| 3.1.2. Lipid Profili | 61 |
| 3.1.3. Hormonal Değişimler | 62 |
| 3.1.3.1. İnsülin Düzeylerindeki Değişimler | 62 |
| 3.1.3.2. Chemerin Düzeylerindeki Değişimler | 63 |
| 3.1.3.2.1 Kontrol Grubu Ratlarda Serum Chemerin Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri | 64 |
| 3.1.3.2.2. Metabolik Sendrom Grubu Ratlarda Serum Chemerin Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri | 68 |
| 3.1.3.3. Desnutrin/ATGL Seviyelerinin Değişimleri | 72 |
| 3.1.3.3.1. Kontrol Grubu Ratlarda Serum Desnutrin/ATGL Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri | 73 |
| 3.1.3.3.2. MetS Grubu Ratlarda Serum Desnutrin/ATGL Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri | 77 |
| 4. TARTIŞMA | 82 |
| 5.KAYNAKLAR | 90 |
| 6.ÖZGEÇMİŞ | 109 |

TABLO LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Metabolik sendrom tanısını koymada yaygın olarak kullanılan üç çalışma grubun parametreler üzerinde ortak yönleri ve farkları | 3 |
| Tablo 2. Metabolik sendromun ülkelere göre yaygınlığı (22)..... | 7 |
| Tablo 3. Standart rat yeminin içeriği (132, 133) | 32 |
| Tablo 4. Friedewald formülü | 34 |
| Tablo 5. ELISA çalışması için gerekli malzeme listesi..... | 36 |
| Tablo 6. Chemerin ELISA kit içeriğinde bulunan malzemeler | 37 |
| Tablo 7. Desnutrin/ATGL ELISA kit içeriğinde bulunan malzemeler | 42 |
| Tablo 8. İnsülin ELISA kit içeriğinde bulunan malzemelerin listesi | 46 |
| Tablo 9. Western Blot çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi..... | 51 |
| Tablo 10. Kontrol ve MetS gruplarına ait karaciğer ve yağ dokusu örneklerindeki protein miktarları..... | 52 |
| Tablo 11. Kontrol ve MetS grubu ratların karaciğer dokuları için jele yüklenecek karışım miktarları | 54 |
| Tablo 12. Kontrol ve MetS grubu ratların yağ dokusu için jele yüklenecek karışım miktarları | 54 |
| Tablo 13. Western blot çalışması için solüsyonların hazırlanışı | 57 |
| Tablo 14. Kontrol ve MetS gruplarına ait ağırlık değişimleri | 59 |
| Tablo 15. Kontrol ve MetS gruplarına ait biyokimyasal ve hormonal değişimler | 60 |
| Tablo 16. Kontrol grubu ratlardaki serum chemerin düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki analizleri (Sperman korelasyon testi) | 65 |
| Tablo 17. MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki analizleri | 68 |
| Tablo 18. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki | 73 |
| Tablo 19. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile diğer parametreler arası ilişki..... | 77 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Farklı çalışma gruplarının metabolik sendrom tanı kriterleri | 5 |
| Şekil 2. Metabolik sendrom patogenezinde yer alan başlıca moleküller ve karşılıklı etkileşimleri..... | 8 |
| Şekil 3. Fruktozun biyokimyasal yollardaki kaderi | 13 |
| Şekil 4. Chemerin aminoasit dizilimi | 18 |
| Şekil 5. Lipolize etki eden hormonlar ve Desnutrin/ATGL'in metabolik etkileri | 24 |
| Şekil 6. Desnutrin/ATGL aminoasit dizilimi | 27 |
| Şekil 7. Sandviç ELISA yöntemi şematizasyonu | 35 |
| Şekil 8. Yarışmalı ELISA yöntemi şematizasyonu | 36 |
| Şekil 9. ELISA plate'inin şematik görünümü | 37 |
| Şekil 10. Chemerin ELISA çalışması için standartların hazırlanışı..... | 39 |
| Şekil 11. Chemerin ELISA basamaklarının şematik görünümü | 40 |
| Şekil 12. Chemerin ELISA çalışması için standart eğri grafiği..... | 41 |
| Şekil 13. Desnutrin/ATGL ELISA çalışması için standartların hazırlanışı..... | 43 |
| Şekil 14. Desnutrin/ATGL ELISA basamaklarının şematik görünümü | 45 |
| Şekil 15. Desnutrin/ATGL ELISA çalışması için standart eğri grafiği..... | 46 |
| Şekil 16. İnsülin ELISA çalışması için standartların hazırlanışı | 48 |
| Şekil 17. İnsülin ELISA basamaklarının şematik görünümü..... | 49 |
| Şekil 18. İnsülin ELISA çalışması için standart eğri grafiği | 50 |
| Şekil 19. <i>Sprague-Dawley</i> cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak rutin biyokimyasal parametrelerin değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması | 61 |
| Şekil 20. <i>Sprague-Dawley</i> cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak lipid profili değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması | 62 |
| Şekil 21. <i>Sprague-Dawley</i> cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak insülin ve HOMA-IR düzeyleri değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması..... | 63 |
| Şekil 22. <i>Sprague-Dawley</i> cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak serum, yağ dokusu ve Kc dokusu chemerin düzeyleri değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması.. | 64 |
| Şekil 23. Kontrol grubu ratlarda serum chemerin ve HOMA-IR arasındaki ilişki.... | 65 |
| Şekil 24. Kontrol grubu ratlarda serum ve yağ dokusu chemerin düzeyleri arasındaki ilişki..... | 66 |

| | |
|--|----|
| Şekil 25. Kontrol grubu ratlarda serum ve karaciğer chemerin düzeyleri arasındaki ilişki..... | 66 |
| Şekil 26. Kontrol grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile serum glukoz arasındaki ilişki..... | 67 |
| Şekil 27. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin ve chemerin düzeyleri arasındaki ilişki..... | 67 |
| Şekil 28. MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki..... | 69 |
| Şekil 29. MetS grubu ratlarda serum ve yağ dokusu chemerin düzeyleri arasındaki ilişki..... | 69 |
| Şekil 30. MetS grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu chemerin düzeyleri arasındaki ilişki | 70 |
| Şekil 31. MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile deney sonu ağırlık arasındaki ilişki | 70 |
| Şekil 32. MetS grubu ratlarda serum chemerin ve desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki | 71 |
| Şekil 33. Karaciğer dokusunda chemerin'in western blotlama yöntemiyle gösterilmesi | 71 |
| Şekil 34. Yağ dokusunda chemerin'in western blotlama yöntemiyle gösterilmesi ... | 72 |
| Şekil 35. <i>Sprague-Dawley</i> cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak desnutrin konsantrasyonu değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması | 72 |
| Şekil 36. Kontrol grubu ratlardaki serum desnutrin düzeyleri ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki | 74 |
| Şekil 37. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki..... | 75 |
| Şekil 38. Kontrol grubu ratlarda serum ve yağ dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki..... | 75 |
| Şekil 39. Kontrol grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki | 76 |
| Şekil 40. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasındaki ilişki | 76 |

| | |
|---|----|
| Şekil 41. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki | 78 |
| Şekil 42. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki..... | 78 |
| Şekil 43. MetS grubu ratlarda serum ve yağ dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki..... | 79 |
| Şekil 44. MetS grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki | 79 |
| Şekil 45. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasındaki ilişki | 80 |
| Şekil 46. Karaciğer dokusunda desnutrinin western blotlama yöntemiyle gösterilmesi | 80 |
| Şekil 47. Yağ dokusunda desnutrinin western blotlama yöntemiyle gösterilmesi | 81 |

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|------------------|--|
| aa | aminoasit |
| AACE | <i>American Association of Clinical Endocrinology</i> |
| ABHD5 | <i>α/β hydrolase domain-containing protein 5</i> |
| ADA | Amerikan Diyabet Cemiyeti |
| AHA/NHLBI | <i>American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute</i> |
| ALT | <i>Alanine Aminotransferase (SGOT)</i> |
| apo | apolipoprotein |
| AST | <i>Aspartate Aminotransferase (SGPT)</i> |
| ATGL | Adipoz trigliserit lipaz |
| ATGL-ko | ATGL-defektli |
| ATP III | <i>Adult Treatment Panel III</i> |
| BAG | Bozulmuş Açlık Glukozu |
| BAT | Kahverengi yağ dokusu |
| BÇ | Bel Çevresi |
| BGT | Bozulmuş Glukoz Toleransı |
| BKO | Bel Kalça Oranı |
| cAMP | <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> |
| CCRL2 | <i>Chemokine (CC motif) receptor-like 2</i> |
| CE | Kolesterol esteri |
| CGI-58 | <i>Comparative gene identification 58</i> |
| CMKLR1 | <i>Chemokine like receptor 1</i> |
| CRP | C-reaktif protein |
| CV | <i>Coefficient of Variation</i> |
| DG | Diaçilgliserol |
| DKB | Diyastolik Kan Basıncı |
| DSÖ | Dünya Sağlık Örgütü |
| EGIR | <i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i> |
| ELISA | <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> |
| ER | Endoplazmik retikulum |
| ERK 1/2 | Ekstrasellüler regulated kinaz 1/2 |

| | |
|--------------------------------|---|
| FÜDAM | Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi |
| GLUT | <i>Glucose Transporter</i> |
| GPCR | <i>G protein-coupled receptor</i> |
| HDL-K | <i>High Density Lipoprotein Cholesterol</i> |
| HOMA-IR | <i>Homeostasis Model Assessment For Insulin Resistance</i> |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |
| HSL | Hormon sensitif lipaz |
| HSL-ko | HSL-defektli |
| IDF | <i>International Diabetes Federation</i> |
| IL-6 | <i>Interleukin 6</i> |
| IL-8 | <i>Interleukin 8</i> |
| IR | İnsülin reseptör |
| IRS | İnsülin reseptör substrat |
| IRS1-4 | İnsülin reseptör substrat 1-4 |
| iPLA2ζ | <i>Calcium-independent phospholipase A2ζ</i> |
| LDL-K | <i>Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i> |
| LPL | Lipoprotein lipaz |
| MetS | Metabolik Sendrom |
| METSAR | Türkiye Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması |
| MG | Monoaçilgliserol |
| MGL | Monoglisericit lipaz |
| NAFL | <i>Non-Alcoholic Fatty Liver</i> |
| NCEP ATP III | <i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i> |
| NCEP | <i>National Cholesterol Education Program</i> |
| NHANES III | <i>National Health and Nutrition Evaluation Survey</i> |
| OA | Osteoartrit |
| PI3K | Fosfotidil inozitol-3 kinaz |
| PKA | Protein kinaz A |
| PKB/AKT | Protein kinaz B/AKT |
| PNPLA 2 | <i>Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2</i> |
| RARRES2 | <i>Retinoic acid receptor responder protein 2</i> |

| | |
|-------------------------------|---|
| RE | Retinil esteri |
| SA-HRP | <i>Streptavidin-Horseradish Peroxidase</i> |
| SGLT 1 | <i>Sodium-dependent glucose cotransporters 1</i> |
| SKB | Sistolik Kan Basıncı |
| SSS | Santral sinir sistemi |
| SYA | Serbest Yağ Asidi |
| TEKHARF | Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması |
| TAG | Triaçilgliserol |
| TG | Trigliserid |
| TIG2 | <i>Tazarotene-induced gene 2 protein</i> |
| Tip2DM | Tip 2 Diyabet |
| TK | Total Kolesterol |
| TMB-S | <i>TMB Substrate</i> |
| TNFα | <i>Tumor necrosis factor alpha</i> |
| VKİ | Vücut Kitle İndeksi |
| VLDL | <i>Very Low-Density Lipoprotein</i> |
| VLDL-K | <i>Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i> |
| WAT | Beyaz Yağ Dokusu |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| YA | Yağ Asidi |
| β-AR | β -Adrenerjik reseptör |

1.GİRİŞ

İnsanlık tarihinde teknolojik gelişmelerin bilime ve yaşam tarzına sayısız katkılar sunduğu bir gerçektir. Bu gelişim sürecinde insanoğlu beden gücünü kullanmaktan uzaklaşmakta, beslenme alışkanlıklarını değiştirmekte ve daha sedanter bir yaşam tarzı benimsemektedir. Özellikle rafine gıdalardan zengin, fast food tarzı beslenme alışkanlıklarının ve sedanter bir yaşam tarzının benimsenmesiyle birlikte çağımızın ve belki de gelecek yüzyılların en büyük sorunu olan obezite ile karşı karşıya kalınmaktadır. Obezite, Latince *Obesus* (kalın veya dolgun) teriminden gelmektedir ve vücutta aşırı beyaz yağ dokusunun (WAT) birikimi ile karakterize bir durumdur. Obezitenin prevalansı korkutucu bir hızda artmaktadır, son tahminlere göre dünyada yaklaşık olarak 1,9 milyar kişi fazla kilolu veya obez olup (1) çağımızın hastalığı olan metabolik sendroma (MetS) yakalanma riski taşımaktadır.

1.1. Metabolik Sendrom

MetS günümüzde sosyoekonomik şartların düzelmesine bağlı olarak tüm dünyada giderek artan ve gelecek yüzyıllarda da yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması sebebiyle ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak gündemdeki yerini koruyacak olan bir modern yaşam hastalığıdır (2,3). MetS; hiperlipidemi, hipertansiyon, hiperinsülinemi ve insülin direnci ile karakterize bir hastalık olup tip 2 diyabet (Tip2DM), kardiyovasküler sistem hastalıkları (KVH) ve aynı zamanda çeşitli kanserler için risk oluşturabilecek ölümcül bir endokrin bozukluktur (4).

Metabolik sendrom kavramının oluşmasındaki süreçten dolayı bu hastalıkla ilgili epidemiyolojik veriler çok çeşitlilik göstermektedir. Prevalanstaki çeşitliliklerin diğer sebepleri de çeşitli çalışma gruplarının birbirinden farklı tanı kriterleri kullanması, yaş aralığı ve etnik gruplardaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Genel itibariyle MetS prevalansı yaş ile birlikte artmakta ve dünya genelinde kadınlarda daha sık görülmektedir (5).

1.1.1. Metabolik Sendrom Tanımı ve Tanı Kriterleri

İnsülin direnci, dislipidemi, santral obezite, hipertansiyon, bozulmuş glukoz toleransı veya diabetes mellitus (DM) ve aterosklerotik durumları içeren klinik bulguların bir arada olması MetS olarak tarif edilmektedir. Bu sayılan klinik bulgulara

son zamanlarda inflamasyon belirteçleri, hemostaz ve fibrinolitik dengenin bozulması da eklenmiştir (6).

1.1.2. Metabolik Sendrom Terminolojisi ve Kısa Tarihçesi

Metabolik sendromun resmi olarak ilk tanımlaması 1998 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılmıştır (7). Daha sonra MetS kavramı 2001 yılında Amerika Birleşik Devletlerin (ABD)'de ulusal kolesterol eğitim programı yetişkin tedavi paneli [*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP: ATP III)] (8) tarafından kabulünden sonra yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bilimsel çalışmalarda metabolik bozukluklar ve KVH'ların bir arada bulunması yani kümelenmesi kavramı uzun yıllardır tartışılmaktadır (5). Metabolik sendromda ortaya çıkan, DM ve hipertansiyon birlikteliği 1920'li yıllarda ortaya konmuştur (9). Yine bu tarihlerde Kylin hipertansiyon, hiperglisemi ve gut hastalığının MetS ile birliktelik gösterdiğini bildirmiştir (5). Arkasından 1980 yılında Albrink tarafından, MetS'in obezite, hipertrigliseridemi ve hipertansiyon üçlüsü ile bir arada olduğu bir hastalık olarak tarif edilmiştir. Visseral obezite bulgusu da 1990'larda MetS bileşeni olarak kabul edilmiştir (5).

Metabolik Sendrom kavramı da çeşitli süreçlerden geçmiştir. Reaven ilk kez 1988 yılında insülin aracılı glukoz alımına direnç, hipertansiyon, Tip2 DM ve KVH arasındaki ilişkiyi tanımlamak için "Sendrom X" kavramını ortaya atmıştır (5, 10). Bu kavram ortaya atıldıktan sonraki 10 yıllık süre içerisinde kardiyovasküler ve metabolik risk faktörleri kümesini tanımlamak için Sendrom X kavramına ilaveten, dismetabolik sendrom, bira göbeği sendromu, insülin direnci sendromu, polimetabolik sendrom, ölümcül dördü, uygarlık sendromu ve Reaven sendromu gibi tanımlamalar da kullanılmıştır (2,11-13). Biz çalışmamızda yaygın kullanım sebebiyle "Metabolik Sendrom" terimini ve "MetS" kısaltmasını kullanmayı tercih ettik.

1.1.3. Farklı Tanı Kriterleriyle Metabolik Sendrom

Metabolik sendromun tanı kriterleri birçok bilimsel araştırma grubu tarafından farklı şekillerde belirlenmiştir (Şekil.1). Tanıda; obezite, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon gibi kriterler tüm çalışma gruplarında ortaktır (14). Bu ortak şartlara ek olarak; dislipidemi (HDL-K azalması ve trigliseritlerin artması), hipertansiyon ve mikroalbuminüri (Şekil. 1) kriterlerinden en az iki tanesinin de olması gerektiği

bildirilmiştir (5,6). Metabolik Sendrom tanısı koymada yaygın olarak kullanılan üç çalışma grubunun parametreler üzerinde ortak yönleri ve farkları Tablo 1.'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Metabolik sendrom tanısını koymada yaygın olarak kullanılan üç çalışma grubun parametreler üzerinde ortak yönleri ve farkları

| Parametreler | ATPIII | İDF | DSÖ |
|------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| Açlık şekeri | ≥110 mg/dL | ≥100 mg/dL | BAG, BGT veya Tip2DM |
| HDL-K | Aynı | Aynı | Benzer |
| Kan Basıncı | Aynı | Aynı | Benzer |
| Mikroalbuminüri | Kullanılmıyor | Kullanılmıyor | Kullanılıyor |
| Obezite | Santral | Santral | VKİ |
| Trigliserit | Aynı | Aynı | Aynı |

İlk defa resmi olarak MetS tanımlaması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılmıştır (7). DSÖ'nün MetS'li bireyleri tanımlanmasının temel amacı, KVH'ların yanı sıra diyabet gelişimi için yüksek risk altındaki bireyleri belirlemek olmuştur (5). Avrupa İnsülin direnci çalışma grubu [*European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR)] daha sonra farklı MetS tanı kriterleri yayınlamıştır (15). Avrupa Grubunun (EGIR) yayınladığı bu tanı kriterleri DSÖ'nün tanı kriterlerine benzemesine rağmen mikroalbuminüri'yi içermemekteydi (Şekil.1). EGIR özellikle MetS tanısı koymak için mikroalbuminüri'nin varlığına gerek olmadığını vurgulamıştır.

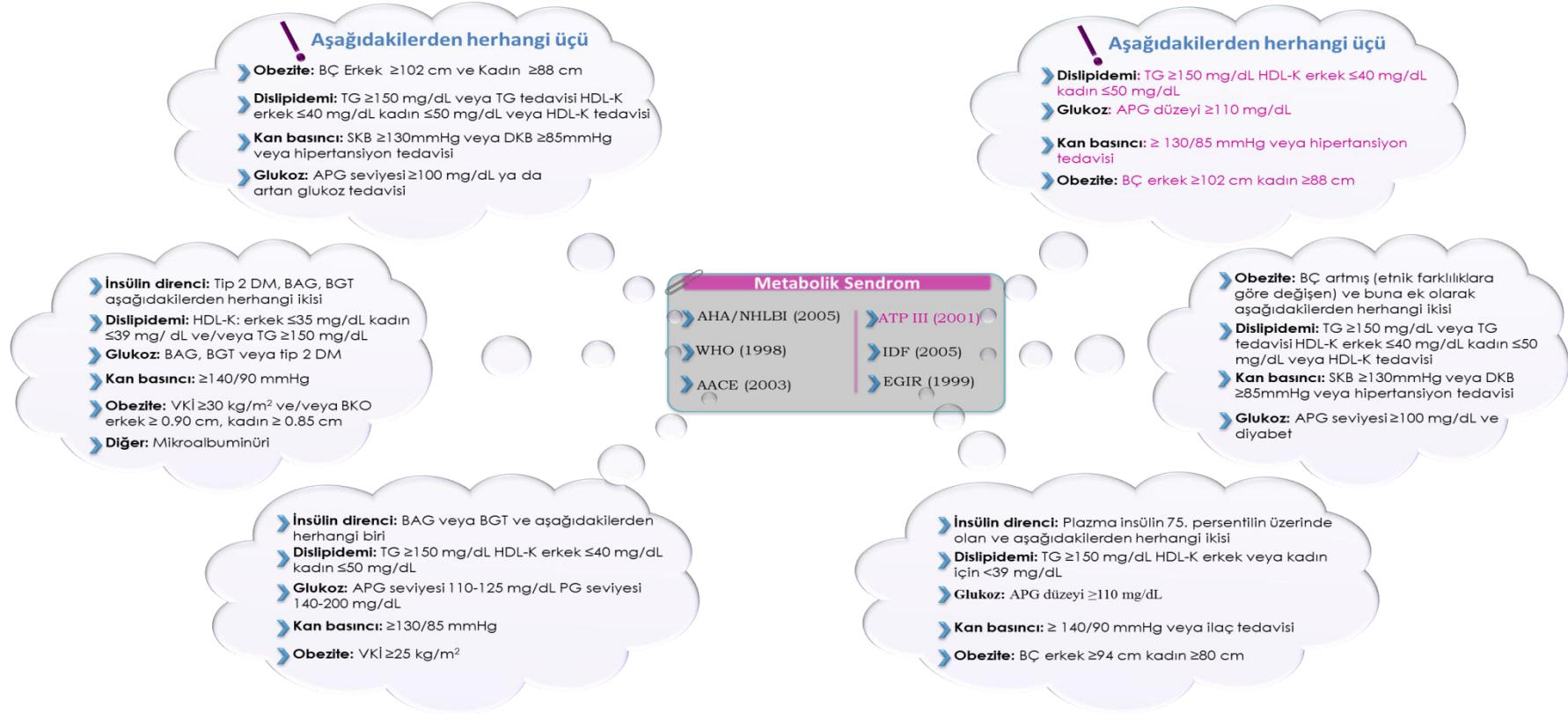
National Cholesterol Education Program (NCEP) ise 2001 yılında; Adult Treatment Panel III (ATPIII) bel çevresi (BÇ), kan lipitleri, kan basıncı ve açlık glukozunu içeren yaygın klinik ölçümlere dayalı yeni bir dizi tanı kriterleri belirlemiştir (8). ATPIII kriterleri, insülin rezistansının tanı kriterleri arasında olmamasından dolayı hem DSÖ hem de EGIR kriterlerinden farklılık göstermektedir (Şekil.1). ATPIII tanı kriterlerinin de amacı diğerlerinde olduğu gibi KVH için yüksek risk taşıyan bireyleri tespit etmek olmuştur (5).

MetS'i tanımlamak için yapılan bu ilk girişimlerden beri Klinik Endokrinologlar Amerikan Derneği'ni [*American Association of Clinical Endocrinology* (AACE)] de içeren çeşitli çalışma grupları kardiyovasküler ve metabolik hastalıkların birbirleriyle

olan bağlantılarını tanımlamak için çeşitli tanı kriterleri ortaya atmıştır (16) (Şekil.1). AACE tanı kriterleri Tip2DM'si olan bireyleri dışlamış ve insülin rezistansına odaklanmıştır. 2004 yılındaki çalıştayda, uluslararası diyabet federasyonu [*International Diabetes Federation (IDF)*] MetS için tanımlayıcı kriterlerin etnik popülasyonlar arasındaki farklılıklardan dolayı zorluğa neden olduğu bildirilmiştir (14). IDF tanımlamasında santral obezitenin MetS tanısı koymak için gerekli bir durum olduğunu vurgulamıştır (Şekil.1). IDF ayrıca etnik yapıya ya da ırka özgü yeni tanı kriterleri de önermiştir. En son IDF kriterleri insülin rezistansını vurgulamazken onun yerine açlık plazma glukoz konsantrasyonları üzerine odaklanmıştır (5).

Amerikan kalp birliği [*American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI)*], ATPIII kriterlerini birkaç ufak değişiklikle sürdürmeyi tercih etmiştir. AHA/NHLBI bu kararı ATPIII kriterlerinin klinik pratikte kullanılmasının daha kolay olmasından ve ATPIII kriterleri kullanılarak birçok çalışma yapılmış olmasından dolayı almıştır. Şekil 1 'de de görüldüğü gibi açlık plazma glukoz (APG) düzeyi 110 mg/dL'den 100 mg/dL'ye çekilmiştir. Bu açlık plazma glukozundaki ayarlama son zamanlarda düzenlenen Amerikan Diyabet Cemiyeti'nin (ADA) APG'ü için kullandığı kriterdir (17).

Genel olarak, MetS'in sebebini ve onun KVH ve Tip2 DM insidansı ve sonuçları üzerindeki etkilerini aydınlatmak için daha fazla kanıtlar oluşuncaya kadar, bu çoklu tanı kriterlerinden kurtulmak imkansız gibi durmaktadır (5).



Şekil 1. Farklı çalışma gruplarının metabolik sendrom tanı kriterleri

AACE: American Association of Clinical Endocrinology. AHA/NHLBI: American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute. APG: Açlık plazma glukozu. BAG: Bozulmuş Açlık Glukozu. BÇ: Bel çevresi. BGT: Bozulmuş Glukoz Toleransı. BKO: Bel kalça oranı. DKB: Diyastolik kan basıncı. EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance. HDL-K: High density lipoprotein cholesterol. IDF: International Diabetes Foundation. NCEP ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III. SKB: Sistolik kan basıncı. TG: Trigliserid. Tip2DM:Tip 2 Diyabet. VKİ: Vücut kitle indeksi. WHO: World Health Organization.

1.1.4. Metabolik Sendromun Epidemiyolojisi

Metabolik sendrom prevalansı dünya genelinde giderek artmaktadır. Genel itibariyle metabolik sendrom prevalansı yaş ile birlikte artmaktadır (5, 18). Dünya genelinde yapılan çalışmalarda MetS prevalansı çalışma gruplarının ortaya attığı tanı kriterlerine göre ele alındığında; Avustralya’da yapılan bir çalışmada 25 yaş ve üstü bireylerde ATPIII kriterlerine göre %24,4 erkek, %19,9 kadın, DSÖ’ne göre %25,4 erkek, %18,2 kadın, IDF’e göre %34,4 erkek, %27,2 kadın ve EGIR’a göre de %15,6 erkek, %11,3 kadına MetS tanısı konulmuştur (5). Finlandiya’da 24 ile 39 yaş aralığındaki bireyleri içeren bir çalışmada Metabolik sendrom prevalansı EGIR kriterlerine göre %9,8, ATPIII kriterlerine göre %13 iken IDF’e göre ise %14,9 olarak bulunmuştur (2, 19). Amerika birleşik devletlerinde 1999 ve 2006 yılları arasında 20 yaş üstü bireylerde gerçekleştirilen Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirme Araştırması [*National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III)] sonuçlarına göre MetS prevalansı NCEP ATPIII kriterleri dikkate alındığında %34,1 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç daha önce yapılan NHANES III (%27,9) çalışmasının sonucuyla kıyaslandığında önemli derecede artış olduğu tespit edilmiştir (20). Brezilya’da, Afrika’da, İran’da, Hindistan’da, Umman’da, Tunus’da yaşayan kadınlarda MetS prevalansı erkeklere göre daha yüksektir, fakat Avusturya’da, Fransa’da ve Yunanistan’da yaşayan bayanlarda daha düşük bir prevalans vardır (5). Dünya genelinde MetS’in ülkelere göre dağılımı Tablo 2’de özetlenmiştir.

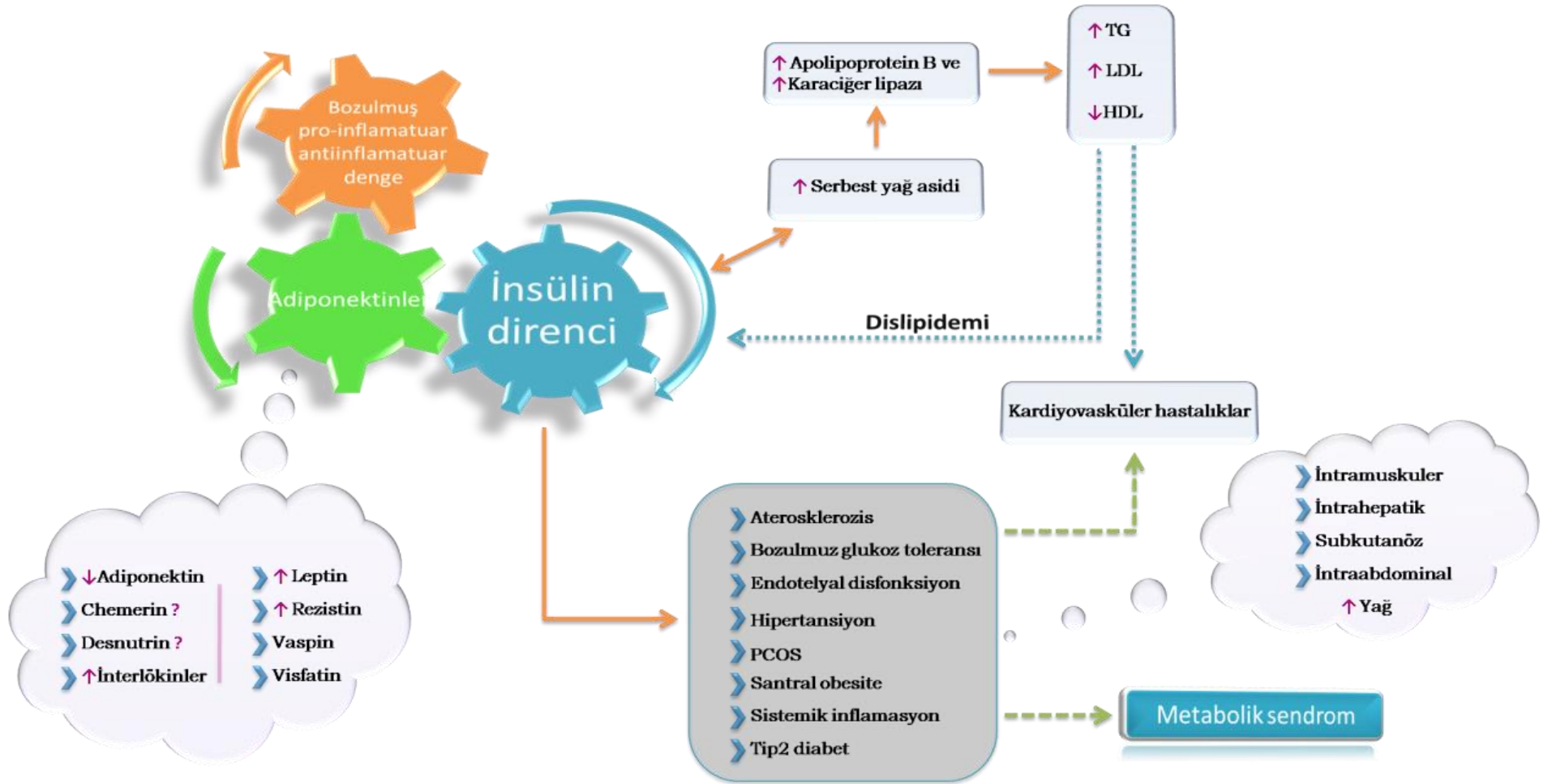
Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Erişkin Tedavi Paneli III [*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III)] kriterleri kullanılarak yapılan Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışmasına göre yaşı en az 30 olan bireyler arasındaki MetS prevalansı 1998 yılında toplamda %44,8 iken 2010 yılında bu oran %51,8’e yükselmiştir. Yine 2010 yılında yapılan TEKHARF çalışmasında 40 yaş ve üstü erkeklerde MetS prevalansı %49,6 iken kadınlarda %54,5 olarak tespit edildi. Bölgelere göre yapılan analizlerde ise Ege bölgesindeki sıklık en düşük düzeyde iken güney bölgelerimiz ile Karadeniz bölgesinde en yüksek düzeyde tespit edilmiş (21). 2004 yılında yapılan Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması’na (METSAR) göre 20 yaş üstündeki yetişkinlerdeki MetS prevalansı %35 idi. Bu çalışma da kadınlarda MetS prevalansının erkeklerden daha fazla olduğunu ortaya koymaktadır (2).

Tablo 2. Metabolik sendromun ülkelere göre yaygınlığı (22)

| Ülke | Denek Sayısı | Yıl | % Yaygınlığı |
|-------------------------|---------------------|------------|---------------------|
| ABD | 3601 | 1999-2002 | 34 |
| Çin | 2776 | 1998-2000 | 10,2 |
| Filistin | 992 | 1996-1998 | 17 |
| Güney Avustralya | 4060 | 2005 | 15,3 |
| Güney Kore | 40.698 | 2001 | 6,8 |
| Katar | 1204 | 2008 | 26,5 |
| Madras/Hindistan | 475 | 2003 | 41 |
| Macaristan | 13.383 | 2006 | 8,3 |
| Suudi Arabistan | 2250 | 2004 | 20,8 |
| Umman | 1419 | 2001 | 21 |
| Ürdün | 1121 | 2007 | 36,3 |
| Yunanistan | 9669 | 2005 | 24,5 |
| Türkiye | 4809 | 2008 | 26,9 |

1.1.5. Metabolik Sendrom Etyopatogenezi

Metabolik sendrom etyopatogenezinde çeşitli faktörler bulunmaktadır ki, bunların başında insülin direnci gelmektedir. Bunun yanı sıra artan visseral yağ kitlesi, obezite, dislipidemi, glukoz intoleransı, hipertansiyon, pro-inflamatuar sitokinler, adiponektin, leptin, desnutrin, chemerin, vaspin, visfatin ve resistin gibi adipokinler de (Şekil.2) (18) suçlanmaktadır.



Şekil 2. Metabolik sendrom patogeneğinde yer alan başlıca moleküller ve karşılıklı etkileşimleri

TG:Trigliserit. HDL: *High density lipoprotein*. LDL: *Low density lipoprotein*.

1.2. Deneysel Olarak Oluşturulan Metabolik Sendrom Modelleri

Büyüme ve gelişmenin sağlanabilmesi için besin kaynaklarının içeriği önemlidir. Özellikle batılı ülkelerde karbonhidratlar ve doymuş yağlardan zengin bir beslenme kültürü yaygındır. Bu artmış kalori alımının metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar ve alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması [*Non-Alcoholic Fatty Liver* (NAFL)] gibi diyet ile oluşan hastalıklarla yakından bağlantılı olduğu bilinmektedir (23, 24).

İnsan hastalıklarını modellemede hastalık sebeplerini, semptomlarını, progresyonunu ve terapötik müdahalelerin test edilmesinde ratlar, sıklıkla tercih edilmektedir. İnsanlardaki MetS'in semptomlarını taklit etmek için karbonhidrat ve yağdan zengin diyet bileşenlerinin kombinasyonları bu hayvanlarda rahatlıkla tespit edilebilmektedir (25).

1.2.1. Yağ İçeriği Fazla Olan Diyet İle Oluşturulan Metabolik Sendrom

Yağ içeriği fazla olan diyetle obezite modeli uzun yıllardır ratlarda, dislipidemi ve insülin rezistansı oluşturmak için kullanılmaktadır. Ratlarda yağ içeriği yüksek olan diyet ile gelişen komplikasyonlar insanlarda oluşan; MetS, kardiyak hipertrofi, kardiyak fibrozis, myokardiyal nekroz ve hepatik steatozise benzerdir (25). Yüksek yağ içerikli diyetle %20 ve %60 arasında değişen oranlarda enerji içeren domuz yağı veya sığır iç yağı gibi hayvansal kaynaklı yağların yanı sıra zeytinyağı veya hindistan cevizi yağı gibi bitkisel kaynaklı yağları da içeren çok farklı yağ fraksiyonları MetS'e yol açmaktadır (26). Bu tür beslenme ile MetS'in bileşenlerinden hiperglisemi ve bozulmuş glukoz toleransı gelişmektedir (25). Ayrıca domuz yağı, hindistan cevizi yağı ve zeytinyağı vücut ağırlığında artışa, karaciğerde trigliseritlerin (TG) birikimine, plazma TG, serbest yağ asitleri (SYA) ve plazma insülin konsantrasyonlarının artışına neden olmaktadır (26).

1.2.2. Karbonhidrat ve Yağ İçeriği Yüksek Olan Diyet ile Oluşturulan Metabolik Sendrom

Hayvansal ya da bitkisel kökenli karbonhidrat ve yağdan zengin bir diyet insanların beslenme içeriklerine çok benzerdir. Bu şekilde bir diyet uygulaması ratlarda MetS'i tetiklemektedir (25). Birçok çalışmada MetS oluşturmak için karbonhidrat ve yağ miktarları farklı kombinasyonlarda kullanılmıştır (27-30).

Birbirinden farklı çalışmalarda en yaygın kullanılan karbonhidratlar fruktoz ve sukroz iken yağ kaynakları çeşitlilik göstermektedir.

Bu tür modellemenin yapıldığı çalışma gruplarında sukroz içeriği %10 ve %30 arasında değişirken yağ içeriği ise %20 ve %40 olarak belirtilmiştir. Yüksek sukroz ve yağ içeriği ile beslenen kemirgenlerde vücut ağırlığındaki artış, abdominal yağ birikimine, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve hiperleptinemiye yol açmaktadır. Sukroz ve yağın birlikte verilmesi ayrıca hepatik steatozise ve hepatik lipogenik enzimlerde artışa da sebep olmaktadır (25).

Fruktoz ve yağ, MetS oluşumu için kullanılan diğer bir kombinasyondur. Bu kombinasyonda fruktoz içeriği %10 ve %60 arasında değişen oranlarda kullanılırken yağ içeriği ise %20 ve %60 arasındadır (28, 31-34). Fruktoz ve yağ ile beslenme vücut ağırlığını ve plazma TG, kolesterol, SYA'ni artırmaktadır (28, 34). Fruktoz ve yağ kombinasyonu ayrıca hiperinsülinemiye, insülin direncine, bozulmuş glukoz toleransına, abdominal yağ depolanmasında artışa, hepatik steatozise ve inflamasyona sebep olmaktadır (28, 34). Yüksek fruktoz ve yüksek yağ içerikli diyet ile beslenen ratlarda kardiyak hipertrofi, ventriküler dilatasyon, kardiyak inflamasyon ve fibrozis, hipertansiyon, kardiyak fonksiyonlarda azalma ve endotelial disfonksiyon ile birlikte orta derecede renal disfonksiyon ve pankreas adacık kitlesinde artışa sebep olmaktadır (28).

1.2.3. Sukroz ile Oluşturulan Metabolik Sendrom

Sukroz diyetle alınan fruktozun ana kaynağı (35) olduğundan dolayı sukroz ile beslenme insanlardaki MetS'e benzer bulgular ortaya koyduğu için hayvan deneylerinde kullanılmaktadır (25). Fruktoza benzer şekilde sukroz ile beslenme özellikle obezite ile birliktelik gösteren değişken sonuçlar sergilemektedir (36). Fruktoz içerdiği için sukroz ratlarda lipogenezisi uyarmasının yanı sıra plazma insülin, leptin, TG, glukoz ve SYA'leri konsantrasyonlarının artışına ve bozulmuş glukoz toleransına sebep olmaktadır (25, 37). Ratlarda sukroz ile beslenme açlık plazma insülin ve glukoz konsantrasyonlarında herhangi bir değişikliğin olmadığı fakat tokluk plazma insülin ve glukoz konsantrasyonlarının yüksek seyrettiği bir insülin direnci tablosuna neden olmaktadır (36). Ratlarda sukroz ile beslenme, kardiyak fibrozis olmaksızın sol ventrikül kütesinin artışı ile birlikte seyreden sistolik kan basıncı artışına (SKB) ve hepatik steatozis gelişimine de sebep olmaktadır (25).

1.2.4. Fruktoz ile Oluşturulan Metabolik Sendrom

Fruktoz batı dünyası diyetinde yaygın kullanılan bir karbonhidrattır. Dünya genelinde fruktoz tüketimi 1986 ve 2007 yılları arasında kişi başına %16 artış göstermiştir (35). Fruktoz tüketimindeki artış ile obezite insidansındaki artış arasında bir orantı bulunmaktadır (38). Diyetteki başlıca fruktoz kaynakları; sukroz, yüksek fruktozlu mısır şurubu, meyveler ve baldır. Glukozun aksine, yüksek fruktozlu diyet ile beslenen ratlarda kan basıncının yükselmesi, insülin rezistansı, bozulmuş glukoz toleransı ve dislipidemi içeren MetS semptomlarının gelişimi uyarılmaktadır (39, 40). Fruktoz ile MetS oluşturmak için ratların içme sularına %10 fruktoz ya da %60 fruktoz ilave edilmektedir. İçme sularına %10 fruktoz katılması ile MetS'in 6-8 haftada oluştuğu bildirilmiştir. %60 fruktoz ilavesi ile daha kısa sürede MetS oluşmaktadır (41). Fruktoz ile beslenme ventriküler dilatasyon, ventriküler hipertrofi, ventriküler kasılma fonksiyonunda azalma, kalbe inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve hepatic steatozise neden olmaktadır (42, 43).

Fruktoz ile beslenme karaciğerde hem mikroveziküler hem de periportal fibrozis ve lobüler inflamasyon ile seyreden makroveziküler steatozise sebep olmaktadır (44). Plazma ürik asit ve plazma TG konsantrasyonlarında artışlar ile de karakterizedir (45).

1.3. Fruktoz Biyokimyası ve Metabolik Sendrom

Fruktoz taşıyıcısı olan *Glucose Transporter 5* (GLUT 5)'in pankreasın β hücrelerinde olmamasından dolayı, fruktoz pankreasın β hücrelerinden insülin sekresyonuna neden olmamaktadır (38). Fruktozun ayrıca tokluk hissine sebep olan leptin sekresyonunu uyarma yeteneği yoktur (38), oysa karaciğerde de novo lipogenezisi aktive eder (46). Karaciğerde fruktoz metabolizmasında fosfofruktokinaz tarafından katalizlenen basamak olan hız kısıtlayıcı basamağın atlanması sonucu karbon iskeleti kontrolsüz bir şekilde lipogenezise kaymakta (47) ve böylece MetS'e zemin oluşmaktadır. Fruktozun biyokimyasal yollardaki metabolik kaderi Şekil 3'de detayları ile görülmektedir.

1.3.1. Fruktozun Yapısı

Fruktoz, altı karbon atomuna sahip bir monosakkarittir. Fonksiyonel olarak aktif grubundan dolayı ketoheksoz ya da polihidroksiketon olarak da

adlandırılmaktadır. Glukozun izomeridir ve kapalı formülü $C_6H_{12}O_6$ şeklinde gösterilmektedir. Kristalize halde bulunan fruktoz yarı ketal ve iç hidrojen bağlarından dolayı D-fruktofuranoz olarak adlandırılan halkalı bir yapı sergilemektedir. Saf halde beyaz ve katı olarak bulunan bu molekül suda çok rahat çözünmektedir (48).

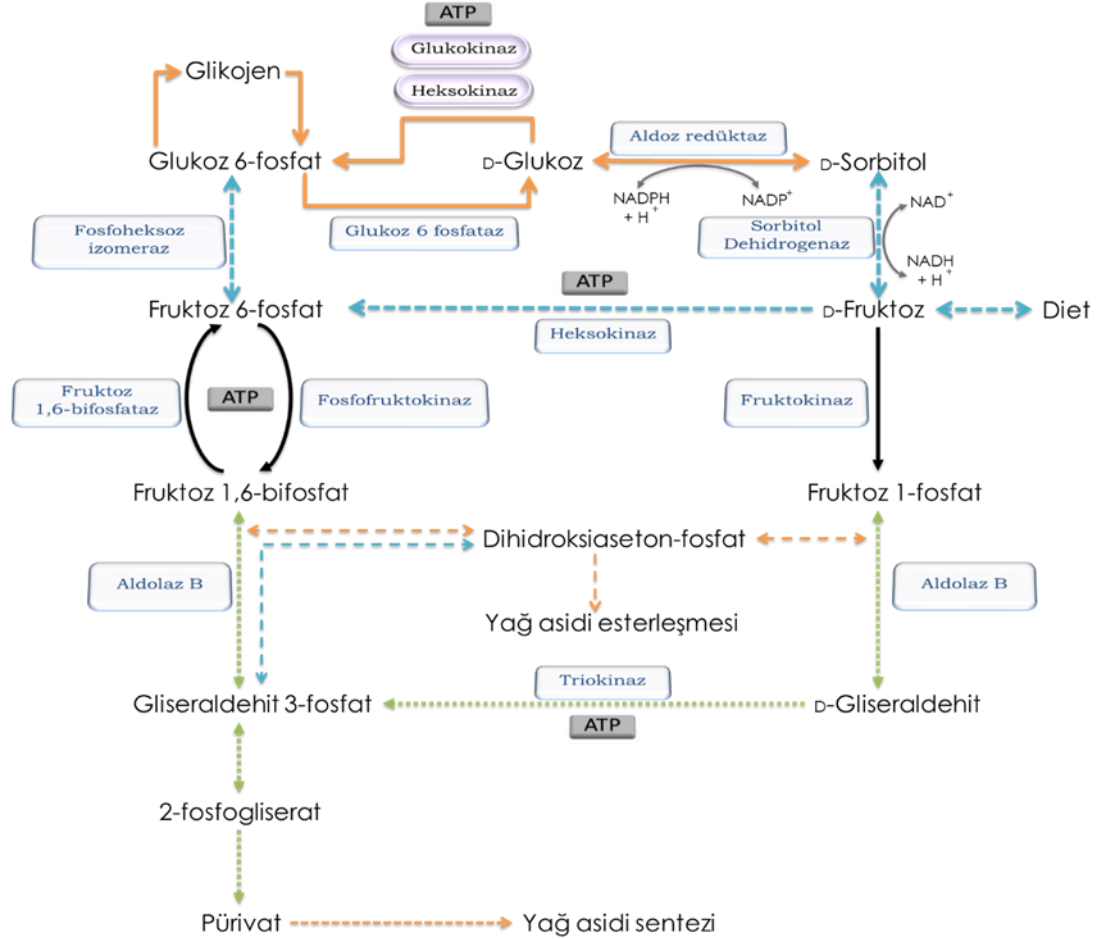
1.3.2. Fruktozun Absorbsiyonu

İnce barsak lümeninde bulunan monosakkaritler enterositlerin içerisine sodyum aracılı glukoz taşıyıcısı olan *Sodium-dependent glucose cotransporter* (SGLT1) transport proteini ve GLUT 5 aracılığıyla alınmaktadır. SGLT 1 transport proteini Na-K pompasına bağlı olarak hareket eder. Glukoz ve galaktoz gibi monosakkaritlerin Na aracılı hücre içerisine alınmaları konsantrasyon gradiyentine karşı enerji kullanılarak SGLT 1 transfer proteini aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. GLUT 5 ise Na'dan bağımsız olarak fruktoz'un yanı sıra glukoz ve galaktoz'u konsantrasyon gradientinden aşağıya doğru yani enterosit içerisine doğru almaktadır. Bütün diğer monosakkaritler de olduğu gibi fruktoz da GLUT 2 aracılığıyla enterositlerden dolaşıma geçmektedir (49).

1.3.3. Fruktozun Metabolizması

Fruktoz karaciğerde glikoliz için kontrol basamağı olan fosfofruktokinaz basamağını atladığı için glukozdan daha hızlı bir şekilde glikolize girmektedir. Bu sayede fruktoz karaciğerde hızla metabolize olup yağ asidi sentezine, yağ asitlerinin esterifikasyonuna ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*) sentezine kaymaktadır. Sonuçta serum TG düzeyleri ve düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-K, *Low Density Lipoprotein Cholesterol*) konsantrasyonları artmaktadır. Spesifik bir kinaz olan fruktokinaz karaciğerde, böbrekte ve ince barsakta fruktozun fruktoz 1-fosfat'a fosforilasyonunu katalizlemektedir. Bu enzim glukozu etki etmez ve glukokinazın aksine bu enzimin aktivitesi açlık durumundan veya insülininden etkilenmez. Bu durum neden fruktozun diyabetik hastaların kanlarından normal bir hızda temizlendiğini de açıklamaktadır. Fruktoz 1-fosfat karaciğerde bulunan bir enzim olan aldolaz B enzimi aracılığıyla D-gliseraldehit ve dihidroksiaseton fosfata parçalanmaktadır. Bu enzim aynı zamanda karaciğerde glikolizde fruktoz 1,6-bifosfatı parçalayarak fonksiyon göstermektedir. D-gliseraldehit triokinaz enzimi aracılığıyla gliseraldehit 3-fosfata fosforile olarak

glükolize girmektedir. Dihidroksi aseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat ya glükolize kayarak metabolize olmaktadır, ya da aldolaz için substrat olup glukoneogenezise yönelmektedirler. Karaciğerde metabolize edilen fruktozun kaderi böyledir (Şekil 3) (48, 49).



Şekil 3. Fruktozun biyokimyasal yollardaki kaderi

Ekstrahepatik dokularda ise heksokinaz fruktoz da dahil olmak üzere şekerlerin çoğunun fosforilasyonunu katalizlemektedir, fakat glukoz heksokinaz için daha iyi bir substrat olduğundan dolayı fruktozun fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Diğer bir mekanizma da heksokinaz'ın fruktoz için K_m 'i oldukça yüksek olduğundan dolayı bu enzim fruktoza düşük affinite göstermektedir (50). Bu yüzden fruktoz molekülleri adipoz doku ve kasta metabolize edilebilmektedir. Karaciğerde bulunan sorbitol dehidrogenaz sorbitolün fruktoza dönüşümünden sorumludur. Bu yolak aynı zamanda seminal sıvıdaki fruktozun meydana gelişinden de sorumludur (49).

1.4. Karaciğer 'in Metabolik Sendromdaki Rolü

Karaciğer organizmadaki biyomoleküllerin metabolizmasında majör rol oynayan bir organdır. MetS patogeneğinde dolaşımda artan SYA'leri karaciğere ulaşmaktadır. SYA'i akışının artışı birçok çalışmada hepatik insülin etkisini bozduğu gösterilmiştir (51). Bu durum hepatik glukoz üretimini artırmakta, pro-inflamatuar sitokinlerin sentezinde artışlara yol açmakta ve lipoprotein metabolizmasında majör değişikliklere sebep olmaktadır. Karaciğerde artan SYA'leri ya okside olmalı ya da depolanmalıdır. Normal fizyolojik şartlarda insülin, TG biyosentezinde rol oynayan enzimlerin genlerinin ekspresyonlarını artırmaktadır, fakat VLDL-TG ve apolipoprotein (apo) B üretimini ve sekresyonunu azaltmaktadır (5). İnsülinin intrahepatik etkilerinden bir diğeri de apo B yıkımını artırmaktır (52). İnsülin direnci olan hastaların karaciğerine SYA'lerinin akışı oldukça yüksek düzeydedir, TG sentezi ve depolanması artmaktadır ve aşırı miktardaki TG'ler VLDL olarak sekrete edilmektedir (5). Genellikle, dislipidemi ile ilişkili olan insülin direncinin karaciğer tarafından artan VLDL sekresyonunun direkt bir sonucu olduğuna inanılmaktadır (52).

Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol'deki (HDL-K, *High Density Lipoprotein Cholesterol*) azalmalar tipik olarak hipertrigliseridemi ile ilişkilidir. Bu kısmen TG'den zengin lipoprotein çekirdeğinden kolesterol esterlerinin kolesterol ester transfer proteini (CETP, *Cholesteryl ester transfer protein*) aracılığıyla HDL-K'e transferi ile gerçekleşmektedir (5, 18). Bu sayede hepatik lipaz için iyi bir substrat olan TG'den zengin daha küçük HDL-K molekülü oluşmaktadır ve bu da hepatik lipazın etki etmesiyle böbreklerden hızlı bir şekilde atılan forma dönüşmektedir (53). CETP gen polimorfizmi plazma CETP aktivitesini ve plazma HDL-K konsantrasyonlarını etkilemektedir. Bazı çalışmalarda abdominal obezite ve insülin direnci sendromunun bazı özellikleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (54, 55). Hipertrigliseridemi varlığında LDL-K partikülleri de trigliseritten zengin, küçük ve yoğundur. KVH ile küçük yoğun LDL-K seviyeleri arasındaki ilişkiyi destekleyen birçok çalışma mevcuttur (56, 57). İlgi çekici diğeri bir nokta da erkeklerdeki artmış CETP kütlesi ve muhtemelen azalmış LDL-K partikül çapına ilaveten azalmış HDL-K ile MetS arasında bir ilişki mevcuttur (58). Ayrıca KVH'lar ile ilişkili olaylarda hepatik lipazdaki artışları gösteren kanıtlar mevcuttur (59).

Hepatik steatozis sadece insülin direnci ile ilişki değildir aynı zamanda MetS ile de ilişkilidir. Bu durum karaciğerde aşırı miktardaki hepatik yağ asitlerinin (YA) TG olarak depolanmasıyla oluşmaktadır. Bu durumun bir daha ileri aşaması NAFL olarak sonlanmaktadır (60). Son çalışmalar insülin direnci, oksidatif stres, lipit peroksidasyonu ve sitokinlerin NAFL gelişiminde rolü olduğunu göstermektedir. Şu anda insülin etkisini iyileştirmek için yapılan steatoz tedavileri aşırı hepatik yağ birikiminin etyolojisinde insülin direncinin önemini göstermektedir (61).

1.5. Yağ dokusunun Metabolik Sendromdaki Rolü

Metabolik sendrom patogenezinin gelişmesinde adipoz dokudaki değişiklikler önemli roller oynamaktadır (10, 18, 62). Özellikle genişlemiş adipoz doku kitlesi sıklıkla SYA'lerinin artmış turnoverı ile sonuçlanmaktadır (5). İnsülin direnci geliştiğinde ve adipoz doku TG depoları genişlediğinde, adipoz doku TG depolarından SYA mobilizasyonu hızlanmaktadır (62, 63). Normal şartlar altında, insülin adipoz dokuda lipolizisi inhibe etmektedir, fakat insülin rezistansı geliştiğinde insülin lipolizi baskılama özelliği gösterememektedir. Böylece plazmaya daha fazla miktarda SYA salınmaktadır (18). Bu sürecin hormona duyarlı lipaz (HSL, *Hormone-sensitive lipase*) tarafından yürütüldüğü çok iyi bilinmesine rağmen (64), Desnutrin/ATGL'nin bu sürece katkılarının olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Bu iki hormonun birlikte TG hidrolizinin %95'inden sorumlu olduğu gözlenmiştir (65). Obez bireylerde insülin direncinin ve hiperinsülineminin azalmış Desnutrin/ATGL ve HSL mRNA'ları ve protein ekspresyonları ile ilişkili olduğu ve bu ilişkinin de yağ dokusu hacminden bağımsız olduğu rapor edilmiştir (66).

Sadece insülin direnci SYA'lerinin artışına sebep olmamaktadır, ayrıca artan SYA'leri de insülin direncinin gelişmesine katkı sağlamaktadır. Mevcut kanıtlar visseral yağ depolarının artan SYA turnoverine ve insülin direnci gelişmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Özellikle visseral adipositler katekolaminler ile indüklenen lipolize subkutan adipositlere göre daha hassastır. Visseral adipoz doku depolarının venöz drenajı portal sistem ile direk ilişkili olduğundan dolayı, visseral obez bireylerinin karaciğerine gelen aşırı miktardaki YA'lerinin insülin direncine sebep olduğu öne sürülmektedir (portal teori) (5).

Metabolik sendrom patogenezinde adipoz dokunun diğer bir katkısı da proinflamatuvar sitokinlerin aşırı miktardaki salınımıdır. Adipoz dokuda bu sitokinlerin

kaynağı tartışmalıdır. Adipositleri çevreleyen monosit kökenli makrofajlar da bu sitokinlerin kaynakları olabileceği ileri sürülmüştür (67, 68). Weisberg ve arkadaşları tarafından insan adipoz dokusunda monosit kökenli makrofajların varlığının tanımlanmasıyla (69) yağ hücrelerinin sitokin ürettiği kesinlik kazanmıştır (70). İnsülin etkisinde görevli olan dolaşımdaki sitokinler yağ, iskelet kası ve karaciğer dokusundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca sitokinlerin parakrin etkileri adipoz dokudaki insülin etkisini de düzenleyebilmektedir (5). Adipoz dokunun iki yeni mensubu olan chemerin ve desnutrin/ATGL'nin MetS ile bağlantısının olup olmadığı bu çalışmada araştırılacağından şimdi de bu iki hormona detayları ile bakalım.

1.6. Chemerin

Son zamanlarda keşfedilen kemoatraktan bir protein olan chemerin yeni bir adipokin olarak tanımlanmıştır ve adipogenezis, metabolizma ve inflamasyonda önemli rollerinin olduğu ortaya konulmuştur (71).

Tazarotene-induced gen protein 2 (TIG2, *tazarotene-induced gene 2 protein*) veya retinoik asid reseptör cevaplayıcı protein 2 (RARRES2, *retinoic acid receptor responder protein 2*) olarak da bilinen chemerin, yapısal olarak proteinlerin kathelisidin/sistatin ailesi ile ilişkilidir ve aslen sentetik retinoid tazaroten tarafından psöriatik ciltte upregüle edilmiş bir gen olarak tanımlanmıştır (72). Chemerin sinyalizasyonu; ekspresyon, sekresyon, proteolitik süreç ve sinyal olaylarını içeren birçok mekanizmalar aracılığıyla sıkıca düzenlenmektedir. Bu düzenleyici mekanizmaların tam koordinasyonu chemerin seviyelerinin, lokalizasyonunun ve sonunda aktivitesinin ortaya konulması için gereklidir.

1.6.1. Sentezlenmesi ve Salgılanması

Chemerin en fazla plasenta, karaciğer ve WAT'da sentezlenmektedir. Akciğer, kahverengi yağ dokusu (BAT), kalp, overler, böbrek, iskelet kası ve pankreas gibi diğer birçok dokuda daha az oranda bulunmaktadır. WAT içerisinde bulunan adipositlerdeki chemerin sentezini, stromal vasküler fraksiyon ile kıyaslandığında daha fazla olduğu görülmektedir (73). Buna ilaveten karaciğer ve WAT dolaşımdaki chemerin ana kaynağı olduğuna inanılmaktadır. Leptin ve adiponektin gibi diğer adipokinlere benzer şekilde farelerde chemerin serum seviyeleri diüurnal ritim benzeri salınım gösterirken (74); insanlarda böyle bir salınım minimaldir (75). Sağlıklı

zayıf popülasyonda serum ve plazmanın her ikisinde de toplam dolaşan chemerin konsantrasyonu 90 ng/mL'den 200 ng/mL'ye kadar değişmektedir. Genellikle, bayanlar ve yaşlı yetişkinler sırasıyla erkekler ve genç yetişkinlerden daha fazla total dolaşan chemerine sahip olmasına rağmen bütün çalışmalar bu trendleri desteklememektedir (73). Chemerin başlangıçta bir N-terminal sinyal sekansı ((20 aminoasit (aa)) ile 163 aa içeren inaktif 18-kDa ağırlığında prekürsör bir protein (Chem-163) olan prochemerin olarak sentezlenmektedir (76). Chemerinin aa dizilimi Şekil 4'te görülmektedir. Dolaşımdaki chemerinin büyük çoğunluğunun nispeten inaktif prochemerin formunda bulunduğu inanılmaktadır ve lokal biyolojik etkiler göstermek için biyoaktif chemerinin izoformlarına proteolitik süreçler ile dönüşmesi gerekmektedir.

1.6.2. Proteolitik Süreçler

Sekresyondan hemen sonra çeşitli dokularda ve hücrelerde koagülasyonun ekstrasellüler proteazları ve inflamatuvar kaskatlar aracılığıyla prochemerin çeşitli aşamalardan geçerek işlenmektedir. Bu enzimler, C-terminalinde farklı bölgelerde bölünme yaparak, pro-chemerini çeşitli biyolojik aktivitelerde ve uzunlukta bir takım biyoaktif izoformlarına çevirmektedirler. Örneğin, altı aa'nın ayrılması ile oluşan Chem-157 en yüksek aktivite gösterirken ((prochemerinden yaklaşık 100 kat daha fazla (76,77)), Chem-156 biraz daha az aktif ve Chem-152 ve Chem-154 nispeten inaktiftir (76, 78-82). En önemlisi, elastaz ve triptaz (81) gibi bazı proteazlar prochemerini birden fazla ayrılma bölgesinden ayrıştırarak çeşitli chemerin izoformları ortaya koymaktadırlar. Yine karboksipeptidaz B ve N nispeten düşük aktiviteki chemerin izoformlarını daha aktif formlara dönüştürürken (78), proteinaz 3 (PR3) veya mast hücresi kimazı gibi diğer proteazlar nispeten inaktif formlar olan sırasıyla pro- veya biyoaktif chemerine dönüştürebilmektedir (83). Chemerinin bu çok aşamalı proteolitik süreci lokal ve sistemik chemerin aktivasyonunun yanı sıra inaktivasyonu için de hem direkt olarak hem de mevcut prekürsörleri sınırlayarak bir mekanizma ortaya koymaktadır. Örneğin, düşük biyoaktiviteye sahip olan Chem-155, oldukça yüksek aktif chemerin izoformlarının varlığında zayıf bir antagonist olarak etki etmesi, aktif ve inaktif izoformlarının oranının chemerin biyoaktivitesinin önemli bir belirleyicisi olduğunu göstermektedir. Şunu belirtmek gerekir ki, çalışmaların çoğunluğu chemerin biyoaktivitesini belli bir işlev veya sinyal yolağına ait olduğunu

raporlamaktadır ve böylece bireysel chemerin izoformlarının birçok yolak veya fonksiyonlarda farklı biyoaktiviteye sahip olup olmadığı halen bilinmemektedir (73).



Şekil 4. Chimerin aminoasit dizilimi

Chimerinin proteolitik süreçleri ve biyoaktivitesi ile ilgili bilgiler ex-vivo çalışmalardan elde edilmektedir; fakat birçok endojen chimerin izoformları da insan örneklerinden izole edilmiştir. İnsan kanında (Chem-155, 157, 158), asitte (Chem-157), sinovial sıvıda (Chem-158), serebrospinal sıvıda (Chem-158) ve hemofiltratda (Chem-154) chimerin izoform üretiminin farklı paternleri prochimerinin proteolitik sürecinin in vivo olduğuna işaret etmektedir (76, 79-82). Günümüzde, bütün proteazlar chimerin aktivitesini C-terminalinin proteolizisi aracılığıyla yapar, bu olay chimerinin biyoaktivitesi için proteinin bu bölgesinin önemini göstermektedir. Şu anda,

chemerinin tersiyer/quartener yapısı üzerinde bu C-terminal'in proteolizisinin etkisi veya proteinin geri kalanı içerisinde aa motifleri ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bu yüzden lokal chemerin biyoaktivitesini ve chemerinin biyolojik fonksiyonlarını tamamen anlamak için chemerinin izoformlarının dönüşümünün daha fazla karakterizasyonu gerekmektedir (73).

1.6.3. Reseptörler ve İletişim (Sinyalizasyon)

Chemerin başlangıçta G protein-bağlı reseptör (GPCR, *G protein-coupled receptor*), chemokine-like reseptör 1 (CMKLR1, *Chemokine like receptor 1*) eksprese eden hücreler için doğal ligand ve kemotaktik sinyal olarak tanımlanmıştır (76, 79). Chemerinin ayrıca GPCR ve CMKLR1 ile yapısal olarak yakından benzer olan G protein bağlı reseptör 1 (GPR1, *G protein-coupled receptor 1*)'i bağlayıp aktive ettiği de gösterilmiştir. GPR1 mayada besin algılama rolü üstlenmiştir (84); fakat memelilerde bu reseptörün fonksiyonu ile ilgili bilinenler azdır. Chemerinin CMKLR1'e benzer afinite ile GPR1'i bağlayıp aktive ettiği gösterilmişken (85), aslında GPR1'e bağlı sinyal iletim yolağı ile ilgili bilinen bir şey yoktur ve günümüzde, chemerinin bilinen bütün biyolojik (sinyalleşme) aktiviteleri CMKLR1'in aktivasyonuna atfedilmiştir. Bu yüzden, gelecekteki araştırmaların önemli bir alanı da chemerinin biyolojik etkilerine CMKLR1 ve GPR1'in katkısını ve reseptörlerin tamamlayıcı ve/veya ayırt edici rollerinin olup olmadığını belirlemek olacaktır. CMKLR1 ve GPR1'e ilaveten, chemerin üçüncü bir reseptör olan CC kemokin reseptör alt ailesinin üyeleri ile filogenetik benzerlik gösteren chemokin (CC motif) reseptör-benzeri 2 (CCRL2, *chemokine (CC motif) receptor-like 2*) için bir liganddır. CCRL2 bağlı chemerinin bir sinyal reseptörü olabileceğine inanılmamaktadır (86). Bu üç kemerin reseptörü aynı dokularda bulunabildiği gibi farklı doku dağılımlarına da sahiptir. CMKLR1 lökosit popülasyonlarında, özellikle makrofajlar ve dentritik hücrelerde, adipoz, kemik, akciğer, beyin, kalp ve plasentada yüksek seviyelerde salınır (71, 76). CMKLR1'e benzer şekilde GPR1 adipoz dokudan eksprese edilir, fakat GPR1 santral sinir sistemi (SSS) ve iskelet kasında ve sınırlı bir şekilde lökositlerden eksprese edilir. CCRL2 adipoz dokuda hayli eksiktir, fakat akciğer, kalp, dalak ve lökositlerde tespit edilmektedir. Reseptör lokalizasyonlarındaki bu çeşitlilik biyoaktif chemerin ve sonuçta biyolojik fonksiyonlar için hem ortak hem de bağımsız sinyalleşme mekanizmalarına katkı sağlayabilmektedir (73).

CMKLR1 ve GPR1 aktivasyonuna sebep olan eşleşmiş sinyal iletim yolları ile ilgili çok az şey bilinmektedir. İlk çalışmalar CMKLR1'in aktivasyonunun, intrasellüler kalsiyum salınımına ve *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP) birikiminde bir azalmaya sebep olduğunu göstermiştir. Bu etkileri Gi ailesinin bir üyesi olan boğmaca toksini tedavisi aracılığıyla inhibe edildiği gösterilmiştir (76). Çin hamster over'i, primer insan adipositleri ve primer insan kondrositlerini içeren çeşitli hücre tiplerinin chemerin ile tedavisi ekstrasellüler regülatörlü kinaz 1/2 (ERK 1/2) fosforilasyonunu teşvik ettiği belirtilmiştir (71, 76, 87-90). Özellikle, bazı çalışmalar insan adipositleri ve endotel hücrelerinde düşük dozlarda chemerin tedavisi ERK1/2 fosforilasyonunu stimüle ederken, yüksek dozlarda sinyalizasyonun inhibisyonu veya desensitizasyonu olabileceğinden ERK1/2 fosforilasyonu yapmadığını (71, 89) göstermiştir. Chemerin'in ayrıca hem fare hem de insan hücrelerinde p38 mitojen-aktive protein kinaz fosforilasyonu, Akt fosforilasyonu ve fosfoinozid 3-kinaz sinyallerini içeren diğer birçok sinyal kaskatlarını da etkilediği belirtilmiştir (73).

1.6.4. İnflamasyonda Chemerin'in Rolü

Kronik inflamasyon ile ilişkili birçok hastalıkta dolaşımdaki chemerin seviyeleri artmaktadır. Örneğin, serum chemerin seviyeleri Crohn hastalığı ülseratif kolit (91), kronik böbrek hastalığı (92) kronik pankreatik (93), pre-eklamsi (94), polikistik over sendromu (75) ve karaciğer hastalığı (95) olan hastalarda belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Dolaşımdaki chemerin seviyelerindeki bu artış *C-reaktif protein* (CRP), *Interleukin 6* (IL-6) ve *Tumor necrosis factor alpha* (TNF α) gibi dolaşımdaki inflamatuvar belirteçlerin yanı sıra pro-inflamatuvar adipokinler leptin ve resistin ile de pozitif koreledir (73). Maalesef bu çalışmaların korelasyon analizleri dolaşımdaki chemerinin biyoaktivitesi, orjini ve etki bölgeleri hakkındaki mekanizmaları pek de aydınlatamamaktadır. Fakat dolaşımdaki chemerin'de gözlenen yükselmeler ile uyumlu olan in vitro çalışmalar kültüre edilen insan kondrositleri ve sinoviositlerinde chemerin tedavisi ile IL-6, *Interleukin 8* (IL-8), TNF α , CCL2 ve *Interleukin 1 β* (IL-1 β) (88, 96) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin sekresyonu arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, TNF α tedavisi kültüre edilmiş insan barsak epitel hücrelerinde, fare adipositlerinde ve fare serumunda chemerin sekresyonunu artırır. Bunun gibi, inflamasyona cevaben chemerin üretimi, inflamatuvar mediatörlerin sekresyonunu ve

ekspresyonunu değiştirerek, potansiyel olarak sürekli kronik inflamasyon için bir pozitif geri bildirim döngüsü oluşturarak inflamatuvar cevaba aktif olarak katkıda bulunabilir (73).

Lokal inflamatuvar cevapların modülasyonunda, chemerin seviyeleri hem fare hem de insanlarda psöriazis, kanser, artrit, lupus ve multiple sklerozis gibi hastalıklı dokularda sıklıkla artmaktadır. Artmış chemerin ekspresyonu ve biyoaktivasyonu sıklıkla iltihaplanmış doku bölgesine özgüdür ve dolaşımdaki chemerin seviyelerinde benzer bir değişime karşılık gelebileceği gibi böyle bir benzerlik grlmeyebileceğine de dikkat etmek gerekir. Örneğin, insan çalışmalarında sinovial sıvıya lokalize olan romatoid artrit, osteoartrit (OA) ve psöriatik artrit inflamasyon bölgesindeki chemerin konsantrasyonları iki kata kadar artmaktadır. Fakat OA'in şiddeti ile sinovial sıvıdaki chemerin düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen, serum chemerin seviyelerinin değişmediği belirtilmiştir. Dahası, hastalıklı eklemlerin içindeki proteolitik olarak parçalanmış chemerinlerin total chemerine oranı dramatik olarak artmıştır ve sıklıkla dolaşımdaki izoformların dağılımından önemli ölçüde farklı olan zgn izoform profilleri ile ilişkilendirilmektedir (73). Aktif doku yaralanma bölgelerinde veya inflamasyonda lokalize chemerin izoform üretimine, chemerin aktive edici proteazların nötrofilden salınımı, kan pıhtılaşması ve insan patojen kaynaklı proteazlar artan chemerin aktivitesine katkıda bulunabilmektedir (81). Fakat chemerin seviyelerinde artışa katkı sağlayan doku kaynağı veya hücre tipi büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu alışmalar birlikte değerlendirildiğinde toplam dolaşan chemerin seviyelerinin mutlaka hastalık durumunda meydana gelen değişikliklerin derecesini yansıtmayabileceğini, oysaki chemerinin lokalize aktivasyonu ve ekspresyonu inflamatuvar cevaplarda chemerin sinyalizasyonunun etkisinin önemli bir belirleyicisi olduğunu göstermektedir (73).

Sistemik bir inflamatuvar süreç olan obezitede chemerin ekspresyonları yükselme eğilimdedir. Artan chemerin düzeylerinin bozulmuş glukoz homeostazisi, insülin direnci, kan basıncı ve dislipidemi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (73) Kilo kaybı ile sistemik dolaşımdaki chemerinin azaldığı gösterilmiş ve buna bağlı olarak da insülin duyarlılığında iyileşme, glukoz homeostazisinde ve lipit profilinde düzelme gözlenmiştir (73).

1.7. Desnutrin/ATGL ve Yağ Metabolizması

Lipit homeostazisi, lipitler ve yağ asitlerini oluşturmak için tasarlanan, onları köken aldıkları dokudan alıp hedef dokulara teslim eden ve metabolik amaçlar için katabolize eden süreçlerin bir dengesi anlamına gelmektedir. Sayısız genler ve sinyal bileşenleri adipoz doku, karaciğer, kas, sindirim sistemi, pankreas ve sinir sistemini içeren birçok doku ve organlar arasında entegre bir iletişim ağından sorumludur. Bu iletişim ağı lipit ve enerji homeostazisini sağlar. Bu süreçlerin insan sağlığı için santral fizyolojik önemi olmasına rağmen lipitlerin sentezi, alınımı, depolanması ve kullanımını düzenleyen birçok temel mekanizmalar bazen yetersiz kalmaktadır (97).

Yağ asitleri (YA) bilinen bütün organizmaların temel hayati bileşenleridir. Hüresel enerji üretimi için önemli birer substrattırlar. YA'lar biyolojik membranları oluşturan lipitleri de içeren bütün lipit sınıfları için esansiyel prekürsördür. YA'ların ayrıca açılmış proteinlerde protein fonksiyonları için ve nükleer reseptör transkripsiyon faktörleri için ligand olarak da önemli rolleri bulunmaktadır. Bu faydalı özelliklerin aksine esterleşmemiş YA'lar göreceli olarak düşük konsantrasyonlarda olduğu zaman bile hücreler için zararlı olabilir. Yağ hücreleri dışındaki hücreler ve dokuların, artmış YA konsantrasyonlarına kronik maruziyeti lipotoksisite terimi olarak sınıflandırılan yan etkileri tetiklemektedir (98, 99). Bu yüzden, fazla miktarda besin maddeleri alındığında, bütün ökaryotlar YA'ları triaçilgliserol (TAG) damlacıkları olarak açlık durumunda enerji sağlamak için ve zararlı etkilerini detoksifiye etmek için reesterifiye eder ve depolarlar (97).

Son zamanlara kadar, lipit damlacıkları TG'lerin atıl depolama havuzu olarak görülürdü. Şu anda bilindiği üzere vücudumuzda bulunan bütün hücreler dokuya spesifik konsantrasyonlarda, nötral lipitleri (TG ve kolesterol esterleri), fosfolipitleri ve esterleşmemiş kolesterolleri içeren yağ damlacıklarını oluşturur. İlaveten, birçok protein lipit damlacıkları ile ilişkilidir (100, 101). Bunlar yapısal proteinler, lipit modifiye edici enzimler ve enzim aktivitelerini düzenleyen proteinlerdir. Bu güne kadar, bu faktörlerin birçoğunun fizyolojik rolünün anlaşılması zor olmuştur. Fakat mevcut sınırlı bilgilerimizden faydalanarak lipit damlacıklarının esnek dinamik organelleri temsil ettiğini söyleyebiliriz. Bunlar membran bileşenlerinin, enerji substratlarının ve sinyal moleküllerinin üretiminde kullanılmaktadır (102, 103). Lipit damlacıkları birçok hücre tipinde gözlenmesine rağmen, memelilerdeki yağın büyük

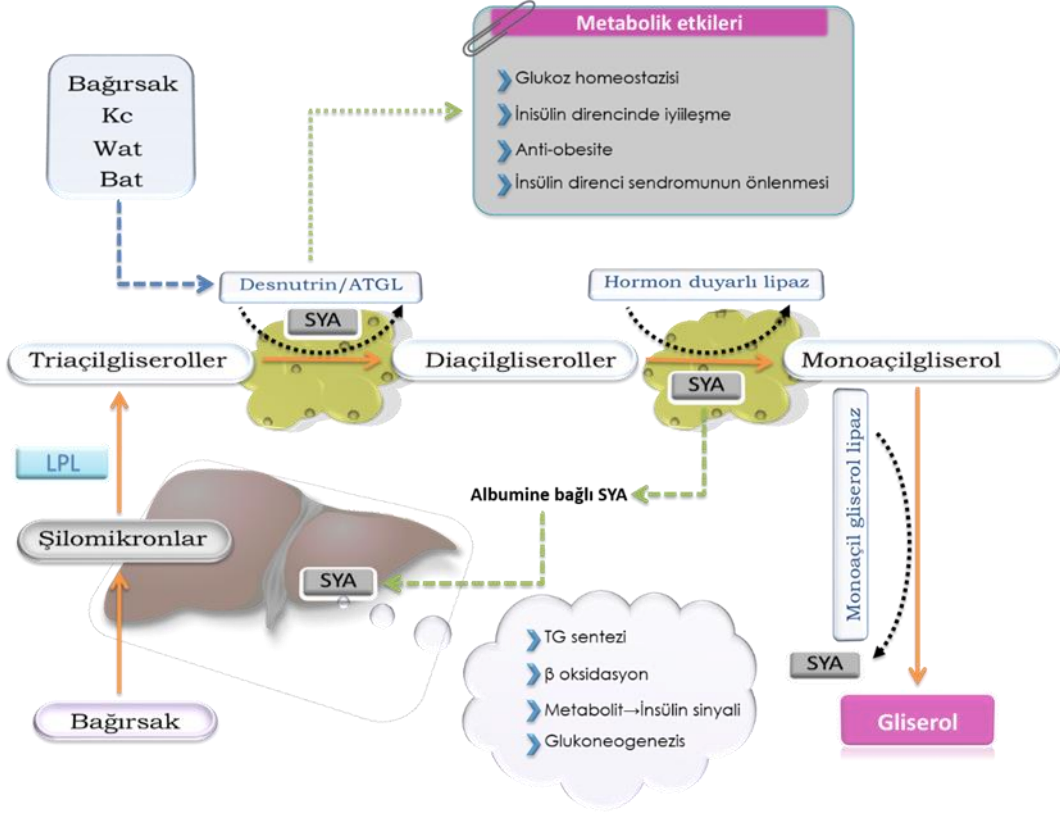
çoğunluğu beyaz yağ dokusu olarak bulunur. Enerji homeostazisinin düzenlenmesine beyaz yağ dokusunun katkısı, hem çok büyük lipid depolama kapasitesinden hem de birçok hormon ve adipositokinleri sekrete eden bir endokrin organ olarak fonksiyon yapmasından dolayıdır (104). TG sentez ve yıkımındaki senkronizasyon kaybı olduğu zaman obezite ve Tip2DM gibi metabolik hastalıklar ortaya çıkmaktadır.

Açlık esnasında veya egzersiz gibi enerjiye ihtiyacın arttığı durumlarda, yağ katabolizması ve enerji substratının sağlanmasındaki anahtar süreç; depolanmış TG'lerin hidrolize edilerek parçalanması, YA ve gliserol oluşturulması ve onların adipositlerden salınmasıdır. Lipoliz olarak adlandırılan bu sürecin başlangıcındaki düzenleyici kontrol basamakları hormonal olarak yapılmaktadır ve sonuçta TG'leri lipoliz etmek için hücre içi anahtar lipazlar aktive edilmektedir. Şu anda, adipoz ve adipoz olmayan dokularda yağın lipolitik olarak yıkılmasında fonksiyon gösteren üç enzim bilinmektedir; adipoz trigliserit lipaz (ATGL) veya desnutrin, hormon sensitif lipaz (HSL) ve monogliserit lipaz (MGL) (97).

1.7.1. Lipolizin Düzenlenmesi

Birçok lipolitik ve anti-lipolitik efektörler çeşitli dokularda depolanmış yağın yıkımını kontrol etmektedir (105, 106). Bunlar hormonlar, sitokinler ve adipokinlerdir. Adipoz dokuda en güçlü uyarıcı sinyaller β -adrenerjik reseptörleri aktive eden katekolaminlerdir (107). Fare adipositlerinden β -adrenerjik reseptörlerin (β -AR) üç alt tipi eksprese olmaktadır (β -AR'lar): β_1 -AR, β_2 -AR ve β_3 -AR. İnsan yağ dokusunda sadece β_1 ve β_2 reseptörler lipolizi uyarırlar. Katekolaminler bu reseptörlere bağlandığı zaman G_s proteinleri adenilat siklazı aktive eder bu da cAMP seviyelerinin artışına ve cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA)'nın artan aktivitesine sebep olmaktadır (106, 108, 109). Lipolitik enzimleri ve lipid damlacığı ilişkili proteinleri içeren hedef proteinlerin PKA aracılığıyla fosforilasyonu yağ dokusundan yağ asitleri ve gliserolün salınımında yüz kata kadar bir artışa sebep olmaktadır. G_s proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla PKA'yı uyarın diğer hormonlar glukagon, paratiroid hormon, tirotropin, α -melanosit stimulan hormon ve adrenokortikotropin'dir. Birçok anti-lipolitik faktörlerin inhibitör G_i proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla etki ettiği gösterilmiştir (106). Bu faktörler α_2 adrenerjik reseptörler aracılığıyla etki eden katekolaminler, adozin (A1 adozine reseptör), prostaglandin (E2 reseptör), NPY (NPY-1 reseptör), ve nikotinik asittir (GPR109A reseptör) (97). α ve β adrenerjik reseptörlerin

göreceli dağılımından dolayı lipolitik aktivite doku ve hücre tipine özgü olarak belirlenmektedir.



Şekil 5. Lipolize etki eden hormonlar ve Desnutrin/ATGL'in metabolik etkileri

İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü lipolizisin en güçlü inhibitör hormonlarıdır (105). Bu hormonlar etkilerini öncelikle insülin reseptörleri aracılığıyla haberleşerek, insülin reseptör substrat 1-4'ün fosforilasyonu (IRS1-4), fosfotidil inozitol-3 kinazın aktivasyonu (PI3K) ve protein kinaz B/AKT'nin (PKB/AKT) indüksiyonunu yaparak göstermektedir. Aslında bu lineer yolaktaki karmaşıklık diğer sinyal kaskatları ile etkileşen kritik nodlardaki farklılıklar aracılığıyla oluşmaktadır (110). IR yolağındaki kritik nodlar, sitokinler ve ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) sinyalleri ile insülin reseptör (IR) ve insülin reseptör substrat (IRS) arasındaki etkileşimleri içermektedir. Bu noktada bir sinyalleşme ağı sayısız biyolojik süreçleri düzenlemek için kurulmuştur. Lipoliz, fosfodiesteraz 3B'nin fosforillenmesiyle cAMP'nin yıkılıp PKA'nın aktivasyonunun azalması ile sonuçlanan birçok basamaktan etkilenmektedir (97).

1.7.2. Lipolizdeki Klasik Enzim: Hormon Sensitif Lipaz

TG'lerin hormon aracılığıyla katabolizmasını kolaylaştırmak için keşfedilen ilk enzim HSL'dir. Köpeklerin ve insanların beyaz yağ dokusundaki (WAT) açlığın indüklediği lipolitik aktivitenin ilk gözlemleri 1932 ve 1950 gibi erken bir dönemde raporlanmasına rağmen, 1960'lara kadar lipoprotein lipazdan (LPL) farklı ve hormonlar tarafından düzenlenen WAT ilişkili lipaz gösterilememiştir (97). Dönüm noktası özelliğinde olan bir çalışmada, Vaughan ve ark. (111) çeşitli memelilerin WAT'ında iki bağımsız lipolitik aktivite keşfetmiştir ve bu enzimler HSL ve MGL olarak adlandırılmıştır. HSL'nin saflaştırılması, ilgili cDNA ve genin kopyalanması ve proteinin yüksek seviye heterolog sentezlenmesi enzimin, dokuya spesifik fonksiyonları ve çeşitli agonist ve antagonistlerle regülasyonu gibi biyokimyasal özelliklerinin geniş kapsamlı çalışılmasına izin vermiştir. Bu konuda daha detaylı bilgiler derleme makalelerinde mevcuttur (64, 112-114).

HSL TG, diaçilgliserol (DG), monoaçilgliserol (MG), kolesterol esterleri (CE), retinil esterleri (RE) ve ρ -nitrofenilbutirat gibi diğer ester substratlarını hidroliz edebilen geniş bir substrat özgünlüğü sergilemektedir. Göreceli maksimal hidroliz hızları TG:DG:MG:CE:RE için 1:10:1:4:2 aralığındadır. Bu yüzden, TG'ler bütün bu doğal lipit esterleri arasında HSL için en kötü substrat iken DG'ler en iyi substrattır. TG molekülü içerisinde, HSL tercihen sn-1 ve sn-3 pozisyonunda bulunan primer ester bağlarını hidroliz eder. İn vitro olarak HSL'nin fosforilasyonu TG ve CE hidrolizi için enzim aktivitesini 1,5-2 kat kadar hafifçe artırır. DG veya MG hidrolizi için aktivite etkilenmemiştir (97).

1.7.3. Desnutrin/ATGL: Lipolizde Yeni Bir Hormon

2004'de, üç bağımsız grup tarafından TG hidrolize edebilen bir enzimin varlığı keşfedilmiştir ve bu enzimi ATGL (115), desnutrin (116), veya kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 ζ (iPLA2 ζ , *calcium-independent phospholipase 2 ζ*) (117) olarak adlandırmışlardır. Bu başlangıç raporlarından kısa bir süre sonra, ATGL otolog genleri ve proteinleri diğer omurgalılarda, sineklerde, mantarlarda ve bitkilerde de tanımlanmıştır. *Drosophila melanogaster* da brummer enzimi, *Saccharomyces cerevisiae*'de triaçilgliserol lipaz-4 ve *Arabidopsis thaliana*'da şeker bağımlı-1 enzimi ilgili organizmaların her birinde kuvvetli TG hidrolaz aktivitesi sergilemektedir ve

hepsi bulunduğu organizmalarda TG homeostazisinin düzenlenmesinde temel bir role sahiptirler (97).

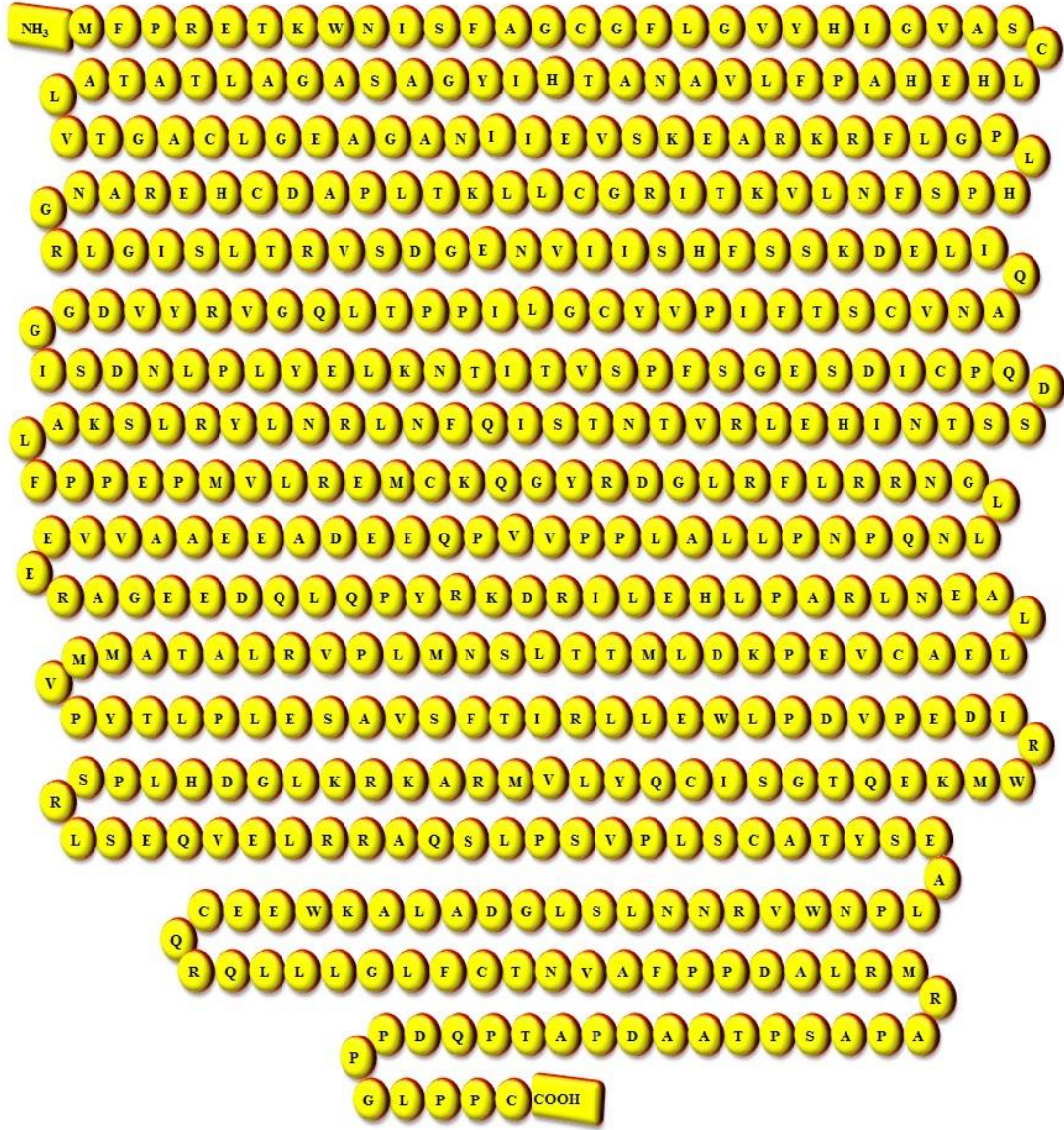
1.7.3.1. Desnutrin/ATGL Enzimolojisi

Desnutrin/ATGL DG'den daha çok TG için 10 kat daha fazla substrat özgülüğü sergiler ve özellikle TG hidrolizinde birinci basamağa etki ederek DG ve SYA dönüşümünü sağlamaktadır (115). Desnutrin/ATGL'nin TG molekülü içerisindeki ester bağlarının kimyasal olarak ayrımı için stereospesifikliğı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu yüzden Desnutrin/ATGL tarafından oluşturulan DG'in çeşitli PKC izoenzimlerinin aktivasyonu gibi, sn-1,2-DG'yi içeren sinyal sürecine katılıp katılmadığı da bilinmemektedir. Desnutrin/ATGL'nin ayrıca TG hidrolaz aktivitesinden daha düşük olduğu gösterilen transaçilaz ve fosfolipaz aktivitelere de sahip olduğu bilinmektedir (97). HSL'in aksine, Desnutrin/ATGL MG, CE'leri veya RE'leri hidrolize etmez. Smirnova ve arkadaşları, Desnutrin/ATGL'nin hidrolitik fonksiyonlarının adipoz dokuda lipit damlacıklarının (adipozom) katabolizması ile sınırlı olmadığını ve enzimin adipoz trigliserit lipaz olarak adlandırılmasından ziyade fonksiyonlarını daha iyi yansıttığı için adipozom trigliserit lipaz olarak adlandırılmasını önerdiler (118).

1.7.3.2. Desnutrin/ATGL Geni, mRNA'sı ve Protein Yapısı

Fare Desnutrin/ATGL geni (PNPLA2, *patatin-like phospholipase domain-containing protein 2*) 7F5 kromozomu üzerinde yaklaşık 6 kb'lık bir bölgeyi kapsayan 9 ekzon içermektedir. Genin transkripsiyonu 1.96 kb'lık bir mRNA kodlar ve bu da moleküler ağırlığı 54 kDa olan 486 aminoasit içeren bir protein sentezine katılmaktadır. Desnutrin/ATGL aa dizilimi şekil 6'da görülmektedir. İnsan Desnutrin/ATGL geninin 10 ekzonu 11p15.5 kromozomu üzerinde lokalize olan genomik DNA'nın 6.32kb'nı kapsamaktadır. Memeli Desnutrin/ATGL'si patatin bölgesinin varlığı ile karakterize bir gen ailesine aittir (Pfam01734). Bu yapısal motif patatin olarak adlandırılmıştır ve DG, MG ve fosfolipaz aktivitesi gösterirken TG hidrolaz aktivitesi göstermemektedir (97, 119). Desnutrin/ATGL beş genlik bir grup ve patatin-like fosfolipaz domain containing 1-5 (PNPLA1-5, *patatin-like phospholipase domain-containing protein 1-5*) isimli proteinler ile çok yakından

ilişkilidir (120, 121). Bu protein ailesinin üyeleri ATGL (PNPLA2), PNPLA1, adiponutrin (PNPLA3), GS2 (PNPLA4) ve GS2-benzeri (GS2-like) (PNPLA5)'dir.



Şekil 6. Desnutin/ATGL aminoasit dizilimi

Bu güne kadar, fare genomunda GS2 için hiç otolog gen tanımlanamamıştır. Desnutrin/ATGL'nin daha uzaktan ilişkili olduğu üyeler ise, nöropati hedefli esteraz (NTE, PNPLA6), NTE-ilişkili esteraz (NRE, PNOLA7), kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 γ (iPLA2 γ , iPNPLA8) ve fosfolipaz A2 grup VI (PLA2G6, PNPLA9)'yı içermektedir. ATGL gibi, adiponutrin, GS2 ve GS2-benzeri(GS2-like) enzimler in vitro ölçümlerde hidrolaz ve transaçilaz aktivitesi göstermektedir (117, 122). ATGL, adiponutrin ve GS2-benzeri için düşük spesifik fosfolipaz aktivitesi gösterdiği tespit

edilmiştir (117, 123). Patatin etki alanı içeren proteinler içerisindeki yapısal ve fonksiyonel çeşitlilik düşünüldüğünde, bu proteinler için patatin-like fosfolipaz domain-containing 1-9 ismi biraz yanıltıcıdır ve daha genel bir isim patatin domain içeren lipit hidrolaz 1-9 (PDLH1-9) (*patatin domain-containing lipid hydrolase1-9*) olarak değiştirilmelidir (97).

İnsan ve fare ATGL enziminin primer yapısı %84 oranında dizi benzerliği göstermektedir. Dizi benzerliği özellikle enzimin aktif bölgesinde bulunan patatin domain içerisinde daha yüksektir (>%95). İlginç bir şekilde, diğer tipik TG hidrolazların aksine, patatin domain içeren enzimlerin aktif bölgeleri bir katalitik triaddan oluşmaz. Ailenin ilişkili üyelerinin (patates patatini) üç boyutlu yapısının belirlenmesi enzim mekanizmasının katalitik diad'a dayandığını ortaya koymuştur (124). Desnutrin/ATGL'de mutasyonel analizlerin serin 47'de olduğu tanımlanmıştır (118, 122). Homoloji değerlendirilmelerinden, Desnutrin/ATGL'deki katalitik diad için kritik olan ikinci aa'nın aspartat 166 olduğu varsayılmıştır. Dizi ve 3D yapısal benzerlikler ayrıca şunu da işaret etmektedir; diad genel olarak hidrolaz/esteraz içinde bulunan üç-tabaka $\alpha/\beta/\alpha$ mimarisi içerisinde gömülüdür (125). Benzer şekilde, diğer patatin domain enzimlerde gösterildiği gibi, Desnutrin/ATGL'deki geçiş durumu glisinden zengin oksianyon deliği tarafından stabilize edilebilir. Desnutrin/ATGL'nin C-terminal bölgesi PNPLA ailesinin diğer üyelerine zayıf homoloji gösterir. 315'den 360'a kadar olan aa'ların hidrofobik uzantısı lipit damlacıklarının bağlanmasına aracılık ettiği önerilmektedir (115). İlaveten, iki fosforilasyon bölgesi enzimin C-terminal bölgesinde tanımlanmıştır (İnsan Desnutrin/ATGL'sinde serin 404 ve serin 428) (115, 126). Enzim fosforilasyonunun ve ilişkili protein kinazların fonksiyonel rolü hala bilinmemektedir. Özellikle, insan proteini fare otologundan 19 aa daha uzundur ve onun C terminali üzerinde prolinden zengin dizi bulunmaktadır. Bu peptid uzantısının Desnutrin/ATGL regülasyonunda ve fonksiyonunda türe özgü farklılıklar gösterip göstermediği açıklığa kavuşturulmamıştır (97).

1.7.3.3. Desnutrin/ATGL'nin Fizyolojik Fonksiyonu

Lipolizde Desnutrin/ATGL'nin rolünün anlaşılması ATGL-defektli (ATGL-ko) farelerdeki gözlemlere dayanmaktadır (127). HSL-defektli (HSL-ko) farelerin aksine, ATGL-ko hayvanlar şiddetli bir lipit fenotipine sahiptir. Desnutrin/ATGL yokluğunda WAT'dan YA'lerinin salınımında %75'den daha fazla miktarda azalma

görülmektedir. ATGL-ko farelerde özellikle bütün organlarda ve analiz edilen hücre tiplerinde TG birikir, bu da birçok dokuda TG katabolizmasında Desnutrin/ATGL'nin önemli fonksiyonu olduğunu göstermektedir. Defektif TG mobilizasyonu ve çok fazla miktarda TG birikimi, kalp kasında ciddi myopatilere, BAT defektif termogeneze ve genel olarak enerji homeostazisinde bir defekte sebep olmaktadır. Kalp'te aşırı TG birikimi kalp yetmezliğine ve ATGL-defektli farelerde prematür ölümlere sebep olur. Ayrıca WAT'da TG hidrolaz aktivitesi ve hormon-stimüle lipoliz ciddi ölçüde azalmıştır, bu da Desnutrin/ATGL'nin direkt ya da indirekt bir mekanizma aracılığıyla hormon sensitif olduğu görüşü ile tutarlıdır (97).

HSL-defektif hayvanların aksine, ATGL-ko erkek fareler fertildir, bu da testislerde masif TG birikiminin tek başına erkek infertilitesi için yeterli bir neden olmadığına işaret etmektedir. Bunun yerine, HSL-ko farelerde DG, CE ve RE'nin bozulmuş hidrolizi germ hücre maturasyonunda bir defekte sebep olabileceği daha muhtemel görülmektedir. Plazma YA, TG ve keton cisimlerinin konsantrasyonu hem HSL-ko farelerin hem de ATGL-ko farelerin açlık durumlarında azalmıştır, fakat Desnutrin/ATGL eksikliğinde seviyeler daha düşüktür. İlginç bir şekilde, total kolesterol ve HDL kolesterol konsantrasyonları HSL-ko farelerde artmıştır ve ATGL-ko farelerde azalmıştır. Bu beklenmedik farkın sebebi belli değildir ve aydınlatılması gerekmektedir (97).

ATGL-defektif farelerin analizleri değerlendirildiğinde, Desnutrin/ATGL'nin HSL'dan TG'e yaklaşık 10 kat daha yüksek spesifite ile DG ve YA'e dönüştüren, TG hidrolizinde birinci basamak için hız sınırlayıcı olduğunu göstermektedir. HSL etkili bir biçimde DG'yi parçalayarak MG ve YA'ne dönüştürmektedir. YA ve gliserole dönüşüm ile sonuçlanan son basamak MGL tarafından gerçekleştirilir. Desnutrin/ATGL ve HSL'a ilaveten diğer TG hidrolazların da WAT'da TG hidrolize katkı sağlayıp sağlamadıkları son zamanlarda Schwiger ve arkadaşları tarafından ele alınmıştır (65). HSL'ın spesifik bir inhibitör (NovoNordisk tarafından sağlanan) ile tam inhibisyonu ATGL-ko adipoz dokuda YA salınımının hemen hemen tam bir yokluğu ile sonuçlanmaktadır. Bu da Desnutrin/ATGL ve HSL'nin yanı sıra ilave lipazların farelerdeki beyaz yağ hücrelerinin lipolitik kapasitelerine daha az katkı sağladığını düşündürmektedir (97).

1.7.3.4. Desnutrin/ATGL'nin Regülasyonu

Vücudun birçok dokusundan Desnutrin /ATGL salınmasına rağmen, Desnutrin /ATGL enzim aktivitesinin ve mRNA'sının en yüksek seviyeleri WAT ve BAT'da bulunmuştur (122). WAT'daki HSL'in regülasyonunda mevcut olan bilgi haznesinin aksine Desnutrin /ATGL aktivitesinin aktivasyonuna yol açan moleküler yollar hakkında nispeten daha az bilgi mevcuttur. HSL-ko WAT'ının hormonal stimülasyona cevabı WAT'da HSL inhibisyonunun "hormon ile indüklenebilir" hidrolitik aktivitenin devam ettiğini göstermektedir. Bu da Desnutrin/ATGL aktivitesinin hormonal sinyal tarafından ya direkt olarak ya da indirekt olarak aktive edildiğini göstermektedir (97). Birçok gözlemler Desnutrin/ATGL aktivasyonuna yol açan moleküler mekanizmaların HSL için tarif edilenden farklı olduğuna işaret etmektedir. İlk olarak, HSL'in aksine Desnutrin/ATGL adipositlerin lipit damlacıklarında bazal durum ve aktive edilmiş durumda benzer miktarlarda bulunur (115). İkincisi, Desnutrin/ATGL'nin fosforile olabilmesine rağmen, PKA için bir hedef değildir (115, 126). Üçüncüsü, Desnutrin/ATGL aktivitesi, α/β hidrolaz bölgesi içeren protein 5 (ABHD5, *α/β hydrolase domain-containing protein 5*) veya karşılaştırmalı gen tanımlama-58(CGI-58, *Comparative gene identification 58*) olarak açıklanan bir protein tarafından büyük ölçüde artırılır. CGI-58 HSL enzim aktivitesini etkilemez (97).

Bu güne kadar hormonal ve nutrisyonel efektörler aracılığıyla Desnutrin/ATGL'nin regülasyonunu gösteren birçok çalışma Desnutrin/ATGL mRNA seviyelerini ölçmek için kısıtlı analiz imkanlarına sahip olduğundan dolayı Desnutrin/ATGL enzim aktiviteleri gösterilememiştir. Tahmin edildiği gibi WAT'da TG hidrolaz aktivitesi nutrisyonel durumdan etkilenmektedir. Desnutrin/ATGL mRNA konsantrasyonu açlık esnasında artmakta ve toklukta azalmaktadır. Açlık esnasında Desnutrin/ATGL mRNA seviyeleri HSL mRNA seviyeleri ile paralel değildir. HSL mRNA seviyeleri akut açlık esnasında down regüledir ve sadece uzamış açlık (3-5 gün) esnasında artar (97). Villena ve arkadaşlarının (116) fare 3T3-L1 adipositlerindeki in vitro deneylerden, tokluk durumunda Desnutrin/ATGL mRNA seviyelerinin artışından glukokortikoidlerin sorumlu olabileceği sonucuna varmışlardır. Desnutrin/ATGL mRNA'sı genetik obezite modellerinde (ob/ob ve db/db fare) önemli derecede down regüle olması obezite patogenezinde

Desnutrin/ATGL'nin muhtemel bir katkısını göstermektedir (116, 128); fakat bu etki bütün çalışmalarda gözlenmemiştir (122).

Daha önce belirttiğimiz gibi gerek prevalanstaki artışlar, gerekse diğer ilişkili olan hastalıklar nedeniyle çağımızın vebasî niteliğinde olan MetS etyopatogenezinin aydınlatılması zorunlu hale gelmiştir. Organizmada artan SYA'lerinin pro/anti-inflamatuar dengeyi etkilediği ve çeşitli peptid yapıdaki pro/anti-inflamatuar özellikteki hormonların arasındaki dengenin bozulması insülin direncine neden olmaktadır (18, 129). Pro/anti-inflamatuar özelliği tam olarak aydınlatılmamış olan Chemerin (130,131) ve ortamdaki SYA'lerinin artışına sebep olan Desnutrin/ATGL peptidleri doğrudan insülin direnci ile ilgilidir. Buna rağmen bu iki peptid yapılı hormonun MetS'in patogenezinde rollerinin olup olmadığı ve MetS etyopatogenezinde çok önemli rolleri olduğu bilinen karaciğer ve yağ dokusunda da bu iki hormonun düzeylerinin nasıl değiştiği ve bunun serumdaki yansımalarının nasıl olduğu henüz yeterince araştırılmamıştır.

Dolayısı ile bu çalışmada amacımız; fruktoz ile indüklenerek metabolik sendrom oluşturulmuş ratların karaciğer, yağ dokusu ve serumlarında desnutrin/ATGL, chemerin ekspresyonlarının nasıl değiştiğini göstermek ve ayrıca metabolik sendroma bağlı olarak bu iki hormonun sirkülasyondaki düzeylerinin nasıl etkilendiğini ve diğer biyokimyasal parametrelerle ilişkilerinin olup olmadığını ortaya çıkarmak için bu tez çalışması dizayn edildi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Protokolü

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunun 15.11.2012 tarih ve 109 karar numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (FÜDAM) ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Tablo 3. Standart rat yeminin içeriği (132, 133)

| Parametre | Miktar |
|---|--------------|
| Su (en fazla) | % 12 |
| Ham protein (en az) | % 24 |
| Ham selüloz (en fazla) | % 7 |
| Ham kül (en fazla) | % 8 |
| HCl'de çözünmeyen kül (en fazla) | % 2 |
| NaCl (en fazla) | % 1 |
| Mineral karması * | % 1.25 |
| Vitamin karması # | % 1.25 |
| Metabolik enerji | 2650 kcal/kg |

*Mineral karması: Kalsiyum (% 1 – 2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (% 0.5 – 0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

#Vitamin karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vitamin D3 (1000 IU/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vitamin B2 (4 mg/kg)

Çalışmada, 8 haftalık yaklaşık 260-290 gram ağırlığında *Sprague-Dawley* cinsi 14 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar FÜDAM'dan temin edildi ve bakımları burada gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen ratlar rastgele olarak kontrol ve MetS grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. MetS oluşturmak için D-Fruktoz (BioShop Canada Inc) kullanıldı. Hayvanların beslenmesinde kontrol grubu için, *ad libitum* olarak standart pellet yemi ve çeşme suyu kullanılırken, kontrol grubu dışındaki gruba MetS oluşturmak amacıyla 8 hafta süreyle çeşme suyuna eklenmiş %10'luk fruktoz + standart pellet yemi diyeti *ad libitum* olarak verildi (41). Standart rat yeminin içeriği tablo 3'de gösterilmektedir. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık foto periyodunda ve 22–24 °C sabit sıcaklıktaki odalarda, üçerli ve ikiyeşerli gruplar halinde buldukları kafeslerde barındırıldı. Çalışmanın tüm aşamalarında 1983 Helsinky deklarasyonunda bildirilen “hayvanlarda bilimsel

çalışmalar için etik kurallara” uygun bir şekilde yapıldı. Çalışmanın başlangıcında ağırlıklar hassas terazi ile darası alınmış plastik bir kapta gerçekleştirildi. Daha sonra MetS gelişimini izleyebilmek için haftalık periyotlar halinde ağırlık takibi yapıldı.

2.2. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması

Metabolik sendrom protokolünün etik kurallara riayet ederek sonuçlandırılmasıyla birlikte ratlar steril cerrahi aletler yardımıyla dekapite edilip plazma ve serum örnekleri yapılacak olan analizler için sırasıyla aprotininli tüplere ve düz biyokimya tüplerine alındı. Alınan kanlar 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmaları ayrıldı. Bu numuneler daha önceden numaralandırılmış eppendorf tüplere yerleştirilip çalışma gününe kadar -80 °C’de saklandı. ELISA ve Western blot çalışmalarında kullanılmak üzere karaciğer ve abdominal bölge yağ dokusu alındı. Alınan doku örnekleri fosfat tamponu içeren çözeltiden geçirilip üzerindeki kan artıklarından arındırıldıktan hemen sonra hızlı bir şekilde donduruldu. Çalışma gününe kadar bu örnekler -80 °C’de saklandı.

2.3. Dokuların Homojenizasyonu

Çalışmaya başlamadan önce kontrol ve metabolik sendrom gruplarına ait karaciğer ve yağ dokuları için toplamda 28 tane eppendorf her bir grup için ayrı ayrı numaralandırıldı. Daha sonra bu numaralandırılmış eppendorflara RIPA Lysis Buffer System içerisinde bulunan RIPA Lysis bufferdan her bir eppendorfa 900’er µL eklendi. Bunların üzerine de 10 µL PMSF solüsyonundan, 10 µL sodium orthovanadate solüsyonundan ve 20 µL protease inhibitor cocktail solüsyonundan olacak şekilde her bir eppendorfa konuldu. Çalışma günü gruplara ait dokular -80°C’den aldıktan sonra her bir grubun karaciğer ve yağ dokuları 100 mg olacak şekilde tartıldı. Bu dokular steril bistüriler ile ince parçalar halinde kesildikten sonra daha önce hazırlanan numaralandırılmış eppendorflara yerleştirildi. Bunların üzerine de yaklaşık 100 µL 0,5 mm zirconium oxide boncuklardan konuldu. Hazırlanan bu örnekler Bullet Blender homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Cihazın hızı 8, süresi 3 dakika olacak şekilde ayarlanıp çalıştırıldı. Süre sonrasında numuneler alınıp gözle incelendi iyice homojenize olmadığı düşünülen özellikle yağ dokusunu içeren örnekler cihazın hızı 9’a ayarlanıp tekrar 3 dakika daha homojenizasyona bırakıldı. Bullet Blender homojenizasyon cihazından alınan örnekler +4°C 10000 rpm’de 10 dakika

santrifüj edildi. Süpernatantlar numara sıraları dikkate alınarak ayrı eppendorflara alındı. Bu hazırlanan süpernatantlar ELISA ve Western blot çalışmalarında kullanıldı.

2.4. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümleri

Rutin biyokimyasal analizler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi merkez laboratuvarında gerçekleştirildi. Glukoz, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), trigliserit, total kolesterol, *High-density lipoprotein cholesterol* (HDL-K) düzeyleri Siemens Advia 1800 otoanalizörü (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tarrytown, NY, USA) ile cihaz ile uyumlu ticari kitler (Advia Chemistry) kullanılarak yapıldı. *Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol* (VLDL-K) ve *Low-Density Lipoprotein Cholesterol* (LDL-K) düzeyleri ise tablo 4’de gösterilen Friedewald formülü aracılığıyla bulundu (134).

Tablo 4. Friedewald formülü

-
- $LDL-K = T. Kolesterol - (HDL-K + VLDL-K)$
 - $VLDL-K = Trigliserit/5$
-

İnsülin direncinin göstergesi olan HOMA-IR (*homeostatic model assessment –insülin resistans*) düzeylerini hesaplamak için açlık glukozu ve açlık insülin değerleri kullanılarak yapıldı (135). Bu formülde kullanılan açlık glukozunun brimini mmol/L’ye çevirmek için çalışma gruplarımızdan elde ettiğimiz açlık glukoz değerleri 0,055 sabiti ile çarpıldı.

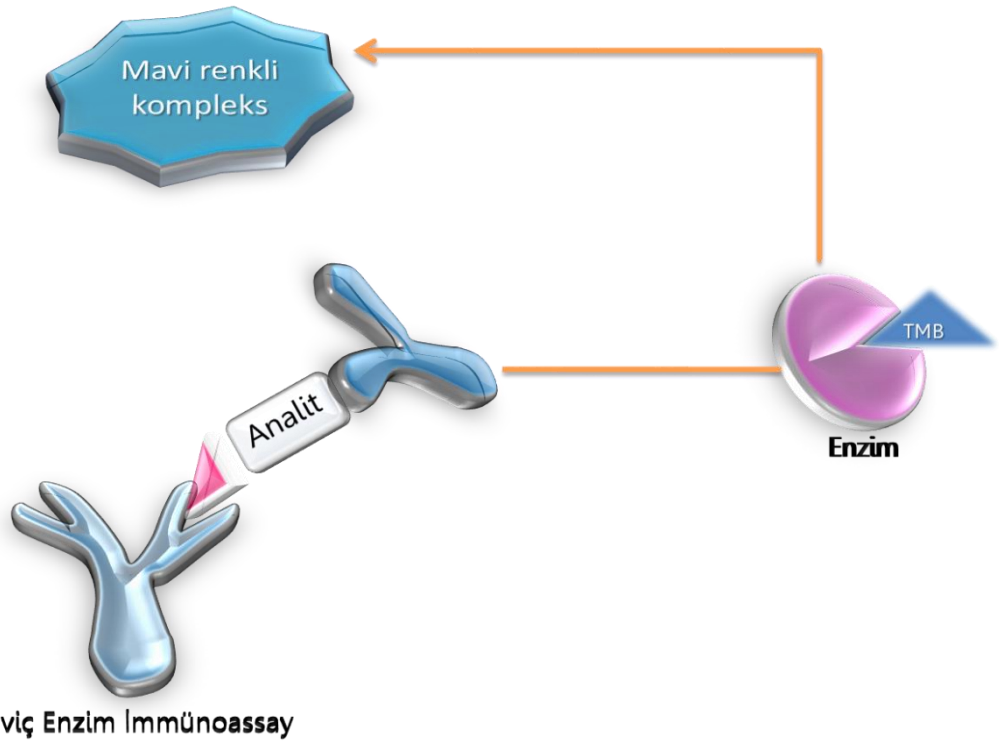
$$HOMA-IR = [Açlık glukozu (mmol/L) \times Açlık insülini (\mu IU/mL)] / 22,5$$

2.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yönteminin Temel Presibi ve Biyolojik Numelerin Analizleri

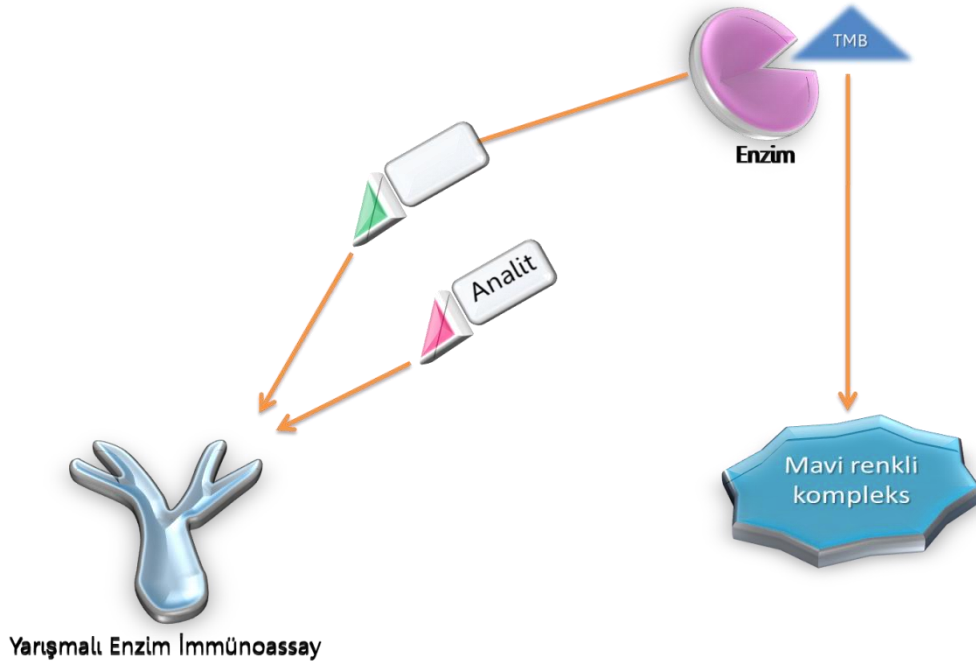
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) serum, plazma, idrar, tükürük, perikard, periton sıvısı gibi mayiler ve doku homojenizatlarından elde edilen süpernantantlarda antijenik yapıda olan ya da antijenik özellik kazandırılan biyolojik materyallerin düzey tespiti için en sık başvurulan yöntemlerden biridir.

ELISA’nın temel prensibi, antijen-antikor reaksiyonuna bağlı olarak oluşan renk reaksiyonudur. Oluşan renk ELISA okuyucusu adı verilen özel cihazı ile optimal absorbans aralıklarında okunmakta ve ölçülen biyolojik numunelerin konsantrasyonları otomatik olarak hesaplamaktadır. ELISA yöntemi kompetatif ve

non-kompetatif (sandviç) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Bu iki yöntemin benzerlikleri ve farklılıkları Şekil 7 ve 8’de şematize halde görülmektedir. Kompetitif yöntemde antijen-enzim konjugatları ile analitler yarışmaktadır. Analit konsantrasyonu ile oluşan rengin yoğunluğu arasındaki ilişki ters orantılıdır. Non-kompetatif yöntemde ise rengin yoğunluğu ile örneklerdeki antijen miktarları arasında doğru orantı mevcuttur. Bu çalışma da biyolojik numelerin analizinde sandviç enzim immunoasay yöntemi kullanıldı. Elisa çalışmasında kullanılan araç ve gereç listesi tablo 5’de ve ELISA plate’inin şematik görünümü ise şekil 9’da gösterilmiştir.



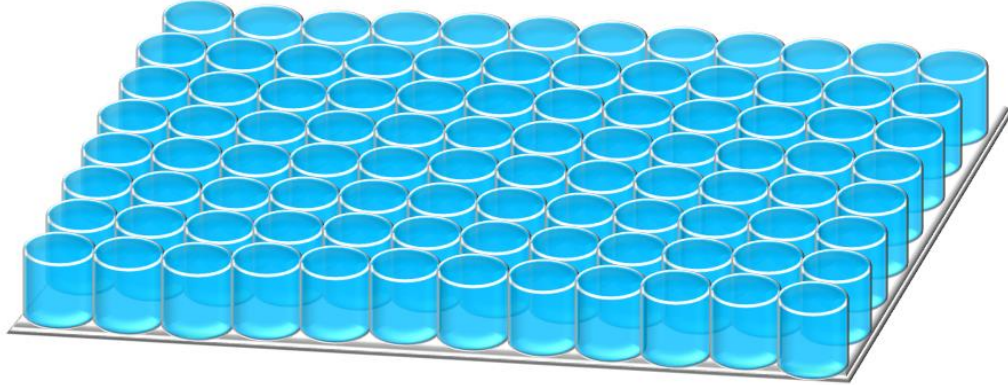
Şekil 7. Sandviç ELISA yöntemi şematizasyonu



Şekil 8. Yarışmalı ELISA yöntemi şematizasyonu

Tablo 5. ELISA çalışması için gerekli malzeme listesi

- 1) ELISA yıkayıcısı, okuyucusu ve yazıcısı
- 2) 10-100-1000 mikrolitre hacimleri alabilecek nitelikte otomatik pipetler ve pipet uçları
- 3) 100 mikrolitrelik 8 kanallı otomatik pipet ve pipet uçları
- 4) İnkübatör
- 5) Standartları hazırlamak için eppendorf tüpler
- 6) 100 ve 500 mL'lik beher ve erlenmayerler
- 7) Kurutma kağıdı
- 8) Distile su
- 9) Vorteks
- 10) Benmari



Şekil 9. ELISA plate'inin şematik görünümü

2.5.1. Chemerin ELISA Çalışması

Tablo 6. Chemerin ELISA kit içeriğinde bulunan malzemeler

| Sıra | Chemerin ELISA Kiti | Miktar |
|------|---|------------|
| 1 | Standart solüsyonu (320 ng/L) | 0,5 mL |
| 2 | Standart dilüenti | 3 mL |
| 3 | Antikor kaplı ELISA mikropate | 96 Kuyucuk |
| 4 | Streptovidin <i>Horse Radish Peroxidase</i> (HRP) konjugat reaktifi | 6 mL |
| 5 | Yıkama solüsyonu (30x) | 20 mL |
| 6 | Biotin ile işaretlemiş Chemerin antikor | 1 mL |
| 7 | Kromojen A solüsyonu | 6 mL |
| 8 | Kromojen B solüsyonu | 6 mL |
| 9 | Stop solüsyonu | 6 mL |
| 10 | Çalışma prosedürünü içeren klavuz | 1 adet |
| 11 | Plate'in üzerini inkübasyonda kapatmak için jelatin | 2 adet |

Serum ve doku süpernatantları -80°C 'den çıkarılıp çözöldükten sonra lot numarası 20131205 ve katalog numarası CK-E90066 olan Eastbiopharm marka ELISA kiti ile kit çalışma prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Kitin içeriğinde bulunan malzemeler tablo 6'de verildi. Çalışmada kullanılan kitin *intra assay coefficient of*

variability (CV) değeri <%10, inter assay CV değeri <%12, ölçüm aralığı 1ng/L-300 ng/L ve sensitivitesi 0,52 ng/L idi.

Chemerin elisa kiti +4°C'den alındıktan sonra yarım saat oda ısısında herhangi bir işlem yapılmaksızın bekletildi. Bu süre içerisinde çalışmada kullanılacak olan serum ve doku süpernatantları numaralandırıldı. Çalışma reaktiflerin hazırlanması, analiz ve okuma olmak üzere üç bölüm halinde gerçekleştirildi.

2.5.1.1.Reaktiflerin Hazırlanışı

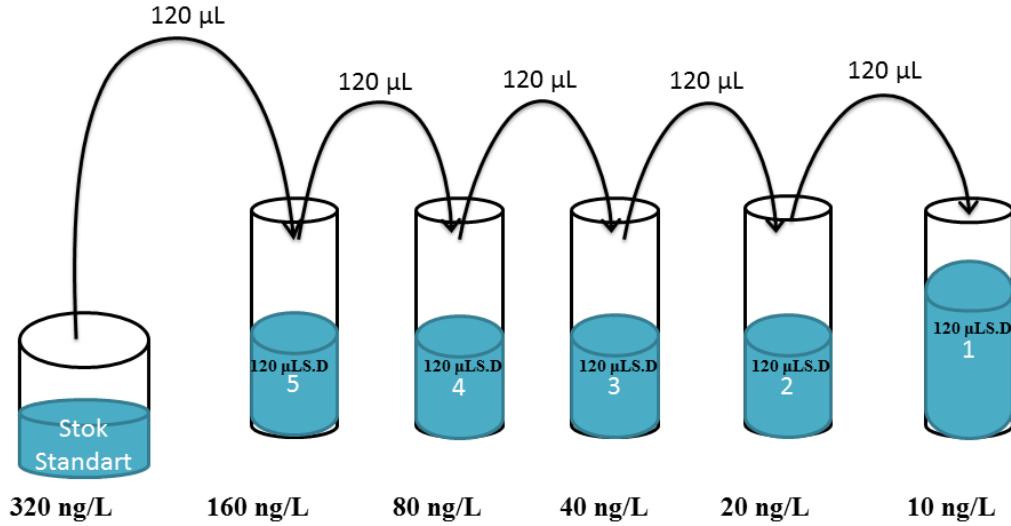
i) Standartların hazırlanması

Tablo 6'da da belirtilen içerisinde 320 ng/L Chemerin içeren sıvı standart solüsyonu stok solüsyon olarak kullanıldı. Bir spora 5 tane propilen 1,5 mL'lik eppendorf tüpler yerleştirildi ve numaralandırıldı. Öncelikle bu tüplerin her birine 120'şer µL standart dilüent eklendi. Daha sonra stok standartımızdan otomatik pipet yardımıyla 120 µL alınıp 5 numaralı tüpe eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için vorteks ile 10 saniye kadar bir süre çalkalama işlemi gerçekleştirildi. Böylelikle 5 numaralı standartımız 160 ng/L oldu. Sonra bu 5 numaralı standarttan yeni bir pipet ucu takılmış otomatik pipet aracılığıyla 120 µL alınıp 4 numaralı tüpe bırakıldı. Vorteks ile çalkalama işleminden sonra 4 numaralı standartın konsantrasyonunu 80 olmuş oldu. Bu işlem 1 numaralı tüpe kadar her seferinde yeni bir pipet ucu kullanarak yapıldı. Ve sırasıyla 10ng/L, 20 ng/L, 40 ng/L, 80 ng/L, 160 ng/L olan standart çözeltiler elde edilmiş oldu (şekil.10). Bu yapılan işleme seri dilüsyon denilmektedir.

ii) Yıkama solüsyonunun hazırlanması

Otuz kat konsantre halde sunulan 20 mL'lik yıkama solüsyonunu bir kata düşürmek için bir erlenmayerin içerisine 580 mL distile su koyup üzerine 20 mL'lik 30x yıkama solüsyonu boşaltıldı. Böylelikle 1x yıkama solüsyonu elde edildi.

| | | |
|----------|---------------|---|
| 160ng/L | Standart No:5 | 120µL stok standart +120µL standart dilüent |
| 80 ng/L | Standart No:4 | 120µL Standart No:5+ 120µL standart dilüent |
| 40 ng/L | Standart No:3 | 120µL Standart No:4+ 120µL standart dilüent |
| 20 ng/L | Standart No:2 | 120µL Standart No:3+ 120µL standart dilüent |
| 10 ng/mL | Standart No:1 | 120µL Standart No:2+ 120µL standart dilüent |



Şekil 10. Chemerin ELISA çalışması için standartların hazırlanışı

2.5.1.2. Analiz Aşaması

1. Blank ve standartların belirlenen kuyucuklara ekilmesi

A01 kuyucuğu blank kuyucuğu olarak ayrıldı. Buraya sadece çalışma esnasında sırası gelince kromojen A, B ve stop solüsyonu eklendi. Onun dışında hiçbir şey eklenmedi. B01'den G01'e kadar standartlardan 50'şer µL küçükten büyüğe olacak şekilde ekildi. Yani 1 numaralı standart B01'e 5 numaralı standart da F01'e gelecek şekilde konuldu. G01'e de stok standarttan ekim yapıldı. Daha sonra bu sadece standartların eklendiği kuyucuklara 50'şer µL *Streptavidin-horseradish peroxidase* (SA-HRP) eklendi.

2. Örneklerin ekilmesi ve inkübasyon

F01'den itibaren serum ve doku süpernatantlarından 40'ar µL ekildi. Daha sonra 10'ar µL chemerin antikoru sadece örneklerin ekildiği her bir kuyucuğa eklendi. Bunların üzerine de 50'şer µL SA-HRP eklendi. Hazırlanan plate daha sonra 1 saat 37 °C'de 300 rpm hızda sallanan shakerda inkübasyona bırakıldı.

3. Yıkama işleminin gerçekleştirilmesi

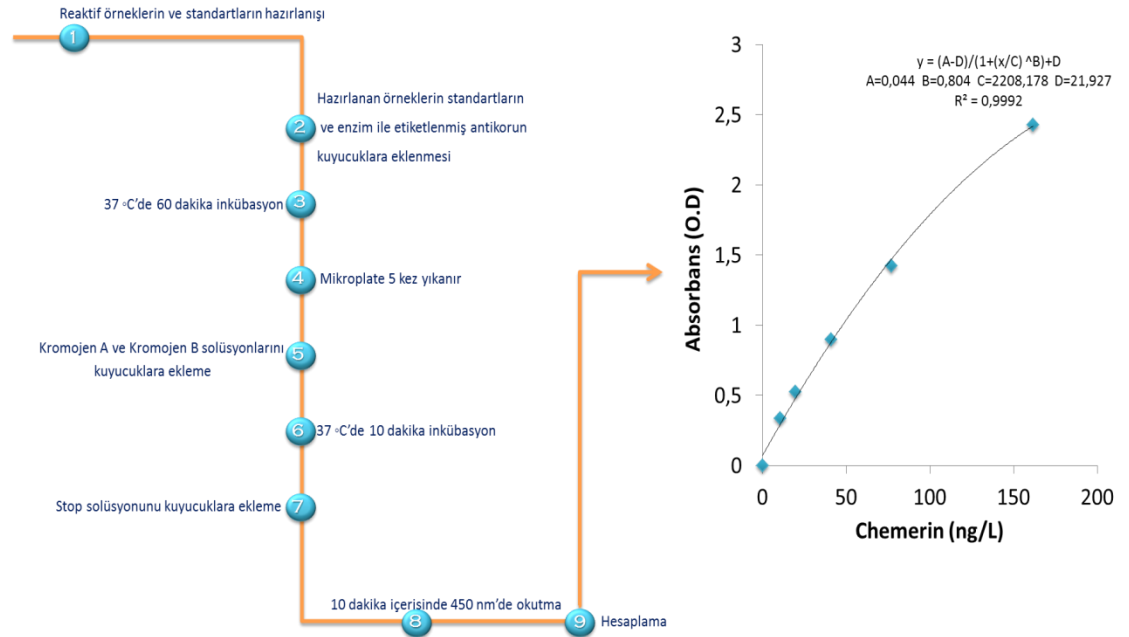
Anabilimdalımızda bulunan Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) marka otomatik ELISA plate yıkama cihazı sayesinde yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Hazırlanan yıkama solüsyonu cihaza uyarlandı. Her bir kuyucuk 350 µL ile 5 kez yıkandı. Plate içeriğinde sıvı kalmasını önlemek için kurutma kağıdına hafifçe kuyucuklar aşağı bakacak şekilde vuruldu.

4. Renk oluşumu aşaması

Her bir kuyucuğa önce 50 µL kromojen A ve hemen akabinde 50 µL kromojen B solüsyonları eklendi. 10 dakika 37 °C'de 300 rpm hızda karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki renk maviye döndü.

5. Stop solüsyonun eklenmesi

50'şer µL her bir kuyucuğa stop solüsyonu eklenerek mavi olan renk sarıya dönmeye başladı. Çalışmanın bütün aşamaları şekil.11'de özetlenmiştir.

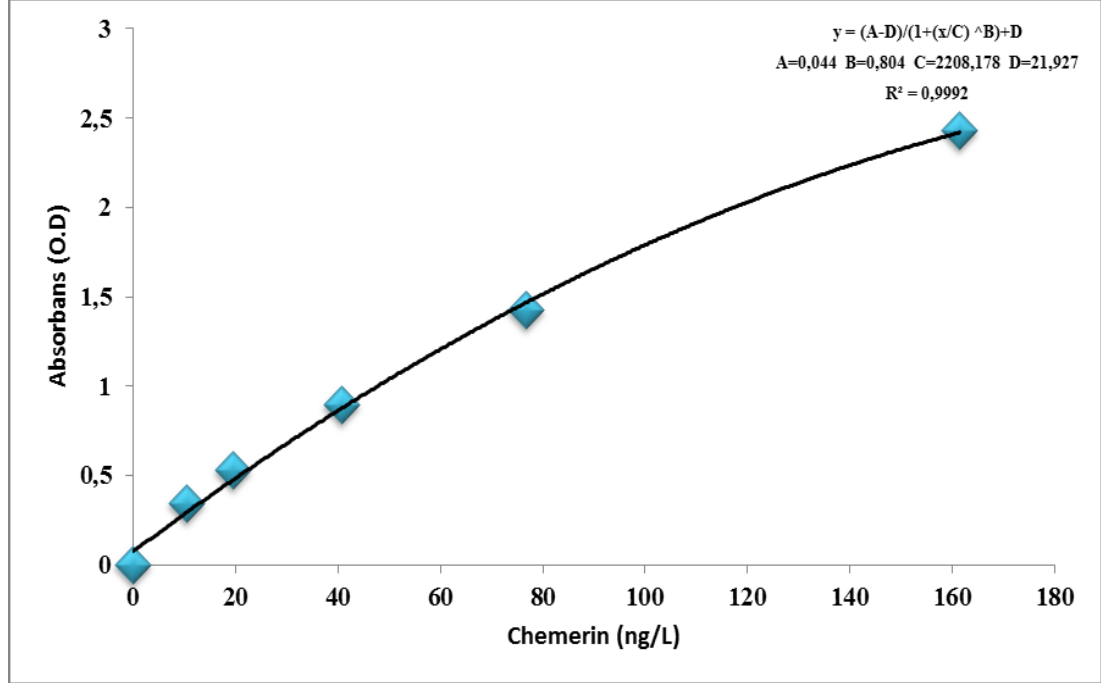


Şekil 11. Chemerin ELISA basamaklarının şematik görünümü

2.5.1.3. Okuma Aşaması

Stop solüsyonu eklendikten hemen sonra 10 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda anabilimdalımızda bulunan Bio-tek ELX800 (BioTek Instruments, USA) marka ELISA plate okuyucusunda okutuldu. Elde edilen standart eğri grafiği

şekil.12'deki gibidir. Serum örnekleri ng/L şeklinde verilirken doku süpernatantları homojenizasyon aşamasında 1/10 dilüsyon yapıldığı için 10 ile çarpılıp ng/100mg doku şeklinde sunuldu.



Şekil 12. Chemerin ELISA çalışması için standart eğri grafiği

2.5.2. Desnutrin/ATGL Elisa Çalışması

Doku homojenizatlarından elde edilen süpernatantlar ve serum örnekleri -80 °C'den alındı. Örnekler çözüldükten hemen sonra katalog numarası CK-E91097 ve lot numarası 20131205 olan Eastbipharm marka rat Desnutrin/ATGL Elisa kiti üretici firmanın verdiği klavuz doğrultusunda çalışıldı.

Desnutrin/ATGL kiti 2-8 °C'den alındıktan sonra kitin ortama adaptasyonu için 30 dakika kadar oda sıcaklığında bekletildi. Kit içeriğindeki tablo.7'de verildi. Çalışmada kullanılan kitin intra assay CV değeri <10%, inter assay CV değeri <12%, ölçüm aralığı 0,5 ng/mL-200 ng/mL ve sensitivitesi 0,23 ng/L idi. Çalışma temelde üç aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada reaktifler hazırlandı, ikinci aşamada ise hazırlanan reaktifler ve örneklerin belirli sıra ve düzen içerisinde kuyuculara ekildi. Son aşama olarak okuma işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 7. Desnutrin/ATGL ELISA kit içeriğinde bulunan malzemeler

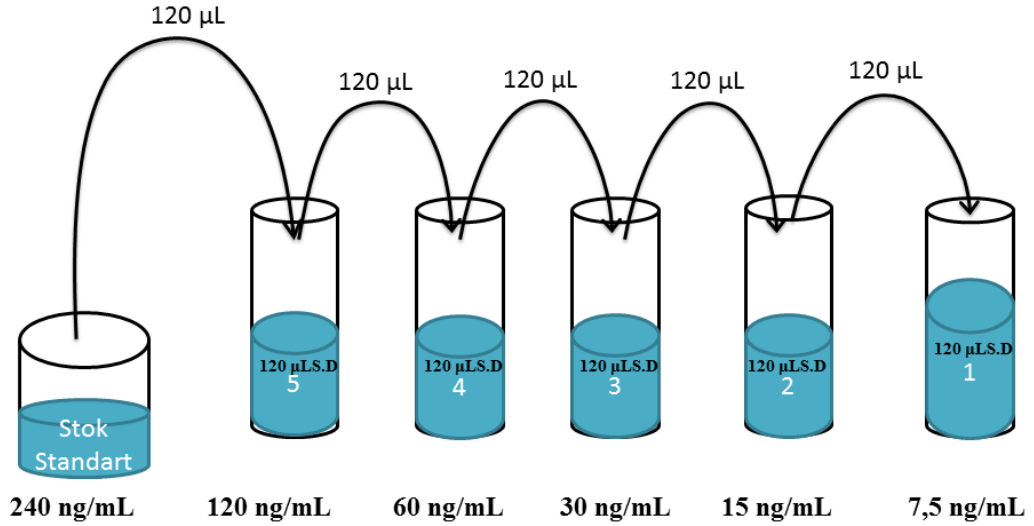
| Sıra | Desnutrin/ATGL ELISA Kiti | Miktar |
|------|---|------------|
| 1 | Standart solüsyonu (240 ng/mL) | 0,5 mL |
| 2 | Standart dilüenti | 3 mL |
| 3 | Antikor kaplı ELISA mikroplate | 96 Kuyucuk |
| 4 | Streptovidin HRP | 6 mL |
| 5 | Yıkama solüsyonu (30x) | 20 mL |
| 6 | Biotin ile işaretlemiş Anti ATGL antikor | 1 mL |
| 7 | Kromojen A solüsyonu | 6 mL |
| 8 | Kromojen B solüsyonu | 6 mL |
| 9 | Stop solüsyonu | 6 mL |
| 10 | Çalışma prosedürünü içeren klavuz | 1 adet |
| 11 | Plate'in üzerini inkübasyonda kapatmak için jelatin | 2 adet |

2.5.2.1. Reaktiflerin Hazırlanışı

i) Standartların hazırlanışı

Çalışmaya standartlar hazırlanarak başlandı. Bunun için bir spora beş adet eppendorf konuldu ve 1'den 5'e kadar numaralandırıldı. Her bir eppendorfa 120'şer µL standart dilüentten konuldu. Daha sonra sıvı olarak hazır halde gelen içerisinde 240 ng/mL ATGL/desnutrin içeren standart çözeltisinden 120 µL alınıp 5 numaralı eppendorfa eklendi. Eppendorfun kapağı kapatılıp çalkalama işlemi için vorteks'e konulup 10 saniye kadar çalkalandı. Böylece stok standart çözeltisinin konsantrasyonu yarıya düşürülmüş oldu. 5 numaralı standart çözeltinin konsantrasyonu 120 ng/mL oldu. Daha sonra bu 5 numaralı standart çözeltiden yeni bir pipet ucu takılmış otomatik pipet ile alınıp 4 numaralı eppendorfa 120 µL aktarıldı. Yine eppendorfun kapağı kapatılıp vortekste çalkalama işlemi gerçekleştirildi. Böylece 60 ng/mL'lik yeni bir standart çözeltimiz olmuş oldu. Bu işlem 1 numaralı tüpe gelene kadar ardışık şekilde gerçekleştirildi. Her seferinde kontaminasyonu önlemek için yeni bir pipet ucu kullanıldı ve her seferinde homejen bir dağılım elde etmek için çalkalama işlemi vorteks ile gerçekleştirildi. Elimizde artık sırasıyla 120 ng/mL, 60 ng/mL, 30 ng/mL, 15 ng/mL, 7,5 ng/mL'lik beş adet standart çözelti oldu. Şekil 13'te standartların hazırlanışı şematize edilmiştir.

| | | |
|-----------|---------------|---|
| 120ng/mL | Standart No:5 | 120µL stok standart +120µL standart dilüent |
| 60 ng/mL | Standart No:4 | 120µL Standart No:5+ 120µL standart dilüent |
| 30 ng/mL | Standart No:3 | 120µL Standart No:4+ 120µL standart dilüent |
| 15 ng/mL | Standart No:2 | 120µL Standart No:3+ 120µL standart dilüent |
| 7,5 ng/mL | Standart No:1 | 120µL Standart No:2+ 120µL standart dilüent |



Şekil 13. Desnutrin/ATGL ELISA çalışması için standartların hazırlanışı

ii) Yıkama solüsyonunun hazırlanışı

30x haldeki yıkama solüsyonu 1x hale getirmek için önce bir erlenmayere 580 mL distile su konuldu. Daha sonra 20 mL olarak kit içeriğinde sunulan yıkama solüsyonunu erlenmayere boşaltıp çalışmamızda kullanılmak üzere 1x yıkama solüsyonu elde etmiş olduk.

2.5.2.2. Analiz Aşaması

1. Blank ve standartların belirlenen kuyucuklara ekilmesi

A01 blank kuyucuğu olarak boş bırakıldı. Buraya çalışma esnasında sırası gelince kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonları eklendi. Bunun dışında hiçbir şey eklenmedi. B01'den G01'e kadar standartlar en küçük konsantrasyonu içeren 1 numaralı standarttan başlamak üzere 5 numaralı standarta kadar sırasıyla 50'şer µL eklendi. Daha sonra bu standart kuyucuklarına 50'şer µL SA-HRP eklendi.

2. Örneklerin ekilmesi ve inkübasyon

H01'den itibaren her bir kuyucuğan 40'ar μL olacak şekilde örneklerden sırasıyla eklendi. Sonra bunların üzerine yine sadece örneklerin ekildiği kuyucuklara 10'ar μL desnutrin/ ATGL antikoru ve 50'şer μL SA-HRP eklendi. Elisa plate'nin üzeri şeffaf jelatinden oluşan bir membran ile kapatılıp $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 60 dakika 300 rpm'de sallayacak bir inkübatöre yerleştirildi.

3. Yıkama işleminin gerçekleştirilmesi

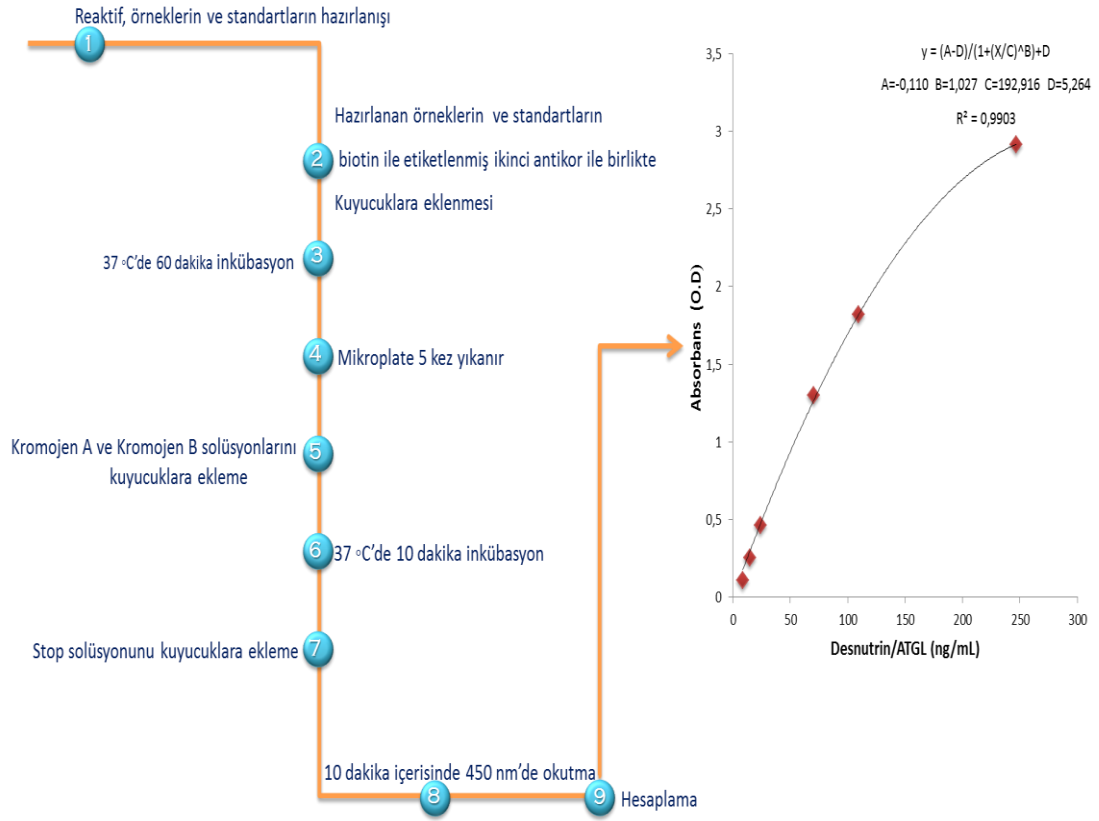
Yukarıda hazırlanan yıkama solüsyonu otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanılan cihaza uyarlandı. 5 kez her bir kuyucuğun 350 μL yıkama solüsyonu ile yıkanması gerçekleştirildi. Daha sonra plate kurutma kağıdına ters çevrilerek hafifçe vuruldu. Böylece kuyucuklarda herhangi bir sıvı artığının kalması önlenmiş oldu.

4. Renk oluşumu aşaması

İlk olarak 50 μL kromojen A solüsyonundan her bir kuyucuğa eklendi ve ardından mümkün olan en kısa zamanda 50 μL kromojen B solüsyonundan her bir kuyucuğa eklendi. 10 dakika $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 300 rpm'de sallanacak şekilde inkübatöre yerleştirildi. Kromojen B gün ışığından etkilendiği için bu aşamadaki inkübasyon karanlık alanda gerçekleştirildi. Inkübasyon süresi bittiğinde plate'in renginin maviye döndüğü gözlemlendi.

5. Stop solüsyonun eklenmesi

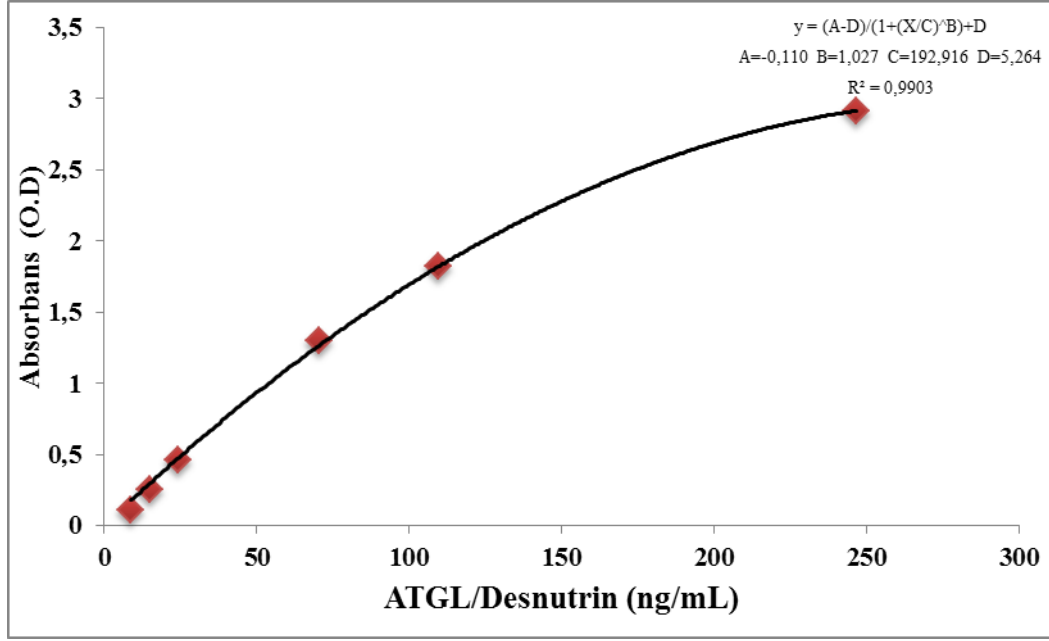
50'şer μL stop solüsyonundan her bir kuyucuğa eklendi. Stop solüsyonu eklenir eklenmez mavi olan renk hemen sarıya döndüğü gözlemlendi. Çalışmanın bütün aşamalarının özeti şekil.14'de verilmiştir.



Şekil 14. Desnutrin/ATGL ELISA basamaklarının şematik görünümü

2.5.2.3. Okuma Aşaması

Stop solüsyonu eklendikten hemen sonra yaklaşık 10 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi. Bunun için ELX800 ELISA okuyucusu kullanıldı. Hazırlanan standartların konsantrasyonları ELISA okuyucuya girilip standart eğri grafiği çizdirildi (şekil.15). Değerlendirme bu standart eğri grafiğine göre yapıldı. Serum örneklerinin sonuçları direk kullanılırken, doku örnekleri homojenizasyon aşamasındaki dilüsyondan dolayı 10 ile çarpılıp ng/ 100mg doku şeklinde verildi.



Şekil 15. Desnutrin/ATGL ELISA çalışması için standart eğri grafiği

2.5.3. Rat İnsülin ELISA Çalışması

Tablo 8. İnsülin ELISA kit içeriğinde bulunan malzemelerin listesi

| Sıra | Malzemeler | Miktarlar |
|------|---|------------|
| 1 | Standart (48µIU/mL) | 0,5 mL |
| 2 | Standart Dilüent | 3 mL |
| 3 | Mikroelisa Plate | 96 kuyucuk |
| 4 | SA-HRP konjugat reaktifi | 6 mL |
| 5 | 30x yıkma solüsyonu | 29 mL |
| 6 | Biotin-İnsülin Ab | 1 mL |
| 7 | Kromojen solüsyonu A | 6 mL |
| 8 | Kromojen solüsyonu B | 6 mL |
| 9 | Stop Solüsyonu | 6 mL |
| 10 | Kullanım Klavuzu | 1 adet |
| 11 | Plate üzerini kapatıcı jelatin kağıtlar | 2 adet |

Rat insülin ELISA çalışması SunRed marka rat için uyumlu Elisa kiti kullanılarak yapıldı. Kitin katalog numarası 201-11-0708, intra-assay CV < % 10, inter-assay CV < % 12, ölçüm aralığı 0,2 µIU/mL-40 µIU/mL ve sensitivitesi 0,102 µIU/mL idi. Kit içeriğinde bulunan malzemelerin listesi tablo.8'de verilmektedir. Çalışma kit

prosedürüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Çalışma reaktiflerin hazırlanması, analiz aşaması ve okuma olmak üzere üç aşamada gerçekleştirildi.

2.5.3.1. Reaktiflerin Hazırlanışı

i) Standartların hazırlanışı

ELISA kiti ortam adaptasyonu için yarım saat oda ısısında bekletildikten sonra standartlar hazırlanmaya başlandı. Bunun için boş bir spora beş adet eppendorf tüp numaralandırılarak yerleştirildi. Bu ependrofların herbirine önce 120'şer μL standart dilüentten konuldu. Daha sonra konsantrasyonu 24 $\mu\text{IU/mL}$ olan stok standarttan 120 μL alınıp 5 numaralı eppendorfa konuldu. Vorteks ile çalkalandıktan sonra farklı bir pipet ucu kullanarak bu 5 numaralı eppendorftan 120 μL alındı 4 numaralı tüpe aktarıldı. Böylece seri dilüsyonlara yapılarak standart çözeltiler elde edildi (Şekil.16).

ii) Yıkama solüsyonunun hazırlanması

30 kat konsantre haldeki yıkama solüsyonu distile su ile dilüe edildi. Bunun için boş bir erlenmayere 580 mL distile su konuldu. Onun üzerine 20 mL yıkama solüsyonu eklendi.

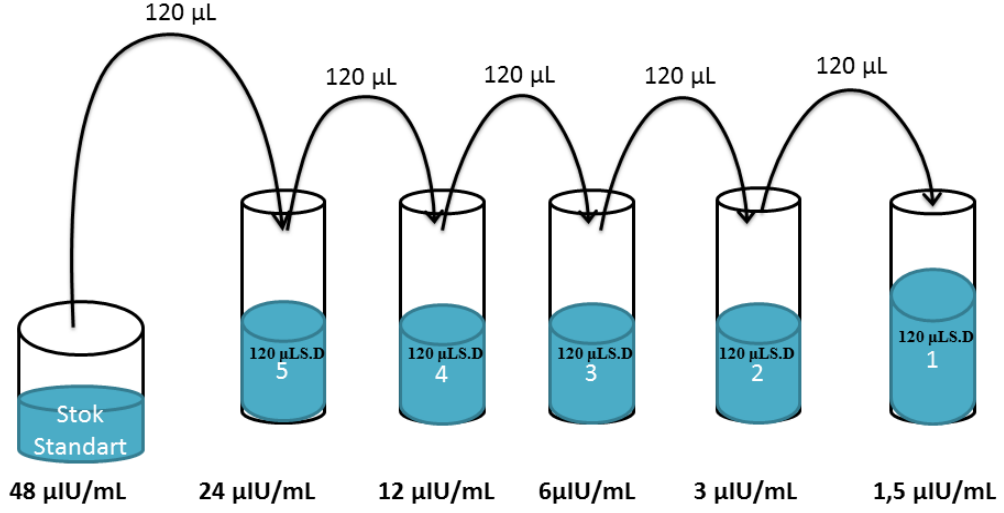
Bunun dışında verilen bütün reaktifler kullanıma hazır olarak sunulmuştu.

2.5.3.2. Analiz Aşaması

1. Blank kuyucuğu, standartların olduğu kuyucukların ve örneklerin ekileceği kuyucukların belirlenmesi

A01 kuyucuğu blank kuyucuğu olarak belirlendi ve çalışma sırasında sadece kromojen A, B ve stop solüsyonu sırası geldiği zaman eklendi. B01'de G01'e kadar standartlar en düşük konsantrasyondan başlamak üzere en yüksek konsantrasyona kadar 50'şer μL kuyucuklara eklendi. Daha sonra bu standart kuyucuklarının üzerine 50'şer μL SA-HRP eklendi. Örnekler H01'den başlamak üzere 40'ar μL olacak şekilde her bir kuyucuğa eklendi. Örnek kuyucuklarının üzerine 10 μL biotin ile konjuge edilmiş insülin antikoru ve 50'şer μL SA-HRP eklendi. Plate'in üzeri şeffaf yapışkan bir membran ile kapatıldıktan sonra 37 °C'de 60 dakika 300 rpm hızda sallanan shakerda inkübasyona bırakıldı.

| | | |
|----------------------|---------------|---|
| 24 $\mu\text{U/mL}$ | Standart No:5 | 120 μL stok standart +120 μL standart dilüent |
| 12 $\mu\text{U/mL}$ | Standart No:4 | 120 μL Standart No:5+ 120 μL standart dilüent |
| 6 $\mu\text{U/mL}$ | Standart No:3 | 120 μL Standart No:4+ 120 μL standart dilüent |
| 3 $\mu\text{U/mL}$ | Standart No:2 | 120 μL Standart No:3+ 120 μL standart dilüent |
| 1,5 $\mu\text{U/mL}$ | Standart No:1 | 120 μL Standart No:2+ 120 μL standart dilüent |

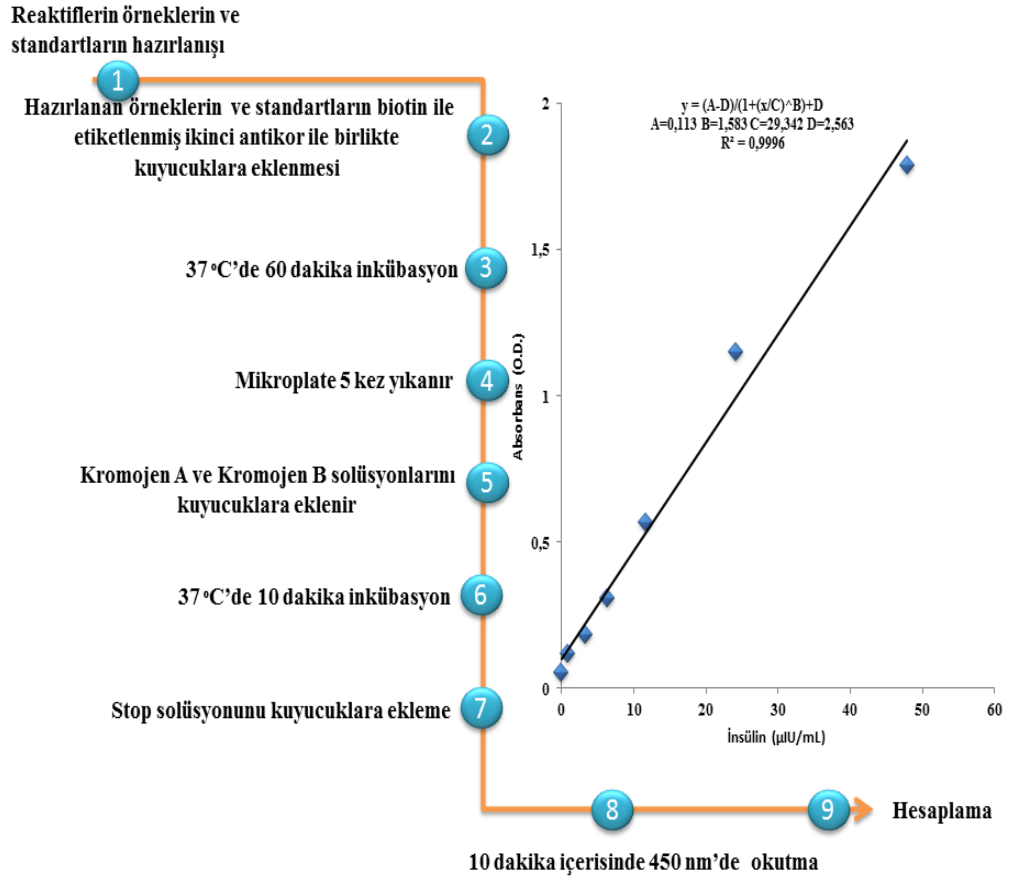


Şekil 16. İnsülin ELISA çalışması için standartların hazırlanışı

2. İnkübasyonun ardından yukarıda hazırlanan yıkama solüsyonu ile ELISA yıkayıcısında 5 kez 350 μL ile yıkandı.

3. Yıkamanın ardından her bir kuyucuğa önce 50 μL kromojen A daha sonra 50 μL kromojen B ilave edildi. 10 dakika 37 °C’de karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

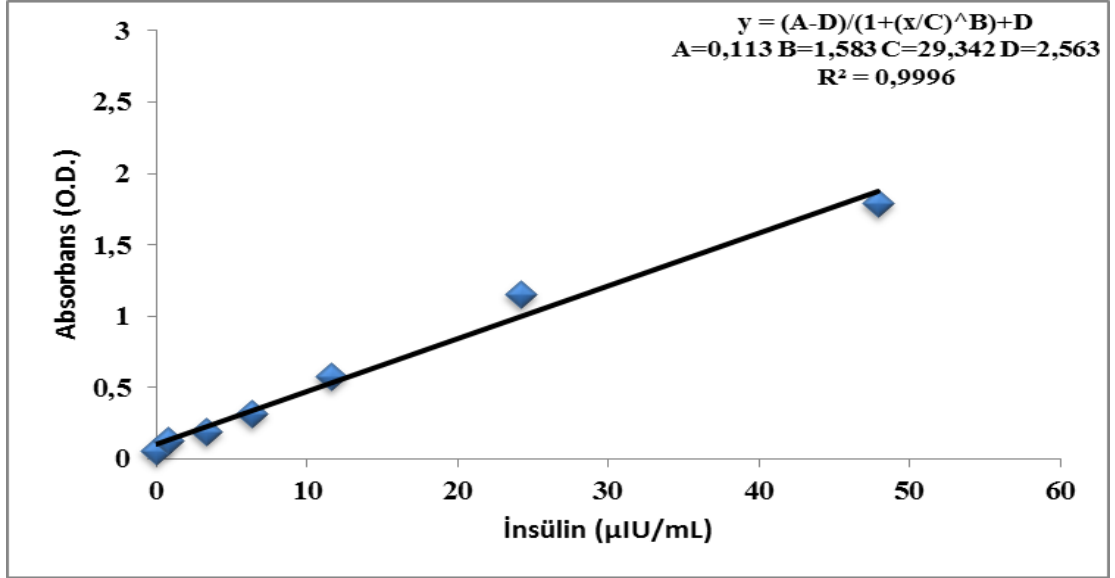
4. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 50 μL stop solüsyonu eklendi. Çalışmanın bütün aşamalarının özeti şekil.17’de verilmektedir.



Şekil 17. İnsülin ELISA basamaklarının şematik görünümü

2.5.3.3. Okuma Aşaması

Stop solüsyonu eklendikten hemen sonra ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okuma işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen standart eğri grafiğine göre örneklerin sonuçları değerlendirildi. Standart eğri grafiği şekil.18'de gösterilmektedir.



Şekil 18. İnsülin ELISA çalışması için standart eğri grafiği

2.6. Western Blot Çalışma Protokolü

Western blot işlemi bilimsel çalışmalarda proteinleri ayırmak ve tanımlamak için sıklıkla kullanılan bir metottür. Bu teknikte bir protein karışımını içeren örnekler jel elektroforezi yardımıyla proteinlerin moleküler ağırlıklarına bağlı olarak ayrılma işlemi gerçekleştirilir. Ardından jeldeki proteinler bir destek membranına transfer edilmektedir. Transfer sonrası uygulanacak antikorun nonspesifik olarak bağlanmasını önlemek için genellikle yağsız süt tozu içeren solüsyonlar ile bloklama işlemi gerçekleştirilir. Çalışılan maddeye özgü spesifik antikor aracılığıyla membran inkübasyona bırakılır. Bağlı olmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama aşamalarından sonra çeşitli tespit yöntemleriyle (kromojenik, kemilüminesan) bantlar görünür hale getirilir. Çalışma süresinde ihtiyaç duyulan malzemelerin listesi tablo 9'da verildi.

Çalışmamızda western blot yöntemi ile sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. Örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesi
2. Jele yüklenecek protein karışımının hazırlanması
3. Dikey jel elektroforezinin gerçekleştirilmesi
4. Jeldeki proteinlerin nitrosellüloz membrana transferi
5. Kromojenik immüneteksiyon kiti ile bantların görüntülenmesi

Tablo 9. Western Blot çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi

| Malzeme Listesi | |
|-----------------|---|
| 1 | Bullet Blender homogenizer (Next Advance, Inc, USA) |
| 2 | RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) |
| 3 | 0.5 mm zirconium oxide beads (Next Advance, Inc, USA) |
| 4 | Mikrosantrifüj (Eppendorf, Hamburg, Germany) |
| 5 | Qubit Fluorometre (İnvitrogen, USA) |
| 6 | Qubit Protein Assay Kit (İnvitrogen, USA) |
| 7 | Qubit Assay Tubes 500 µL (İnvitrogen, USA) |
| 8 | Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA) |
| 9 | Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad Laboratories, USA) |
| 10 | XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) |
| 11 | NuPAGE MES SDS Buffer Kit (Bis-Tris Jel için) (İnvitrogen, USA) |
| 12 | NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Jel 15 kuyucuklu (İnvitrogen, USA) |
| 13 | SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (İnvitrogen, USA) |
| 14 | iBlot Transfer Stack, nitrocellulose, regular-size (İnvitrogen, USA) |
| 15 | iBlot Dry Blotting System (İnvitrogen, USA) |
| 16 | WesternBreeze Chromogenic Kit–Anti-Rabbit (İnvitrogen, USA) |
| 17 | Anti-Chemerin primer antikor (Abcam, USA) |
| 18 | Anti-adipose trigliserit lipaz (PNPLA2) primer antikor (Millipore, USA) |

2.6.1. Qubit Fluorometre ile Protein Miktarlarının Tayini

Hazırlanan doku homejenizatlarından elde edilen süpernatantlarda ve plazma örneklerinde protein ölçümleri Qubit protein ölçüm kiti kullanılarak Qubit Fluorometer cihazında (İnvitrogen, USA) tespit edildi (136).

Ölçüm prosedürü

1. Ölçümde kullanılacak olan Qubit protein reagent (quant-it reagent) 200 kat konsantre olduğu için öncelikle qaunt-it reagent Qubit protein buffer (quant-it buffer) ile 1/200 oranında dilüe edildi. Örnekler ve üç tane standart için toplam 45 tane eppendorf numaralandırıldı. 45 tane örnekler ve standartlar için 5 tane de hata payı hesaba katılarak $50 \times 199 = 9950$ µL

Qubit protein buffer 15 mL'lik plastik santrifüj tüpüne yerleştirildi. Bunun üzerine standartlar, örnekler ve hata payı başına 1 µL olacak şekilde qubit protein reagent eklendi ve 1/200 oranında dilüe edilmiş olan çalışma solüsyonu elde edilmiş oldu.

2. Kit içerisinde üç ayrı protein standart çözeltisi mevcuttu. 0,5 mL'lik üç ayrı eppendorf standart 1, standart 2 ve standart 3 olacak şekilde numaralandırıldı. Bu eppendorfların her birine yukarıda hazırlanan çalışma solüsyonundan 190 µL konuldu. Daha sonra sırasıyla protein standart 1, protein standart 2 ve protein standart 3 çözeltilerinden 10'ar µL alınıp standart 1, 2 ve 3 olarak numaralandırılmış eppendorfların içerisine konulup 2-3 saniye vorteks ile çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
3. Örneklerin konulacağı eppendorflar 1'den 42'ye kadar numaralandırıldı. Bunların her birine 199 µL çalışma solüsyonundan ve 1 µL'de örneklerden eklenip 2-3 saniye vorteks ile çalkalandıktan sonra 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Qubit Fluorometer cihazı açıldıktan sonra protein ölçüm modu seçildi. Inkübasyon süresi tamamlanan standartlar sırasıyla standart 1, 2 ve 3 olacak şekilde cihazda okutulup kalibrasyon yapıldı.

Tablo 10. Kontrol ve MetS gruplarına ait karaciğer ve yağ dokusu örneklerindeki protein miktarları

| Örnek numarası | Karaciğer dokusu (mg/mL) | Yağ dokusu (mg/mL) |
|----------------|--------------------------|--------------------|
| Kontrol 1 | 3,2 | 3,49 |
| Kontrol 2 | 2,66 | 3,78 |
| Kontrol 3 | 3,31 | 4,23 |
| Kontrol 4 | 3,51 | 4,43 |
| Kontrol 5 | 2,47 | 1,82 |
| Kontrol 6 | 3,23 | 3,91 |
| Kontrol 7 | 3,18 | 3,98 |
| MetS 8 | 2,42 | 4,26 |
| MetS 9 | 3,39 | 2,94 |
| MetS 10 | 2,53 | 3,52 |
| MetS 11 | 3,52 | 1,56 |
| MetS 12 | 3,83 | 3,32 |
| MetS 13 | 3,46 | 3,59 |
| MetS 14 | 3,47 | 4,05 |

5. Kalibrasyonun ardından sırasıyla örnekler okutulup çıkan sonuçlar dilüsyon faktörüyle çarpılacak ekrana gelip çarpıldıktan sonra kayıt altına alındı (tablo.10).

Örneklerdeki protein miktarları ölçüm esnasında değerlendirilemediğinde yani cihazın ölçüm aralığının dışındaki bir konsantrasyonda örnekler 1/10 distile su ile dilüe edilip tekrardan çalışma solüsyonu ile aynı işlemlere tabi tutulup ölçüm gerçekleştirildi. Çıkan sonuçlar 10 ile çarpılıp tabloda yerlerine yazıldı.

2.6.2. Jele Yüklenen Protein Örneklerinin Hazırlanması

Çalışma gruplarındaki protein miktarları kayıt altına alındıktan sonra jele yüklenen örnek miktarları belirlendi. Çalışmada 15 kuyucuklu %4-12 Bis-Tris gradyen jeller kullanıldı. Her bir kuyucuğa 20 µL'lik karışım yüklendi. Bu karışımın içine örnek, NuPAGE Sample Reducing Agent (10X), NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) ve distile su eklendi. Western blot aşamasında kullanılan kitteki tespit yöntemi kromojenik olduğu için minimum jele yüklenmesi gereken protein miktarı 30 µg olmalıdır. Bu şöyle hesaplandı. Qubit flourometer cihazında elde edilen sonucun birini örnek olarak kullanalım. Örneğin 1 numaralı kontrol grubu ratın karaciğer dokusu süpernatantındaki protein miktarını 3,2 mg/mL olarak tespit edildi. Aslında burada bir denklem kuruyoruz. 1ml'sinde 3,2 mg protein varsa 30 µg protein ne kadar volümde bulunur. Buradan $30/3,2=9,375$ µL elde ederiz. Bunu da 9,4 µL olarak kabul ettik. LDS sample buffer ve sample reducing agent'ların volümleri sabit ve toplamda 7 µL'dir. Geriye kalan 13 µL'yi distile su ve örnek oluşturmaktadır. Örneğimizde 9,4 µL 1 numaralı örnekten alıp geriye kalan 3,6 µL'yi de distile su ile tamamladık. Bu işlem çalışmada kullanılan diğer örnekler için de yapıldı (tablo 11,12). Hazırlanan bu karışımlar 200 µL'lik eppendorf tüplerine konuldu. 10 dakika 70 °C'de denatüre edildikten sonra -20 °C'de 3-5 dakika bekletildi.

Tablo 11. Kontrol ve MetS grubu ratların karaciğer dokuları için jele yüklenecek karışım miktarları

| Örnekler | Protein miktarları (mg/mL) | Jele yüklenecek örnek miktarları (µL) | LDS Sample Buffer (4X) (µL) | Sample Reducing Agent (10X) (µL) | Distile su (µL) |
|--------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|
| 1 Kontrol KC | 3,2 | 9,4 | 5 | 2 | 3,6 |
| 2 Kontrol KC | 2,66 | 11 | 5 | 2 | 2 |
| 3 Kontrol KC | 3,31 | 9 | 5 | 2 | 4 |
| 4 Kontrol KC | 3,51 | 8,5 | 5 | 2 | 4,5 |
| 5 Kontrol KC | 2,47 | 12 | 5 | 2 | 1 |
| 6 Kontrol KC | 3,23 | 9,3 | 5 | 2 | 3,7 |
| 7 Kontrol KC | 3,18 | 9,4 | 5 | 2 | 3,6 |
| 8 MetS KC | 2,42 | 12,4 | 5 | 2 | 0,6 |
| 9 MetS KC | 3,39 | 8,8 | 5 | 2 | 4,2 |
| 10 MetS KC | 2,53 | 11,8 | 5 | 2 | 1,2 |
| 11 MetS KC | 3,52 | 8,5 | 5 | 2 | 4,5 |
| 12 MetS KC | 3,83 | 7,8 | 5 | 2 | 5,2 |
| 13 MetS KC | 3,46 | 8,6 | 5 | 2 | 4,4 |
| 14 MetS KC | 3,47 | 8,6 | 5 | 2 | 4,4 |

Tablo 12. Kontrol ve MetS grubu ratların yağ dokusu için jele yüklenecek karışım miktarları

| Örnekler | Protein miktarları (mg/mL) | Jele yüklenecek örnek miktarları (µL) | LDS Sample Buffer (4X) (µL) | Sample Reducing Agent (10X) (µL) | Distile su (µL) |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|
| 1 Kontrol Yağ Doku | 3,49 | 8,6 | 5 | 2 | 4,4 |
| 2 Kontrol Yağ Doku | 3,78 | 7,9 | 5 | 2 | 5,1 |
| 3 Kontrol Yağ Doku | 4,23 | 7 | 5 | 2 | 6 |
| 4 Kontrol Yağ Doku | 4,43 | 6,8 | 5 | 2 | 6,2 |
| 5 Kontrol Yağ Doku | 1,82 | 13 | 5 | 2 | 0 |
| 6 Kontrol Yağ Doku | 3,91 | 7,7 | 5 | 2 | 5,3 |
| 7 Kontrol Yağ Doku | 3,98 | 7,5 | 5 | 2 | 5,5 |
| 8 MetS Yağ Doku | 4,26 | 7 | 5 | 2 | 6 |
| 9 MetS Yağ Doku | 2,94 | 10,2 | 5 | 2 | 2,8 |
| 10 MetS Yağ Doku | 3,52 | 8,5 | 5 | 2 | 4,5 |
| 11 MetS Yağ Doku | 1,56 | 13 | 5 | 2 | 0 |
| 12 MetS Yağ Doku | 3,32 | 9 | 5 | 2 | 4 |
| 13 MetS Yağ Doku | 3,59 | 8,4 | 5 | 2 | 4,6 |
| 14 MetS Yağ Doku | 4,05 | 7,4 | 5 | 2 | 5,6 |

2.6.3. Dikey Jel Elektrophorez Sistemi Kullanımı

1. %4-12 Bis-Tris jeli poşetinden çıkarıp üzerindeki tampon çözelti hafifçe sallayarak döküldü.
2. Jel kaseti üzerinde yer alan en alt kısımdaki beyaz bant çıkarıldı. Sonrasında üst tarafında bulunan tarak kuyucukları zedelemeyecek şekilde çıkarılıp kuyucuklar içerisinde kalan sıvıyı boşaltmak için jel ters çevrilip kurutma kağıdına hafifçe silkelendi.
3. Jel kaseti dikey jel elektrophorez tankına yerleştirilip dikey jel tankına jel sıkıştırma aparatı takılarak jel kaseti sıkıştırıldı.
4. MES SDS Running Buffer (20X)'dan 25 mL alınıp bir mesura konuldu. Üzerine de 475 mL distile su konuldu. Böylece 1x MES SDS Running Buffer elde edildi.
5. Dikey tankın jelin olduğu orta bölümüne hazırlanan 1x running bufferdan döküldü. Dökülen bu buffer'ın kuyucukların üzerini 0,5 cm kadar geçmesi sağlandı. Tankın orta bölümündeki bu tampon çözeltinin sızıp sızmadığı kontrol edildikten sonra geriye kalan buffer tankın diğer bölümüne döküldü. Sadece jelin bulunduğu orta kısma olacak şekilde 500 µL antioksidan konuldu.
6. Örnekleri yükmeden önce 100 µL'lik bir pipet yardımıyla hazırlanan tampon çözelti aracılığıyla her bir kuyucuğa pipetaj yaparak temizleme işlemi gerçekleştirildi.
7. İlk olarak birinci kuyucuğa SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standardından 5 µL eklendi.
8. Kalan kuyucuklara da sırasıyla kontrol ve MetS grubu örneklerden 20 µL eklendi.
9. Dikey jel elektrophorezinin kapağı kutup başları dikkatlice yerine oturacak şekilde kapatıldı.
10. Güç kaynağı 200 V sabit akım olacak şekilde 35 dakikaya ayarlanıp elektrophorez başlatıldı.
11. Elektrophorezdeki yürütme işlemi sonrasında güç kaynağı kapatıldı. Dikey jel elektrophorez tankının kapağı kaldırıldı. Jel kasetini sıkıştırmak için kullanılan aparat yerinden çıkarılıp jel kaseti serbestleştirildi.

12. Jel kaseti jel bıçağı kullanılarak kenarlarından bağlantı noktaları kırılarak hafifçe ayrıldı. Burada jele zarar vermemeye özen gösterildi.
13. Jelin kuyucuk çıkıntıları ve en alt kısımdaki kalın jel birikintisinin olduğu yer jel bıçağı yardımıyla uzaklaştırıldı.
14. İçerisinde distile su bulunan temiz bir kap içerisinde jeli kasetten ayırma işlemi gerçekleştirildi.

2.6.4. iBlot Dry Blotting System ile Blotlama İşlemi

1. Cihazın fişi takılıp arka tarafında bulunan açma kapama düğmesi ile cihaz çalıştırılır.
2. iBlot Transfer Stack, nitrocellulose kitinden bir adet anod, bir adet katot, bir adet sünger ve bir adet de kurutma kağıdı alındı.
3. Anod'un üzerindeki jelatini açılıp plastik kabıyla birlikte en alta konuldu.
4. Distile su içerisinde yer alan jel kırmadan düzgün bir şekilde nitrosellüloz membran içeren anod tabakanın üstüne yerleştirildi.
5. Filtre kağıdı distile suda ıslatıldıktan sonra jelin üzerine konulup üzerinde hava kabarcığı kalmasın diye cihaz ile birlikte verilen rulo ile üzerinden geçildi.
6. Kit içersinde verilen katot yazan materyalin jelatini açıldıktan sonra bakır yüzey süngere bakacak şekilde ve jelli kısım da filtre kağıdının üzerine bakacak şekilde yerleştirilip hava kabarcıkları rulo yardımıyla alındı.
7. En son olarak sünger üzerindeki metal kısım cihazın kapak kısmında yer alan elektroda denk gelecek şekilde yerleştirilip kapak sıkıca kapatıldı.
8. Program düğmesinden P3 seçilip 8 dakikaya ayarlanıp cihaz üzerindeki start/stop düğmesine basılarak transfer işlemi gerçekleştirildi.
9. 8 dakikalık sürenin sonunda cihazın alarm sesi duyuldu, tekrar start/stop tuşuna basılarak cihaz durduruldu. Kapağı açıldıktan sonra sünger, katot tabakası, kurutma kağıdı ve jel ortamdan uzaklaştırıldı.
10. Anod tabakanın üzerinde yer alan nitrosellüloz membran steril bir bistüri yardımıyla oradan alındı.

2.6.5. Kromojenik Western Blot İmmünoedeksiyon Kit Prosedürü

1. Transfer işlemi gerçekleştirilen membrandan SDS kalıntılarını uzaklaştırmak için membran distile su içerisine alındı. Bloklama solüsyonu, antikor yıkama

solüsyonu ve antikor sulandırma solüsyonunun hazırlanışları tablo 13'de verildi.

Tablo 13. Western blot çalışması için solüsyonların hazırlanışı

| Solüsyon | Nitrosellüloz membran için | |
|---------------------------------|---|--------------|
| Bloklama solüsyonu | Ultra filtre edilmiş su | 14 ml |
| | Blocker/Diluent A | 4 ml |
| | <u>Blocker/Diluent B</u> | <u>2 ml</u> |
| | Total Volume | 20 ml |
| Primer Antikor dilüenti | 10 mL bloklama solüsyonunun içerisinde primer antikor 1/1000 oranında dilüe edildi. | |
| Antikor Yıkama solüsyonu | Ultra filtre edilmiş su | 150 ml |
| | <u>Antikor Yıkama solüsyonu (16X)</u> | <u>10 ml</u> |
| | Total Volume | 160 ml |

2. Kit ile birlikte verilen plastik kutucukların içerisine membran yerleştirildikten sonra yukarıda hazırlanan bloklama solüsyonundan 10 mL membranın üzerine döküldü. 30 dakika oda sıcaklığında saniyede 1 döngü yapan bir shakerda sallama işlemi gerçekleştirildi.
3. Membran üzerindeki bloklama solüsyonu döküldükten sonra üzerine 20 mL distile su ile konulup shakerda 5 dakika yıkandı. Bu işlem toplamda iki kez yapıldı.
4. Primer antikorlar (anti-chemerin, anti-desnutrin/ATGL) bloking solüsyonunun içerisinde 1/1000 oranında dilüe edildikten sonra bu primer antikor solüsyonü plastik kutunun içerisinde bulunan membranın üzerine dökülüp 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
5. Primer antikor solüsyonu döküldükten sonra 20 mL antikor yıkama solüsyonu ile 5 dakika boyunca shakerda yıkama işlemi gerçekleştirilip bu yıkama solüsyonu döküldü. Bu işlem toplamda dört kez yapıldı.
6. Membran shakerda 10 mL sekonder antikor ile yarım saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve sonra sekonder antikor döküldü.

7. 5 dakika 20 mL antikor yıkama solüsyonu ile shakerda yıkama işlemi gerçekleştirildi ve solüsyon döküldü. Bu işlem toplamda 4 kez yapıldı.
8. 2 dakika 20 mL distile su ile shakerda yıkama işlemi gerçekleştirildi ve her yıkamadan sonra distile su döküldü. Bu işlem toplamda 3 kez yapıldı.
9. 5 mL kromojenik substrat ile membran inkübasyona bırakıldı. 10-15 dakika içerisinde pembe renkli bantların geliştiği görülünce 20 mL distile su ile 2 dakika boyunca shakerda yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her seferinde membrandaki su dökülüp yenisi ile değiştirildi. Bu işlem de toplamda 3 kez yapıldı.
10. Daha sonra membran kurutma kağıdının üzerinde kurumaya bırakıldı.

2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma gruplarında elde edilen veriler SPSS 21 paket programı (SPSS Inc., Chicago,IL) kullanılarak değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda Mann Whitney-*U* testi kullanıldı. Her grubun kendi içerisindeki parametreler arası ilişkilerin incelenmesinde Spearman korelasyon testi uygulandı. İstatistiksel olarak en düşük anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ değeri belirlendi.

3. BULGULAR

Çalışmada, 8 haftalık yaklaşık 260-290 gram ağırlığında *Sprague-Dawley* cinsi 14 adet erkek rat kullanıldı. Deney 12 hafta sürdü. Deney boyunca ratlarda ölüm gözlenmedi.

Çalışma gruplarında rat ağırlıkları değerlendirildiğinde deney başlangıcında kontrol grubu (275,28±16,77 gr) ve MetS grubu (279,07±27,68 gr) ratların ortalama ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$). Deney sonunda ise her iki grubun ortalama ağırlıkları karşılaştırıldığında MetS grubunda (449±15,80 gr) kontrol grubuna (425,92±14,49 gr) göre daha fazla miktarda ağırlık artışı olduğu gözlemlendi. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Ratların deney başlangıç ve deney sonu ağırlık değişimleri tablo 14’de görülmektedir.

Tablo 14. Kontrol ve MetS gruplarına ait ağırlık değişimleri

| | Kontrol (n=7) | MetS (n=7) |
|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Deney başlangıcı ağırlık (gr) | 275,28±16,77 | 279,07±27,68 ^a |
| Deney sonu ağırlık (gr) | 425,92±14,49 | 449±15,80 ^b |

a: $p>0,05$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. b: $p<0,05$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

3.1. Biyokimyasal Parametreler

Bu parametreler üç temel başlık altında toplandı. Birincisi rutin biyokimyasal parametreler, ikincisi lipid profili ve üçüncüsü ise hormonal değişimlerdir (tablo 15).

3.1.1. Rutin Biyokimyasal Parametreler

Bu başlık altında açlık serum glukozu ve AST, ALT düzeyleri ele alındı. Çalışma gruplarında, glukoz değerleri açısından incelendiğinde kontrol grubuna (92,77±5,53 mg/dL) göre MetS grubunda (143,75±7,73 mg/dL) anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,01$), (Şekil.19, Tablo.15).

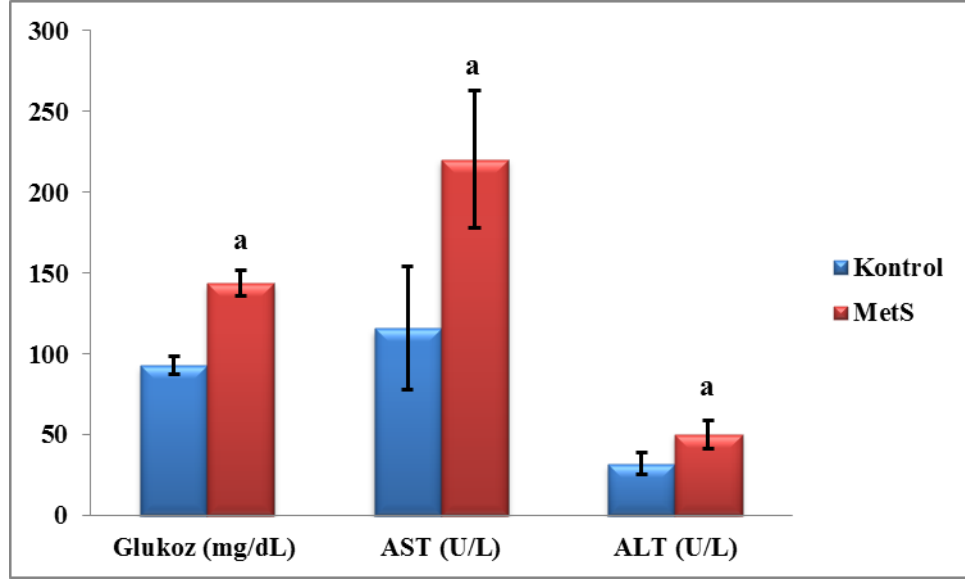
Tablo 15. Kontrol ve MetS gruplarına ait biyokimyasal ve hormonal değişimler

| Parametreler | Kontrol (n=7) | Metabolik sendrom (n=7) |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Glukoz (mg/dL) | 92,77±5,53 | 143,75±7,73 ^b |
| ALT (U/L) | 32,14±6,89 | 50,14±9,02 ^b |
| AST (U/L) | 115,85±38,28 | 220,42±42,56 ^b |
| Trigliserit (mg/dL) | 68,34±12,35 | 122,54±11,92 ^b |
| Total Kolesterol (mg/dL) | 76,23±6,39 | 93,45±11,20 ^b |
| HDL kolesterol (mg/dL) | 46,21±8,08 | 30,01±3,28 ^b |
| LDL kolesterol (mg/dL) | 16,35±4,39 | 38,93±11,28 ^b |
| VLDL (mg/dL) | 13,66±2,47 | 24,50±2,38 ^b |
| İnsülin (µIU/mL) | 10,52±1,18 | 12,25±1,12 ^a |
| HOMA-IR | 2,40±0,33 | 4,32±0,59 ^b |

a: $p<0,05$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. b: $p<0,01$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Serum AST düzeyleri; kontrol grubu ratlarda (115,85±38,28 U/L) MetS grubuna (220,42±42,56 U/L) göre düşük düzeyde tespit edildi. Kontrol grubu ratlardaki serum AST düzeylerindeki bu düşüklük MetS grubundaki ratların serum AST düzeyleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$).

Her iki grup serum ALT düzeyleri açısından incelendiğinde MetS grubu (32,14±6,89 U/L) ratlarda kontrol grubundaki (50,14±9,02 U/L) ratlara kıyasla ciddi bir artış olduğu gözlenmiş olup, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,01$), (Şekil.19, Tablo.15).



Şekil 19. Sprague-Dawley cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak rutin biyokimyasal parametrelerin değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması

a: $p < 0,01$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

3.1.2. Lipid Profili

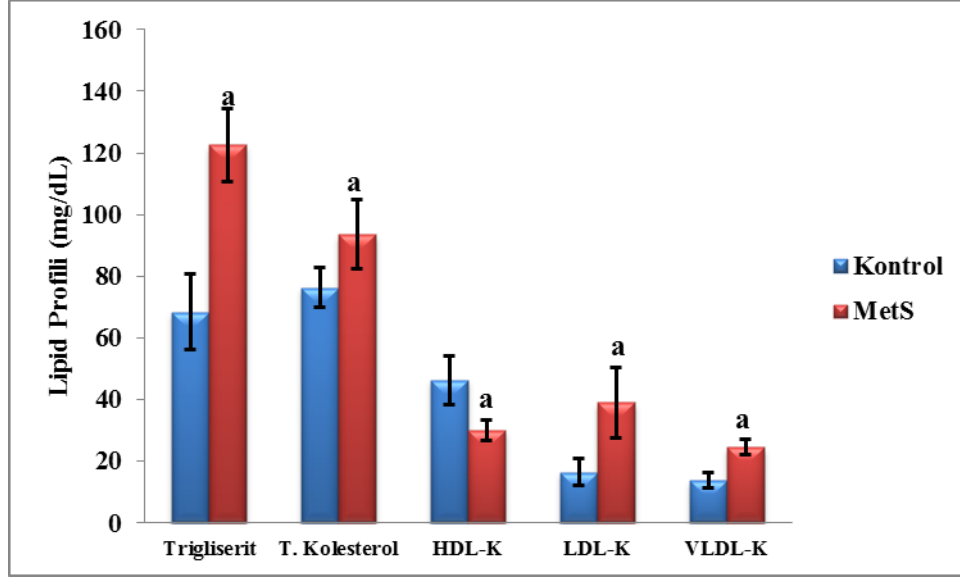
Çalışma sonunda tablo 15 ve şekil 20 'de görüldüğü gibi lipid profili parametrelerinden trigliserit, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol değişimleri incelendi.

Deney sonunda serum trigliserit miktarları MetS grubunda ($122,54 \pm 11,92$ mg/dL) kontrol grubuna ($68,34 \pm 12,35$ mg/dL) kıyaslandığında anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Serum total kolesterol düzeyleri incelendiğinde MetS grubunda ($93,45 \pm 11,20$ mg/dL) kontrol grubuna ($76,23 \pm 6,39$ mg/dL) göre yükseklik tespit edildi ve bu artış istatistiksel olarak da anlamlı düzeyde idi ($p < 0,01$).

Deney sonunda serum LDL-K düzeyleri MetS grubunda $38,93 \pm 11,28$ mg/dL düzeylerinde iken kontrol grubunda $16,35 \pm 4,39$ mg/dL olarak tespit edildi. Buradaki MetS grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,01$). Bir diğer lipid profili parametresi olan VLDL-K düzeyleri ele alındığında MetS grubunda ($24,50 \pm 2,38$ mg/dL) kontrol grubuna ($13,66 \pm 2,47$ mg/dL) göre bir artış olduğu gözlemlendi ve bu artış da istatistiksel olarak önemli düzeydeydi ($p < 0,01$). Lipid profili parametrelerinden son olarak ele alınan HDL-K düzeylerine bakıldığında kontrol

grubuna ($46,21 \pm 8,08$ mg/dL) göre MetS grubunda ($30,01 \pm 3,28$ mg/dL) ciddi miktarda azalma tespit edildi ve bu da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$).



Şekil 20. Sprague-Dawley cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak lipid profili değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması

a: $p < 0,01$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

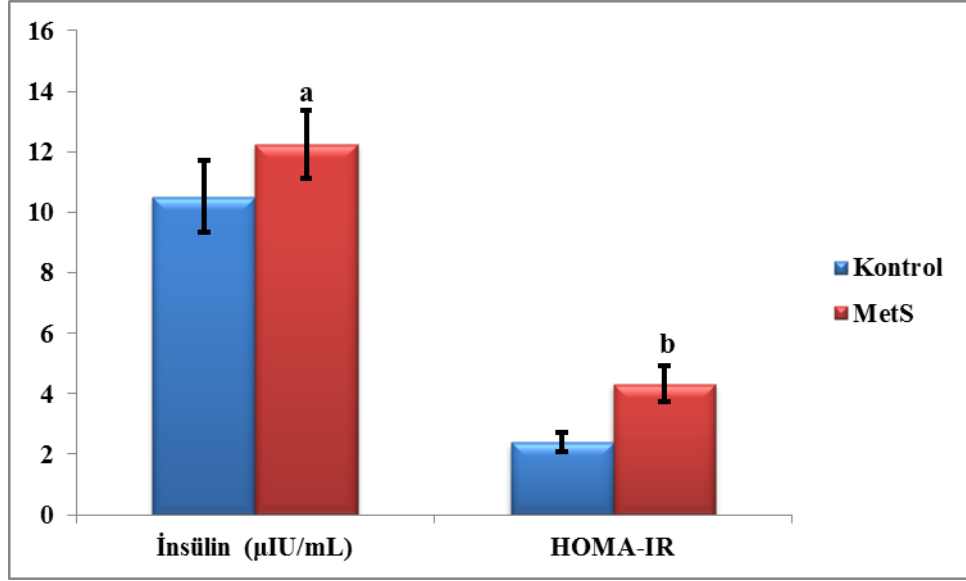
3.1.3. Hormonal Değişimler

Hormonal değişimlerin sonuçları da insülin, chemerin ve desnutrin düzeylerindeki değişimler olmak üzere üç alt başlık altında toplandı.

3.1.3.1. İnsülin Düzeylerindeki Değişimler

MetS patogenezinde önemli rolü olan plazma insülin düzeyleri açısından MetS grubu ($12,25 \pm 1,12$ μ IU/mL) ile kontrol grubu ($10,52 \pm 1,18$ μ IU/mL) kıyaslandığında MetS grubunda anlamlı düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

İnsülin direncinin göstergesi olan HOMA-IR düzeyleri bakımından kontrol grubu ($2,40 \pm 0,33$) ile MetS grubu ($4,32 \pm 0,59$) karşılaştırıldığında MetS grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). İnsülin ve HOMA-IR düzeyleri arasındaki değişimler şekil 21’de görülmektedir.



Şekil 21. *Sprague-Dawley* cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak insülin ve HOMA-IR düzeyleri değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması

a: $p < 0,05$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

b: $p < 0,01$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

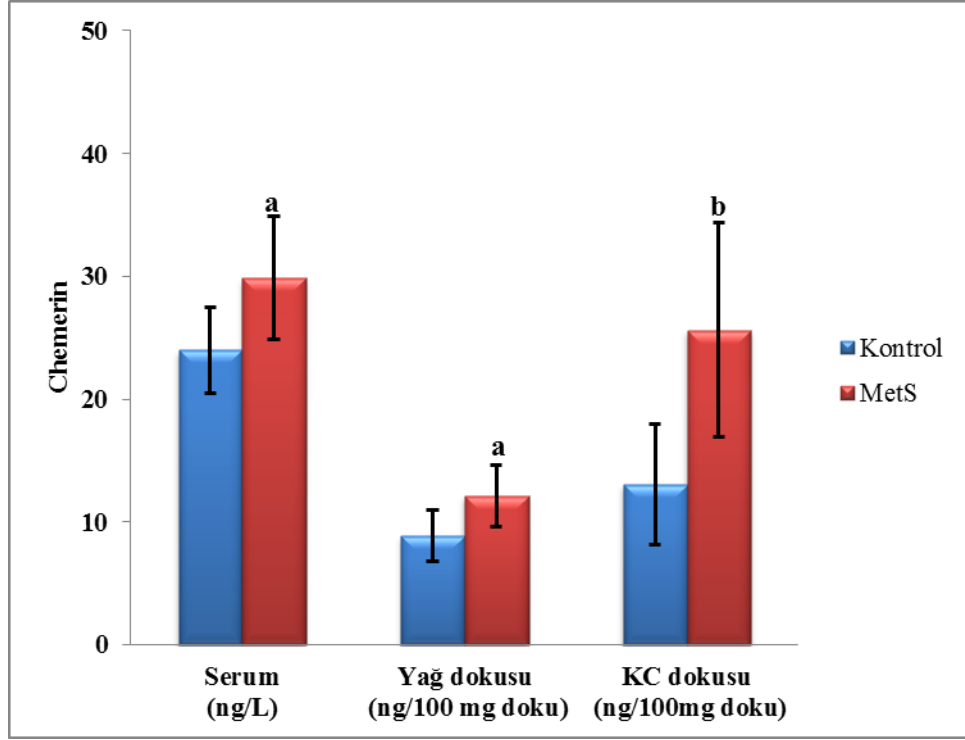
3.1.3.2. Chemerin Düzeylerindeki Değişimler

Çalışma gruplarında chemerin düzeyleri incelendiğinde hem serum hem de doku düzeylerinde artışlar tespit edildi (Şekil 22).

MetS grubundaki serum chemerin düzeylerinin ($29,88 \pm 5,04$ ng/L) kontrol grubuna ($24,01 \pm 3,50$ ng/L) göre anlamlı bir artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

Karaciğer dokusundaki chemerin düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna ($13,11 \pm 4,91$ ng/100 mg doku) kıyasla MetS grubunda ($25,63 \pm 8,72$ ng/100 mg doku) anlamlı derecede bir artış bulundu ($p < 0,01$).

Yağ dokusundaki chemerin düzeyleri ele alındığında ise MetS grubunda ($12,14 \pm 2,52$ ng/100 mg doku) kontrol grubuna ($8,88 \pm 2,05$ ng/100 mg doku) göre anlamlı derecede artış tespit edildi ($p < 0,05$).



Şekil 22. *Sprague-Dawley* cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak serum, yağ dokusu ve KC dokusu chemerin düzeyleri değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması

a: $p < 0,05$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

b: $p < 0,01$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

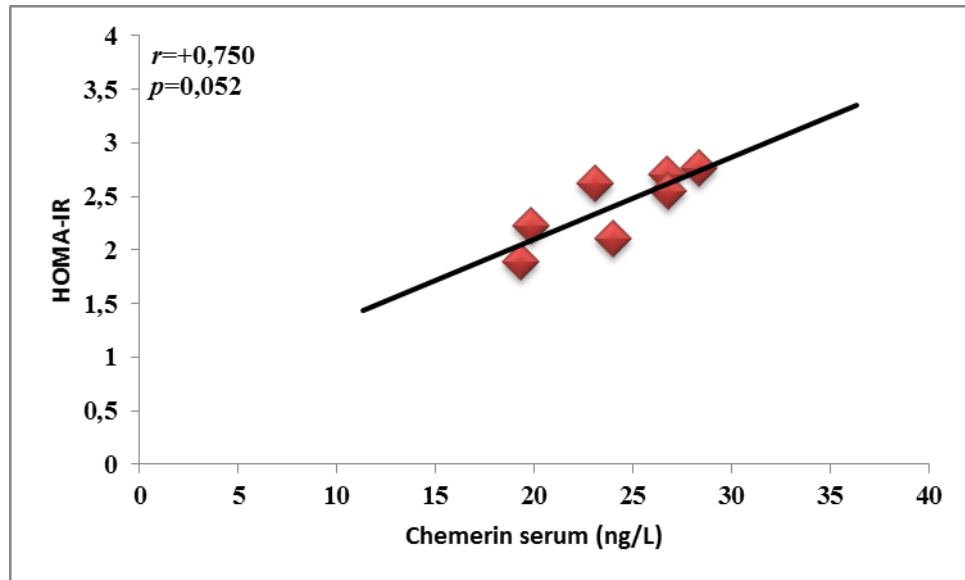
3.1.3.2.1 Kontrol Grubu Ratlarda Serum Chemerin Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri

Kontrol grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile rutin biyokimyasal parametreler, lipid profili, deney sonu ağırlıklar ve dokulardaki değişimler arasında ilişki analizleri irdelendiğinde tablo 16’teki veriler elde edildi.

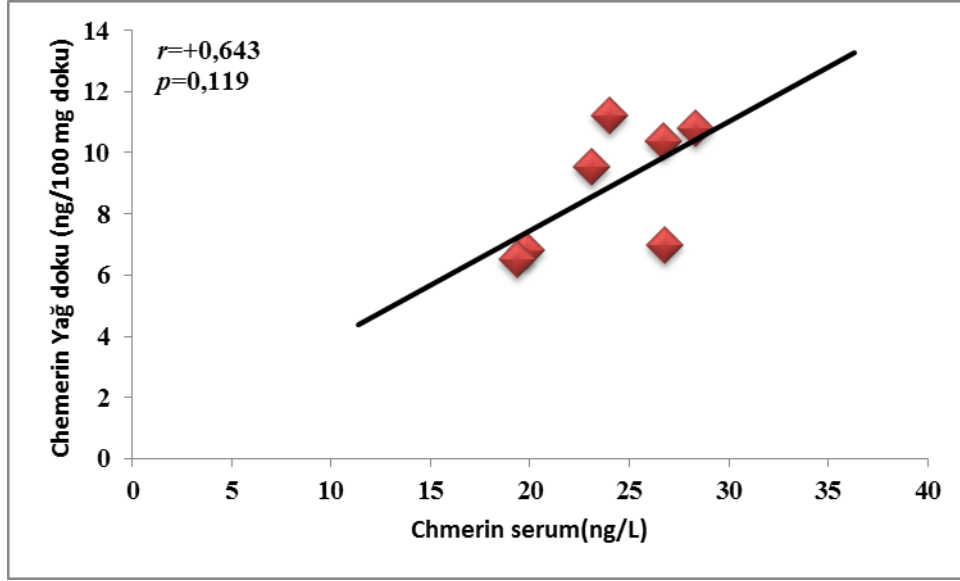
Kontrol grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki incelendiğinde serum chemerin düzeyleri ile HOMA-IR arasında pozitif bir ilişki vardı fakat, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,750$, $p>0,05$; Şekil 23).

Tablo 16. Kontrol grubu ratlardaki serum chemerin düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki analizleri (Sperman korelasyon testi)

| Parametreler | Chemerin Serum (ng/L) | |
|--------------------------------------|-----------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>p</i> |
| Glukoz (mg/dL) | +0,509 | 0,243 |
| Trigliserit (mg/dL) | +0,685 | 0,090 |
| Total Kolesterol (mg/dL) | +0,036 | 0,939 |
| HDL kolesterol (mg/dL) | -0,107 | 0,819 |
| LDL kolesterol (mg/dL) | +0,286 | 0,535 |
| VLDL (mg/dL) | +0,685 | 0,090 |
| AST (U/L) | +0,450 | 0,310 |
| ALT (U/L) | +0,371 | 0,413 |
| İnsülin (µIU/mL) | +0,607 | 0,148 |
| HOMA-IR | +0,750 | 0,052 |
| Chemerin KC dokusu (ng/100 mg doku) | +0,500 | 0,253 |
| Chemerin Yağ dokusu (ng/100 mg doku) | +0,643 | 0,119 |
| Desnutrin serum (ng/mL) | -0,857 | 0,014 |
| Deney sonu ağırlık (gr) | +0,893 | 0,007 |

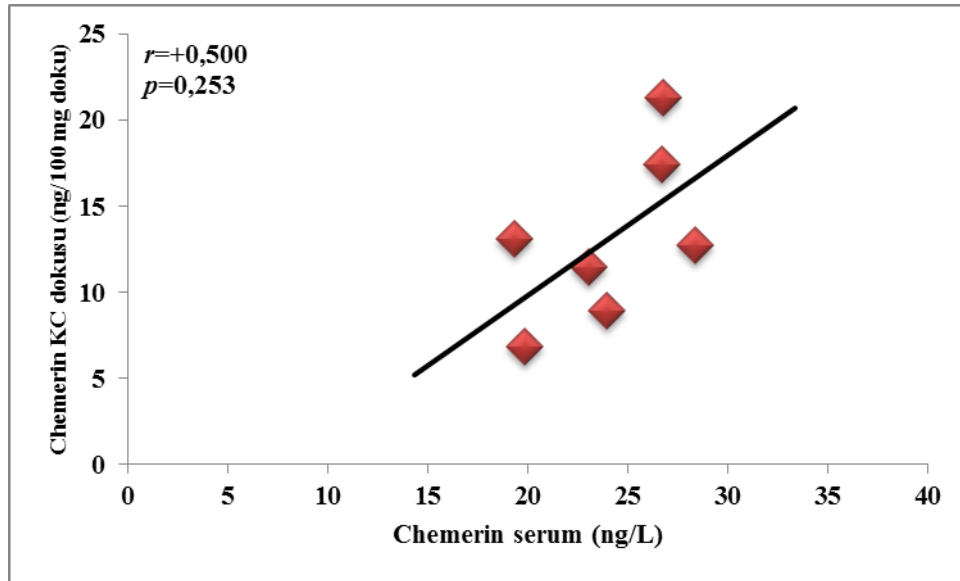


Şekil 23. Kontrol grubu ratlarda serum chemerin ve HOMA-IR arasındaki ilişki



Şekil 24. Kontrol grubu ratlarda serum ve yağ dokusu chemerin düzeyleri arasındaki ilişki

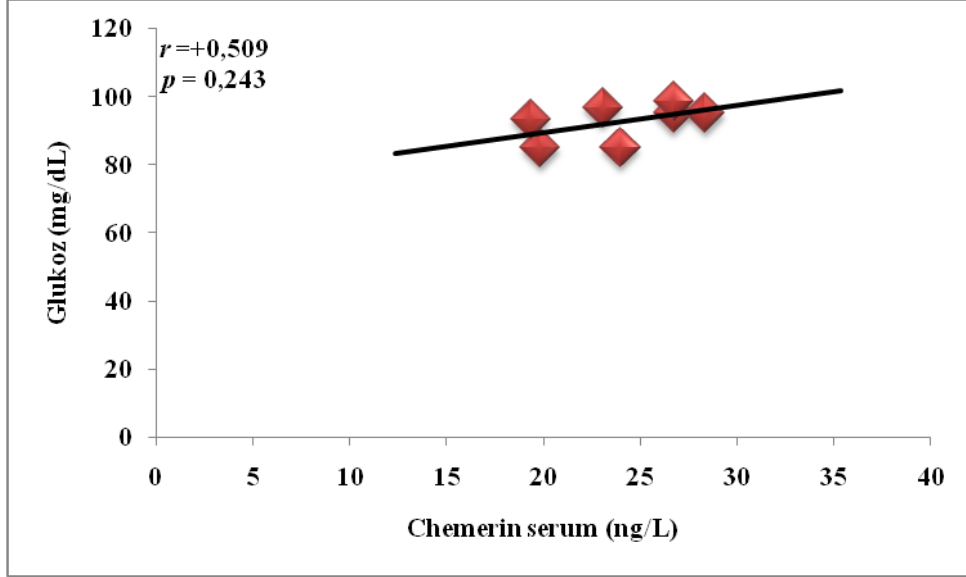
Kontrol grubu ratlarda serum ve yağ dokusu chemerin düzeyleri arasında pozitif bir ilişki olmasına rağmen, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,643$, $p>0,05$; Şekil 24).



Şekil 25. Kontrol grubu ratlarda serum ve karaciğer chemerin düzeyleri arasındaki ilişki

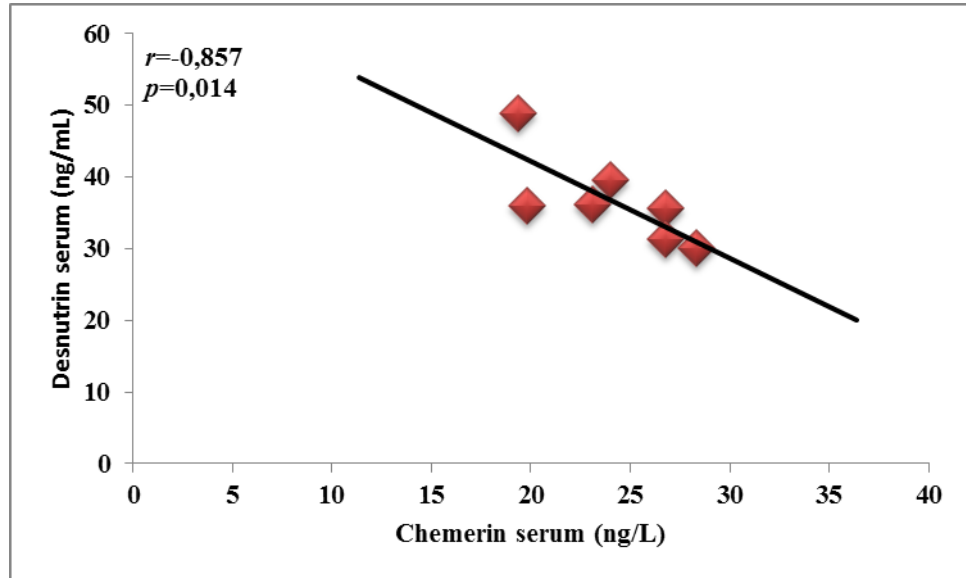
Kontrol grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu chemerin düzeyleri arasındaki ilişki pozitif yönde tespit edildi. Bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($r=0,500$, $p>0,05$; Şekil 25).

Kontrol grubunda serum chemerin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan pozitif bir ilişki mevcut idi ($r=0,509$, $p>0,05$; Şekil 26).



Şekil 26. Kontrol grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile serum glukoz arasındaki ilişki

Kontrol grubu ratlarda serum chemerin ve desnutrin düzeyleri açısından ilişki analizlerine bakıldığında negatif yönde kuvvetli bir ilişki mevcut olup bu ilişki istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($r=-0,857$, $p<0,05$; Şekil 27).



Şekil 27. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin ve chemerin düzeyleri arasındaki ilişki

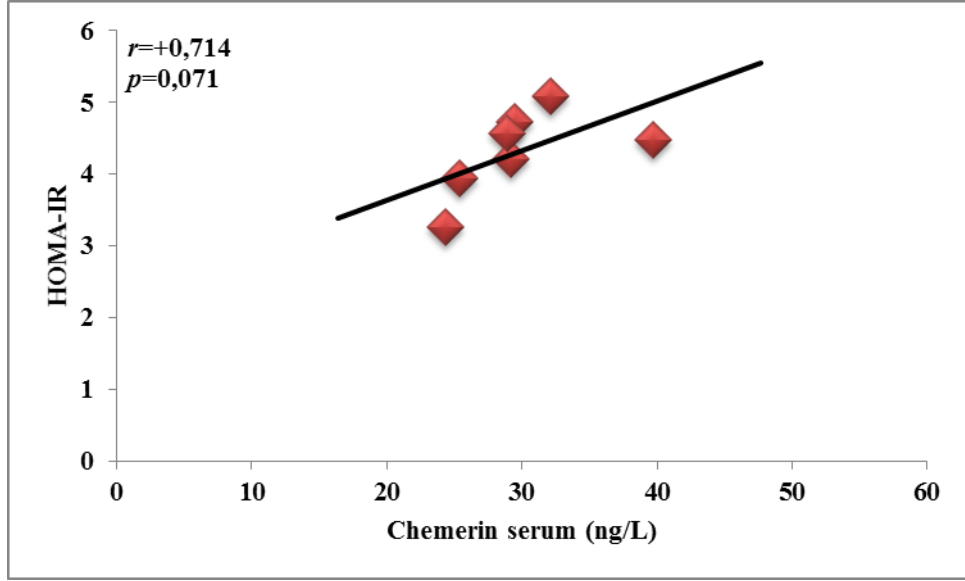
3.1.3.2.2. Metabolik Sendrom Grubu Ratlarda Serum Chemerin Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri

MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile çeşitli parametreler arasında ilişki analizleri yapıldı. Bu analizler tablo 17’de görülmektedir.

Tablo 17. MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki analizleri

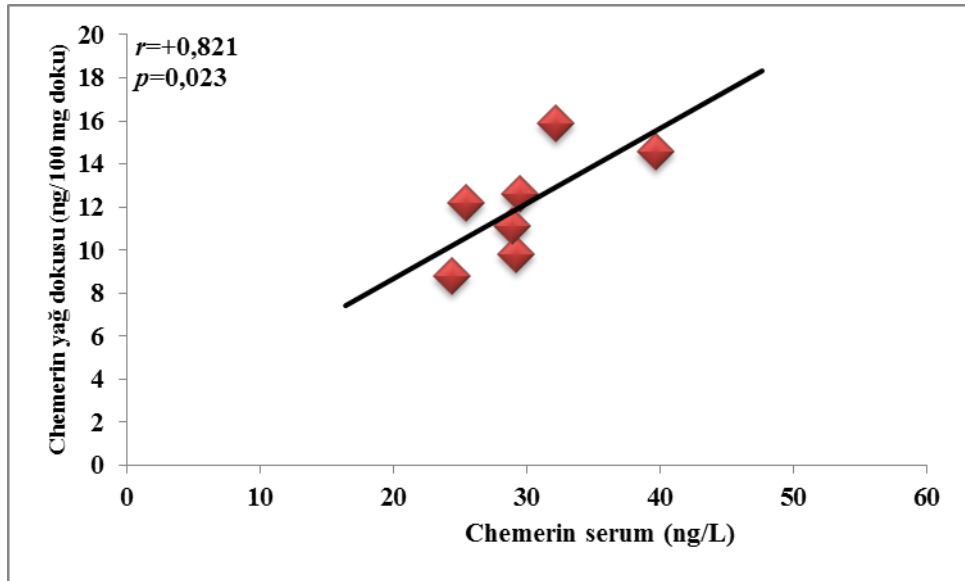
| Parametreler | Chemerin Serum (ng/L) | |
|--------------------------------------|-----------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>p</i> |
| Glukoz (mg/dL) | +0,937 | 0,002 |
| Trigliserit (mg/dL) | +0,429 | 0,337 |
| Total Kolesterol (mg/dL) | +0,286 | 0,535 |
| HDL kolesterol (mg/dL) | -0,441 | 0,323 |
| LDL kolesterol (mg/dL) | +0,571 | 0,180 |
| VLDL (mg/dL) | +0,429 | 0,337 |
| AST (U/L) | +0,286 | 0,535 |
| ALT (U/L) | +0,378 | 0,403 |
| İnsülin (µIU/mL) | +0,714 | 0,071 |
| HOMA-IR | +0,714 | 0,071 |
| Chemerin KC dokusu (ng/100 mg doku) | +0,500 | 0,253 |
| Chemerin Yağ dokusu (ng/100 mg doku) | +0,821 | 0,023 |
| Desnutrin serum (ng/mL) | -0,955 | 0,001 |
| Deney sonu ağırlık (gr) | +0,811 | 0,027 |

Çalışmaya dahil edilen MetS grubu ratların serum chemerin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki analizleri incelendiğinde pozitif bir ilişki olduğu tespit edildi fakat bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($r=0,714$, $p>0,05$; Şekil 28).

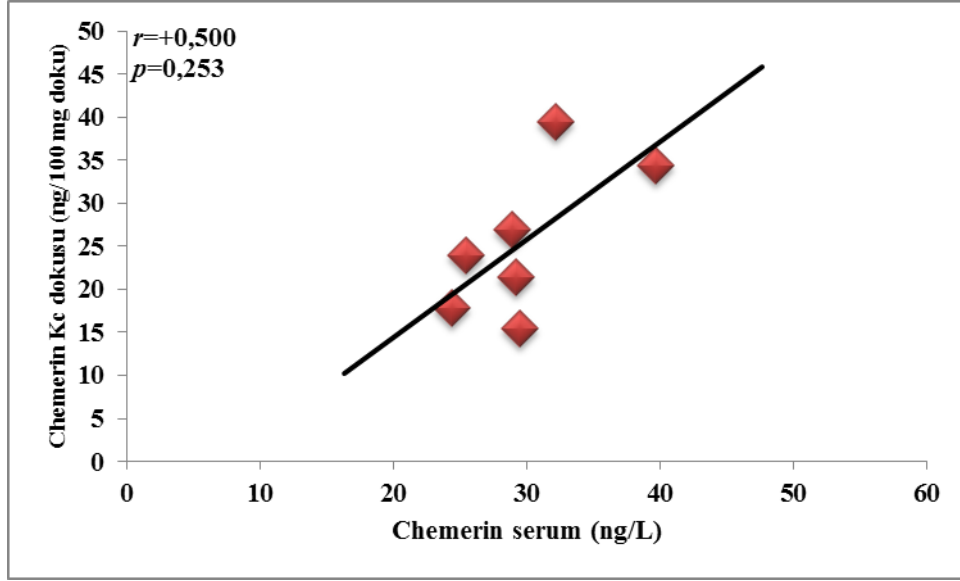


Şekil 28. MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki

Yağ dokusundaki chemerin düzeyleri ile serum chemerin düzeylerindeki ilişkiler analiz edildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı güçlü bir ilişki tespit edildi ($r=0,821$, $p<0,05$; Şekil 29).



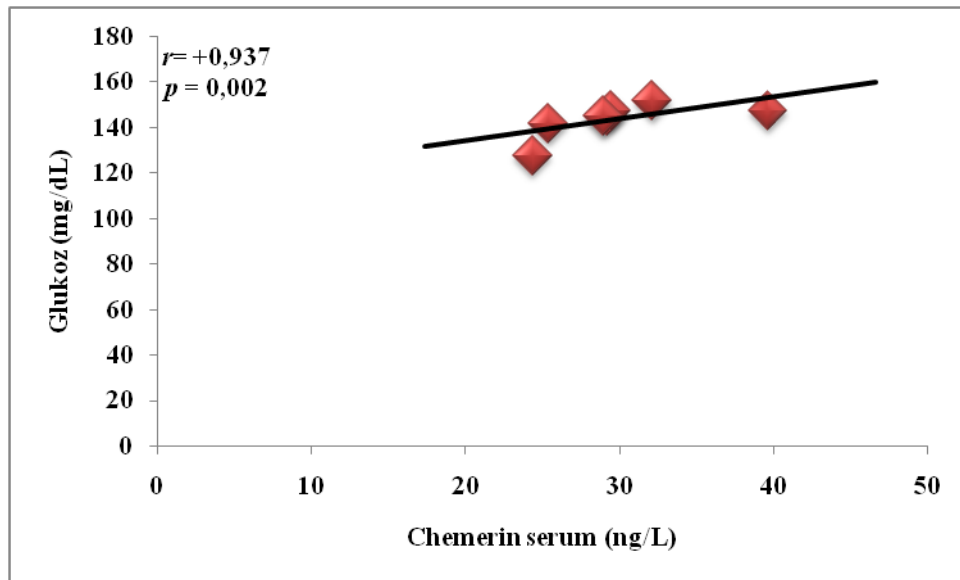
Şekil 29. MetS grubu ratlarda serum ve yağ dokusu chemerin düzeyleri arasındaki ilişki



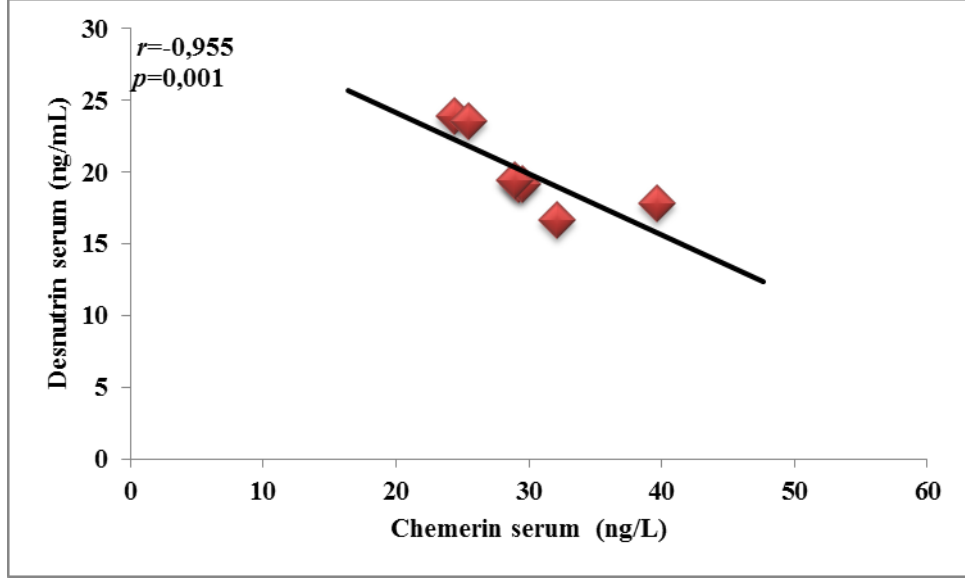
Şekil 30. MetS grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu chemerin düzeyleri arasındaki ilişki

MetS grubu ratların serum chemerin düzeyleri ile karaciğer dokusu chemerin düzeyleri arasında pozitif bir ilişki mevcuttu fakat bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tespit edilmedi ($r=0,500$, $p>0,05$; Şekil 30).

MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı bir pozitif ilişki tespit edildi ($r=0,937$, $p<0,01$; Şekil 31).



Şekil 31. MetS grubu ratlarda serum chemerin düzeyleri ile deney sonu ağırlık arasındaki ilişki



Şekil 32. MetS grubu ratlarda serum chemerin ve desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki

MetS grubu ratlarda serum chemerin ve desnutrin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki mevcut idi ($r=-0,955$, $p<0,01$; şekil 32).

Karaciğer ve yağ dokudaki chemerin ekspresyonları ayrıca western blot yöntemi ile de tespit edildi (Şekil 33,34).



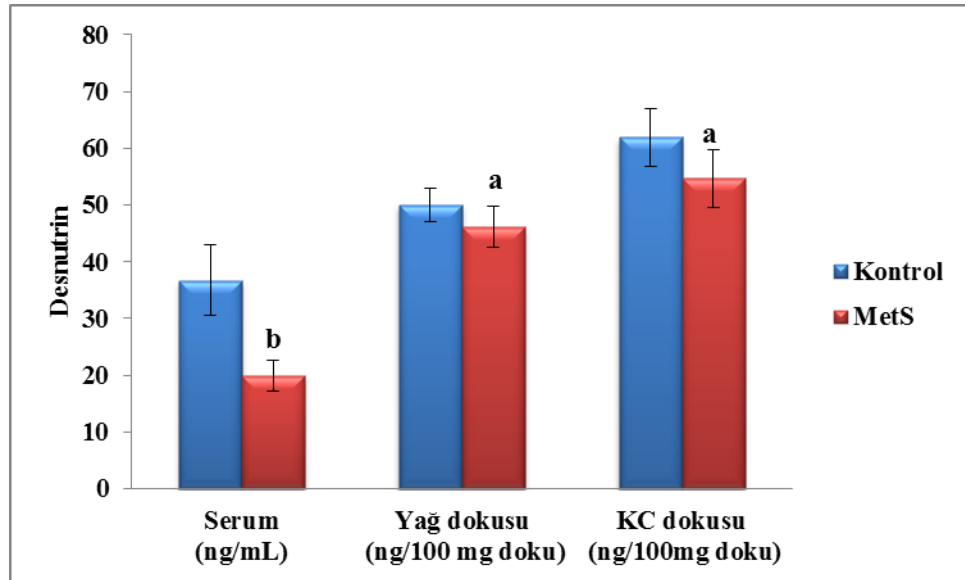
Şekil 33. Karaciğer dokusunda chemerin'in western blotlama yöntemiyle gösterilmesi



Şekil 34. Yağ dokusunda chemerin'in western blotlama yöntemiyle gösterilmesi

3.1.3.3. Desnutrin/ATGL Seviyelerinin Değişimleri

Çalışmaya katılan gruplar desnutrin açısından değerlendirildiğinde deney sonundaki kontrol grubu serum ve doku desnutrin değerleri MetS grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeyde tespit edildi (Şekil 35).



Şekil 35. Sprague-Dawley cinsi ratlarda metabolik sendroma bağlı olarak desnutrin konsantrasyonu değişimlerinin kontrol ile kıyaslanması

a: $p < 0,05$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

b: $p < 0,01$; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Serum desnutrin düzeyleri kontrol grubu (36,74±6,20 ng/mL) ratlarda MetS grubu (19,94±2,76 ng/mL) ratlara göre oldukça yüksek düzeyde tespit edilmiş olup bu aradaki fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p<0,01$).

Karaciğer dokusundaki desnutrin düzeyleri açısından değerlendirildiğinde ise MetS grubu (54,67±5,04 ng/100 mg doku) ratlarda kontrol grubuna (61,96±5,10 ng/100 mg doku) kıyasla daha düşük düzeyde desnutrin tespit edildi. MetS grubundaki bu düşüklüğün kontrole kıyasla istatistiksel olarak da anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Yağ dokusundaki desnutrin düzeyleri bakımından her iki grup kıyaslandığında yine kontrol grubunda (50,05±2,97 ng/100 mg doku) MetS grubuna (46,13±3,57 ng/100 mg doku) göre istatistiksel olarak da anlamlı bir yükseklik bulundu ($p<0,05$).

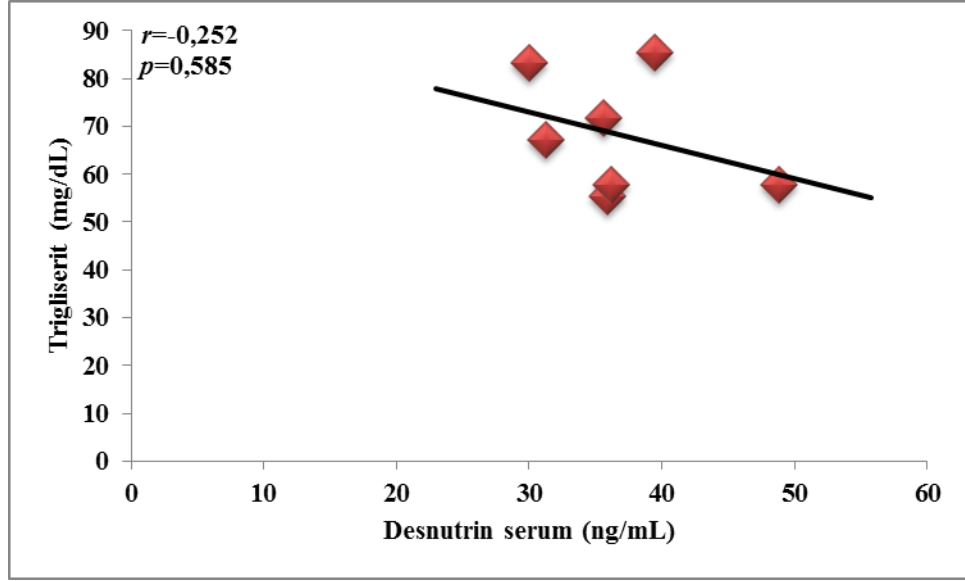
3.1.3.3.1. Kontrol Grubu Ratlarda Serum Desnutrin/ATGL Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri

Tablo 18. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki

| Parametreler | Desnutrin serum (ng/mL) | |
|---------------------------------------|-------------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>p</i> |
| Glukoz (mg/dL) | -0,509 | 0,243 |
| Trigliserit (mg/dL) | -0,252 | 0,585 |
| Total Kolesterol (mg/dL) | -0,250 | 0,589 |
| HDL kolesterol (mg/dL) | -0,036 | 0,939 |
| LDL kolesterol (mg/dL) | -0,429 | 0,337 |
| VLDL (mg/dL) | -0,252 | 0,585 |
| AST (U/L) | -0,631 | 0,129 |
| ALT (U/L) | -0,222 | 0,632 |
| İnsülin (µIU/mL) | -0,750 | 0,048 |
| HOMA-IR | -0,821 | 0,023 |
| Desnutrin Kc dokusu (ng/100 mg doku) | +0,429 | 0,337 |
| Desnutrin Yağ dokusu (ng/100 mg doku) | +0,893 | 0,007 |
| Chemerin serum (ng/L) | -0,857 | 0,014 |
| Deney sonu ağırlık (gr) | -0,679 | 0,094 |

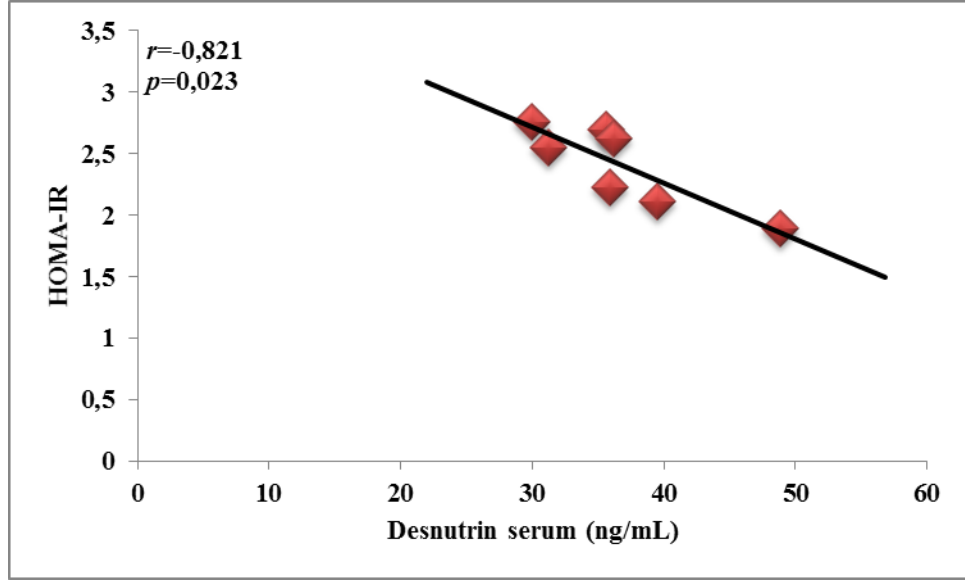
Çalışmaya katılan kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile çeşitli parametreler arasında ilişki analizleri incelenmiş olup bu ilişkiler tablo 18’da gösterildi.

Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile serum chemerin düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı negatif yönde bir ilişki bulundu ($r=-0,857$, $p<0,05$; Şekil 27).



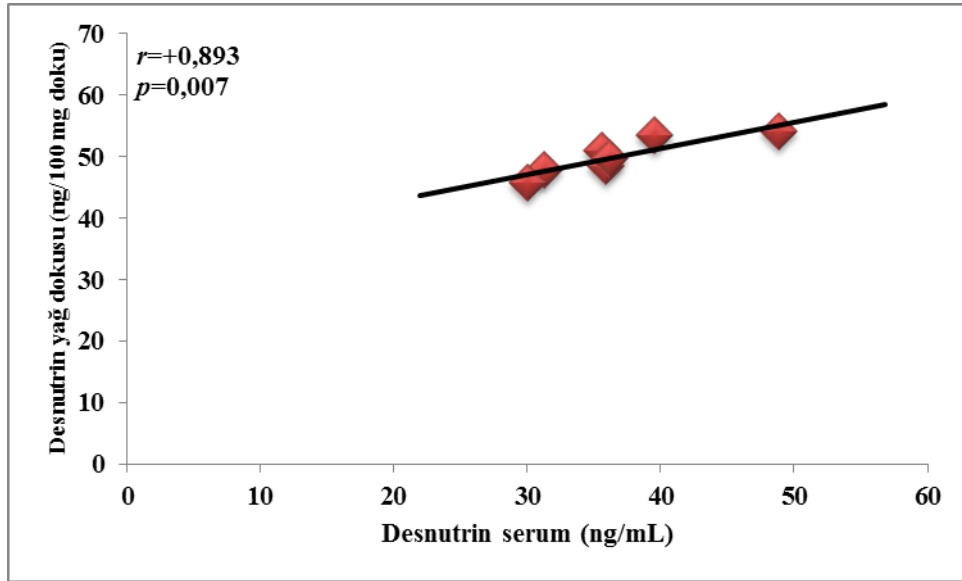
Şekil 36. Kontrol grubu ratlardaki serum desnutrin düzeyleri ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki

Kontrol grubunda serum desnutrin düzeyleri ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan negatif yönde zayıf bir ilişki tespit edildi ($r=-0,252$, $p>0,05$; şekil 36).



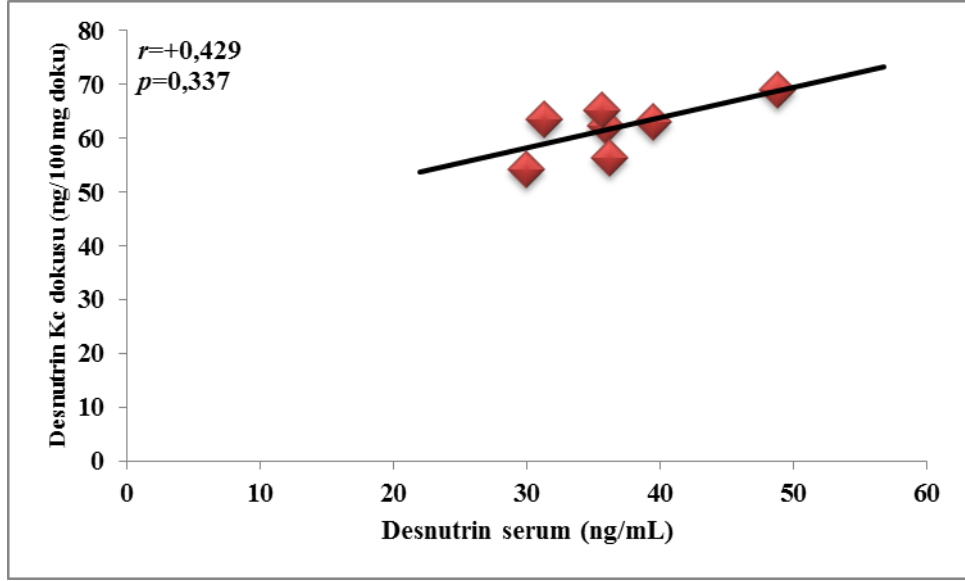
Şekil 37. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki

Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile HOMA-IR arasında istatistiksel olarak da anlamlı olduğu tespit edilen negatif yönde bir ilişki mevcut idi ($r=-0,821$, $p<0,05$; Şekil 37).



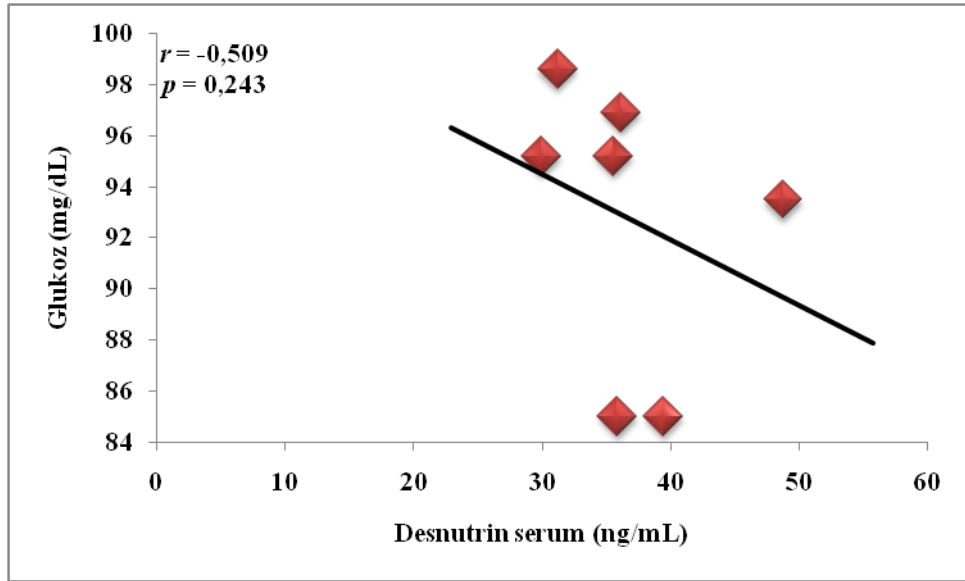
Şekil 38. Kontrol grubu ratlarda serum ve yağ dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki

Kontrol grubundaki ratların serum desnutrin düzeyleri ile yağ dokusundaki desnutrin düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir ilişki bulundu ($r=0,893$, $p<0,01$; Şekil 38).



Şekil 39. Kontrol grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki

Kontrol grubu ratların karaciğer dokusu ve serum desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki analizinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan pozitif bir ilişki tespit edildi ($r=0,429$, $p>0,05$; Şekil 39).



Şekil 40. Kontrol grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasındaki ilişki

Kontrol grubu ratların serum desnutrin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasındaki ilişki analizi incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan negatif yönde bir ilişki tespit edildi ($r=-0,509$, $p>0,05$; Şekil 40).

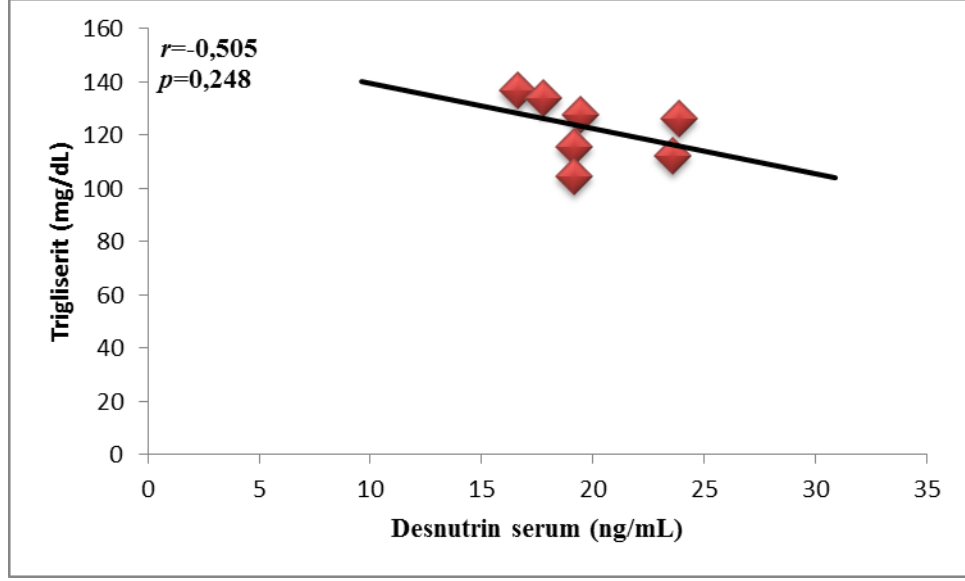
3.1.3.3.2. MetS Grubu Ratlarda Serum Desnutrin/ATGL Düzeyleri ile Diğer Parametreler Arasındaki İlişki Analizleri

Çalışmaya katılan MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile çeşitli parametreler arasında ilişki analizleri incelenmiş olup bu ilişkiler tablo 19’de gösterildi.

Tablo 19. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile diğer parametreler arası ilişki

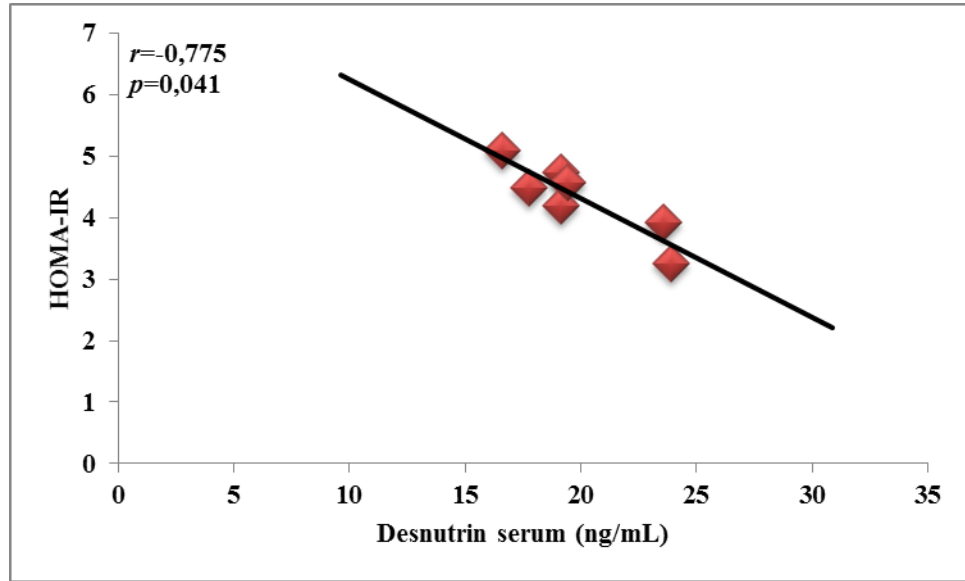
| Parametreler | Desnutrin serum (ng/mL) | |
|---------------------------------------|-------------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>p</i> |
| Glukoz (mg/dL) | -0,973 | 0,000 |
| Trigliserit (mg/dL) | -0,505 | 0,248 |
| Total Kolesterol (mg/dL) | -0,306 | 0,504 |
| HDL kolesterol (mg/dL) | +0,454 | 0,306 |
| LDL kolesterol (mg/dL) | -0,577 | 0,175 |
| VLDL (mg/dL) | -0,505 | 0,248 |
| AST (U/L) | -0,234 | 0,613 |
| ALT (U/L) | -0,236 | 0,610 |
| İnsülin (µIU/mL) | -0,775 | 0,041 |
| HOMA-IR | -0,775 | 0,041 |
| Desnutrin Kc dokusu (ng/100 mg doku) | +0,360 | 0,427 |
| Desnutrin Yağ dokusu (ng/100 mg doku) | +0,775 | 0,041 |
| Chemerin serum (ng/L) | -0,955 | 0,001 |
| Deney sonu ağırlık (gr) | -0,679 | 0,094 |

MetS grubu ratlarda serum desnutrin ve chemerin düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde neaktif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi ($r=-0,955$, $p<0,01$; Şekil 32).



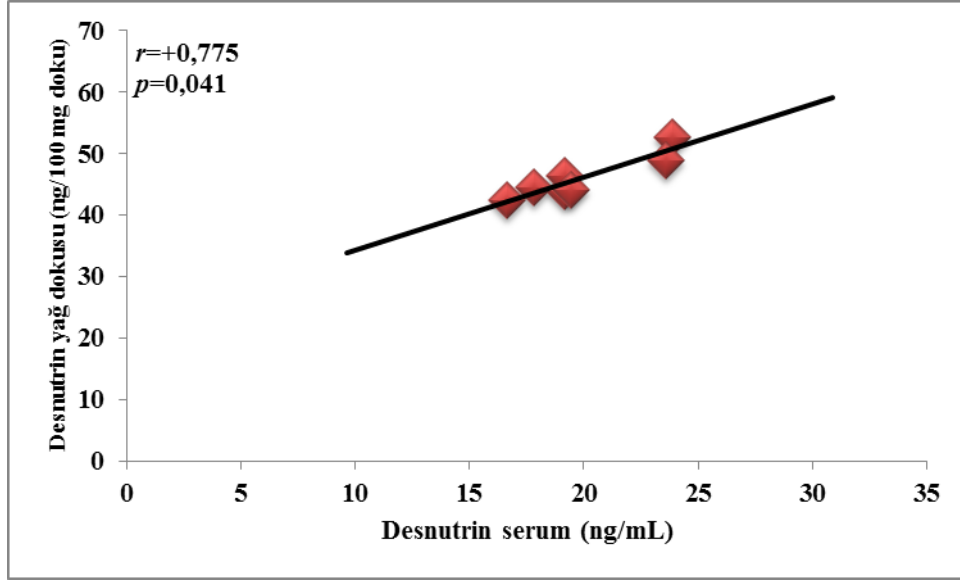
Şekil 41. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki

MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile trigliserit düzeyleri arasındaki ilişki ele alındığında negatif yönde bir ilişki tespit edilmiş olup bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,505$, $p>0,05$; Şekil 41).



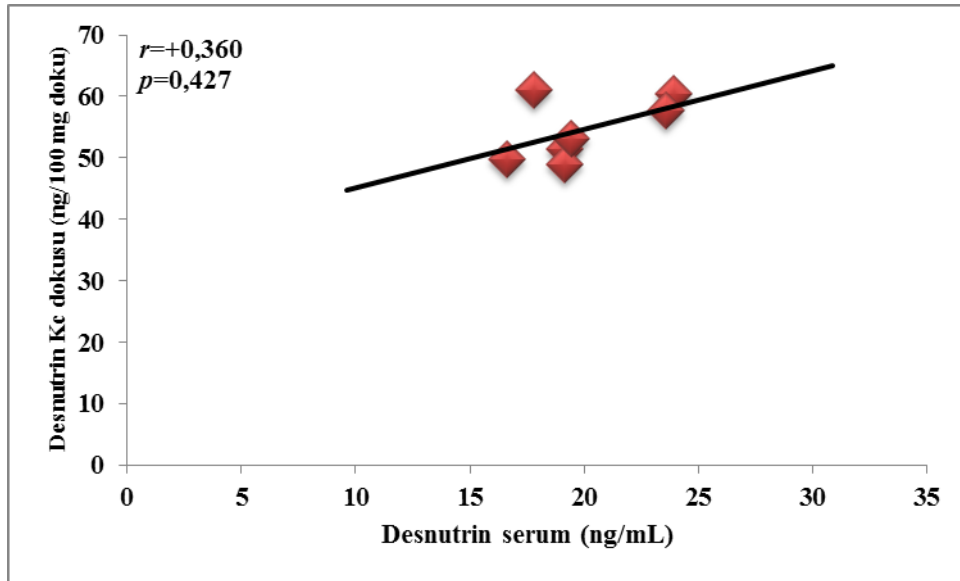
Şekil 42. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki

MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile HOMA-IR arasındaki ilişki değerlendirildiğinde negatif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($r=-0,775$, $p<0,05$; Şekil 42).



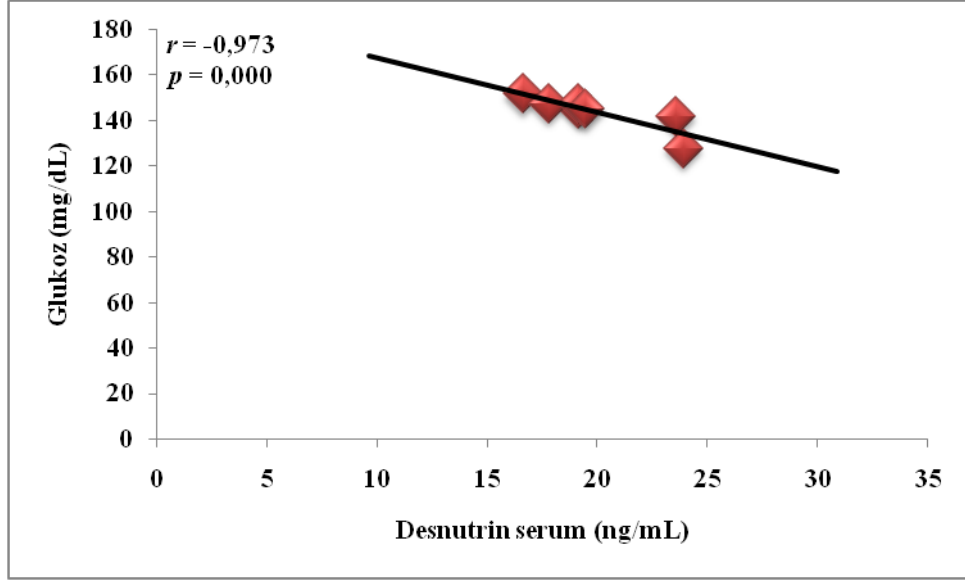
Şekil 43. MetS grubu ratlarda serum ve yağ dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki

MetS grubu ratlarda serum ve yağ dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde tespit edildi ($r=0,775$, $p<0,05$; Şekil 43).



Şekil 44. MetS grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki

MetS grubu ratlarda serum ve karaciğer dokusu desnutrin düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir ilişki tespit edildi ($r=0,360$, $p>0,05$; Şekil 44).



Şekil 45. MetS grubu ratlarda serum desnutrin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasındaki ilişki

MetS grubu ratlardaki serum desnutrin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde negatif yönde ve istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir ilişki tespit edildi ($r=-0,973$, $p<0,001$; Şekil 45).

Karaciğer ve yağ dokusunda Desnutrin/ATGL ekspresyonları ayrıca western blot yöntemi ile de tespit edildi (Şekil 46,47).



Şekil 46. Karaciğer dokusunda desnutrinin western blotlama yöntemiyle gösterilmesi



Şekil 47. Yağ dokusunda desnutrinin western blotlama yöntemiyle gösterilmesi

4. TARTIŞMA

Metabolik sendrom (MetS), ülkemizde ve dünya genelinde giderek artan, her yaş döneminde (erişkin, çocukluk ve adolesan) görülebilen; obezite, Tip2DM ve KVH'lara yol açan, yüksek morbidite ve mortalite ile seyir etmesinden dolayı çağımızın önemli bir halk sağlığı sorunudur. Glukoz intoleransı, dislipidemi, abdominal obesite, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması (NAFL), insülin direnci ve hipertansiyonu kapsayan, kardiyometabolik risk faktörlerinin bir bileşiminden oluşan MetS'in temelinde, beslenme alışkanlıkları, sedanter yaşam tarzı, genetik faktörler ve bireylerin fizyolojik ve psikolojik durumunun etkilediği peptid yapılı hormonlar ve çevresel etkenlerin ilişkisi bulunmaktadır (2, 137).

MetS yağ dokunun anormal düzeyde artışı ile karakterize olup, obezite ile doğrudan bağlantılıdır. Yağların, karbonhidratların yıkım ve yapım dengesizliğinden dolayı enerji homeostazisinin bozulmasından ortaya çıktığı ileri sürülse de, altta yatan patofizyolojik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu amaçla, bu tezde fruktoz diyeti ile deneysel olarak MetS oluşturulduktan sonra, enerji homeostazisinde önemli roller oynayan chemerin ve desnutrin/ATGL'nin karaciğer ve yağ dokuları ile sistemik dolaşımdaki yansımaları araştırıldı.

Çalışmamızda ratlarda MetS oluşup oluşmadığını anlamak için ATP III kriterleri kullanıldı. Bu çalışmada ratların içme sularına %10'luk fruktoz eklendiğinde (41) ATP III kriterlerinden üç tanesinin (artmış açlık serum glukozu ve trigliserid ve azalmış HDL-kolesterol) 12 hafta sonunda elde edildiği gözlemlendi. Bu gözlem daha önce içme sularına %10'luk fruktoz ekleyerek MetS oluşturan çalışmalar ile uyumluk göstermektedir (132, 133, 138). Diyet ile oluşturulan MetS modellerinde genel olarak *Sprague Dawley* veya *Wistar albino* türü ratlar tercih edilmekte ve 6–8 hafta arasında MetS oluştuğu bildirilmektedir (41, 138). Deney boyunca kuyruk veninden haftalık glukometre ile AKŞ takipleri yapıldı. Ancak 8-10. haftadan sonra glukoz miktarları normal fizyolojik düzeylerin üzerine çıkmaya başladığı görüldü ve çalışma 12. haftaya kadar sürdürüldü.

Deneysel metabolik sendrom oluşturmada sıklıkla kullanılan fruktoz, öncelikle karaciğerde metabolize edilirken kontrol basamağı olan fosfofruktokinaz basamağını atlayarak hızlı bir şekilde asetil KoA'ya dönüşmektedir. Artan asetil KoA'lar da

kontROLSÜZ bir şekilde lipogeneze kaymaktadır (40). Bunlar da VLDL halinde karaciğerde paketlenip sistemik dolaşıma salınmaktadır. Daha sonra dolaşımda bulunan lipoprotein lipaz aracılığıyla parçalanıp yağ dokusunda depolanırlar. Böylece adipositlerin hacmi artmaktadır.

Bir diğer mekanizma da beynin fruktozu kullanmamasına bağlıdır. Çünkü beyin fruktozu kullanmadığı için tokluk hissi oluşmamaktadır ve dolayısıyla aşırı yeme isteği ile birlikte, kilo artışı sonucunda obezite gelişmektedir (38, 139). Fruktoz bir taraftan tokluk hissine sebep olan leptin sekresyonunu etkilemezken (38, 137) diğer taraftan da karaciğerde de novo yağ asidi sentezine sebep olmakta (46) ve sonuçta süreç visseral adipoz dokunun artışı ile sonlanmaktadır. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen ağırlık artışlarına bakıldığında kontrol grubunda başlangıç ve deney sonu ağırlıklar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmezken, MetS oluşturulan grupta başlangıç ve deneysel uygulamalar sonunda anlamlı ağırlık artışları olduğu gözlenmiştir. Bu artışların fruktozun yukarıda bahsedilen etkileri sonucu olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda karaciğer fonksiyon testleri olarak ALT ve AST değerleri ölçülmüş ve her ikisinin de MetS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda MetS’de bu iki karaciğer enziminin arttığı ve bu artışların, ratlarda kilo artışına bağlı olarak de novo sentezi artan serbest yağ asitlerinin karaciğerde depolanması ve depolanan bu serbest yağ asitlerinin daha ileri aşamalarda karaciğerde mikro ve makroveziküler yağlanmaya neden olduğu öne sürülmektedir (140-142). Bu sürecin doğal bir sonucu olan hepatosellüler hasarlanmaya bağlı olarak da serumda ALT ve AST seviyeleri yükselmiş olabilir. Çalışmamızdaki veriler ile uyumluluk gösteren bu durumun bir diğer nedeni de içme sularına konulmuş olan %10’luk fruktozun neden olduğu inflamasyondan da kaynaklanabilir. Çünkü fruktoz aynı zamanda inflamasyona da neden olmaktadır (143-145).

Metabolik sendrom oluşumu ve gelişim sürecinde kan glukoz düzeylerindeki değişiklikler ve insülin direnci önemli bir yer tutmaktadır. Çalışmada kontrol grubunda deneysel uygulamalar sonucunda ölçülen açlık kan glukoz düzeyleri $92,77 \pm 5,53$ mg/dL iken, fruktoz uygulanmış MetS grubunun açlık kan glukoz düzeylerinin $143,75 \pm 7,73$ mg/dL olduğu gözlemlendi. MetS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı

olarak yükselmiş olan, kan glukoz düzeylerindeki bu artışın muhtemel sebebi temelde karşılanmamış olan enerji fazlalığı olabilir. Çünkü fruktoz gibi gıdalarla beslenme aşırı miktarda yağ asidi oluşmasına neden olmakta ve artan yağ asitleri de adipoz doku ve kas dokusu gibi insüline duyarlı dokularda substrat fazlalığına yol açtığı için insülin direncine neden olmaktadır (5, 6). Böylece sistemik dolaşımda hiperglisemi gözlenmektedir. Ayrıca insülinin karaciğerde hepatik glukoz üretimi üzerinde inhibitör etkisinin karaciğerde artan serbest yağ asitleri tarafından ortadan kaldırılması sonucu hepatik glukoz üretimi de artmaktadır. Radyoaktif işaretli karbon atomuyla yapılan çalışmalarda dışardan verilen fruktozun yaklaşık yarısının glukoz olarak sistemik dolaşıma yönlendirdiği rapor edilmiştir (35, 148, 149). Dolayısıyla kontrol grubuna göre MetS grubunda daha yüksek açlık kan şekerleri düzeyleri görülmesinin bir diğer nedeninin de alınan fruktozun bir kısmının glukoz dönüşmesinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca MetS’de insülin aracılı sinyal yollarındaki biyokimyasal değişiklikler de insülin aracılı glukoz transportunu ve metabolizmasını azaltmaktadır (18).

MetS gelişiminde en çok suçlanan neden insülin direncidir. Bu bağlamda biz de çalışmamızda insülin hormon düzeylerindeki değişimleri ve buna bağlı olarak hesaplanan HOMA-IR değerlerini karşılaştırdığımızda, MetS grubunda insülin ve insülin direncinin göstergesi olan HOMA-IR düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğunu gözlemledik. Bulgularımız daha önce yayınlanan veriler ile uyumluluk göstermekteydi (46, 146, 150). İnsülin direnci geleneksel olarak glukoz merkezli bir bakış açısı ile tanımlanmaktadır. Yani artan kan şekerini düzenlemek için insülin etkisinde bir sorun geliştiği zaman normoglisemiyi sürdürebilmek için açlık hiperinsülinemisi gelişmektedir (5, 18).

İnsülin direncinin gelişmesine katkı sağlayan ana kaynak, dolaşımdaki aşırı miktardaki yağ asitleridir. Plazmada bulunan albumine bağlı yağ asitleri siklik adozin-monofosfat (cAMP) bağımlı bir enzim olan HSL aracılığıyla adipoz doku trigliserit depolarından salınmaktadır. Bundan başka yağ asitleri; lipoprotein lipaz aracılığıyla trigliseritten zengin lipoproteinlerin lipolizisinden de köken almaktadır. İnsülin hem lipolizinin inhibisyonunda hem lipoprotein lipazın stimülasyonunda önemlidir. Adipoz dokuda insülin temel olarak lipolizisi inhibe edici etki göstermektedir. İnsülin direnci geliştiğinde ise adipoz dokuda depolanan

trigliseritlerin lipolizisi artmaktadır ve böylece ortama daha fazla yağ asitleri salınmaktadır. Artan yağ asitleri de insülinin anti-lipolitik etkisini ortadan kaldırmakta ve reaksiyon lipolizise yönelmektedir (5, 18).

İnsüline duyarlı dokularda aşırı miktardaki serbest yağ asitleri substrat fazlalığına yol açtığı için insülin direncinin oluşmasına sebep olmaktadır. Artan yağ asitleri kaslarda protein kinaz C- λ ve protein kinaz C- ζ aktivasyonunu bozmaktadır (151). Dahası aşırı açıl CoA'ların üretimi veya seramid gibi acyl-CoA kökenli bileşikler Akt1 aktivasyonunu azaltmaktadır (152). İnsülin direnci yüksek yağlı diyet ile beslenen ratın karaciğerinde insülin ile uyarılan insülin reseptör substrat 1 (IRS-1) ve insülin reseptör substrat 2 (IRS-2) tirozin fosforilasyonunda bir defekt gelişmesine neden olmaktadır. Bu değişiklikler protein kinaz c- ϵ ve c-jun N-terminal kinaz-1'in aktivasyonu ile ilişkilidir (153-155). Karaciğerde insülin aracılı glukoz ve lipit metabolizması üzerinde serbest yağ asitlerinin metabolik etkilerinde bazı farklılıklar gözlenmektedir. Karaciğerde dolaşan serbest yağ asitleri insülinin glukoz üretimi üzerindeki inhibitör etkisini baskılayıp hepatik glukoz üretimini artırırken, lipogenezis de devam etmektedir (18).

Çalışmamızda özellikle lipid parametreleri olarak ölçülen TK, TG, LDL-K, VLDL-K ve TK değerleri açısından MetS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışlar olduğu gözlenirken, HDL-K düzeylerinde ise anlamlı düzeyde düşüş olduğu saptandı. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgular, bu konuda daha önce rapor edilen çalışmaların sonuçları ile benzerlikler göstermekteydi (132, 133, 146, 147).

MetS'li grupta lipid parametrelerinde gözlenen bu durumun, deneysel olarak metabolik sendrom oluşturmak için deneklere verilen fruktozdan ve dolayısı ile buna bağlı olarak gelişen metabolik sendromdan kaynaklandığını düşünüyoruz. Çünkü canlı organizmaya alınan fruktoz öncelikle, fruktoz-1 fosfata, ardından da aldolaz enzimlerinin etki etmesiyle triozlara dönüşmekte ve oluşan triozlar da yağ asiti sentezine kayarak triaçilgliserollerin oluşumuna neden olmaktadır (35). Tüm biyokimyasal olaylar sonunda karaciğerde artan de novo serbest yağ asitleri VLDL-TG halinde sistemik dolaşıma geçmektedir. VLDL'nin metabolizması sırasında da LDL partikülleri oluşmaktadır yani miktarları artmaktadır. HDL'deki düşüklük de

lipoprotein metabolizması sırasında HDL'nin kullanılmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (5, 6).

Adipoz doku; enerji metabolizmasında, açlık ve tokluk arasındaki dengenin sağlanmasında rol alan önemli maddelerin salgılandığı çok özel bir endokrin dokudur. Adipoz dokunun keşfedilen ilk üyesi leptinden bu güne kadar adipoz doku kökenli birçok molekül tanımlanmıştır. Şu an itibariyle en az 600 tane adipokin tanımlanmıştır (156, 157). Adipokinler immün cevap (örn. adipsin/kompleman faktör D, interlökinler ve serum amyloid A3) ve inflamasyonda (örn. IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, osteopontin ve chemerin), glukoz metabolizmasında (örn. leptin, adiponektin, dipeptidyl peptidase-4, resistin ve vaspin), insülin sensitivitesi (örn. leptin, adiponektin ve chemerin), hipertansiyon (örn. anjiotensinojen), aterosklerozis gelişimi (örn. katepsinler ve apelin), açlık ve tokluğunu düzenlenmesi (örn. ghrelin ve leptin) gibi birçok biyolojik süreçlerde görev yapmaktadırlar. Düşük adiponektin düzeyleri ve yüksek serum chemerin, IL-6, TNF alfa gibi birçok adipokinler adipoz doku disfonksiyonu göstermektedir (158-160).

MetS, hücrel insülin direnci ve artmış lipolitik kapasite, adiposit disfonksiyonu, intrasellüler toksik moleküllerin birikimi, visseral yağ birikimi, adipoz dokuda immün hücrelerin artışı ve adipoz doku mRNA ve protein ekspresyonlarındaki değişiklikler gibi bir takım patofizyolojik olaylarla başlayan ve adiposit hipertrofisi, kronik sistemik inflamasyonla birlikte aşırı yağ depolanmasıyla seyreden bir süreçtir (161).

MetS'de adipoz dokudan serbest yağ asitleri salınımı artmaktadır. Hücrelere enerji sağlayan yağ asitleri TAG'lerin hidrolizi (lipoliz) ile oluşmaktadır. Adipositler enerji homeostazisinin sağlanmasında ihtiva ettikleri adipokinleri ihtiyaca göre salgılayarak veya baskılayarak bir orkestra şefi gibi görev yapmaktadırlar. Bu yüzden de adipositlerde lipoliz olayı oldukça komplekstir. Açlıkta glukagon, katekolaminler ve ACTH lipoliz olayını stimule etmektedir. Katekolaminler ya dolaşım yoluyla (epinefrin) veya sempatik inervasyon (nor-epinefrin) yoluyla adipoz dokuyu kontrol altında tutarlar (49). Bu klasik hormonlardan başka oreksijenik (ghrelin gibi) ve anoreksijenik (nesfatin-1 gibi) peptid yapılı hormonlar doğrudan obezite ve metabolik sendrom ile bağlantılıdır (162-164).

Öte yandan HSL'dan başka adipoz dokuda yağ yıkımında görevli desnutrin/ATGL de bol miktarda bulunmaktadır (97, 122). Ancak MetS'e bağlı olarak desnutrin/ATGL'nin yağ dokusundaki etkileri, yağ asitlerinin düzenlendiği, enerjiye dönüştüğü ya da glukogenezin gerçekleştiği karaciğer üzerine etkileri ve dolaşımdaki değişim seviyeleri hakkında henüz literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmamızda deneysel olarak oluşturduğumuz MetS modelinde Mets grubunda yağ dokusunda, karaciğer dokusunda ve dolaşımda desnutrin/ATGL ekspresyonlarının anlamlı olarak düşük olduğunu gözlemledik. Gözlemlediğimiz bu bulgular daha önce Jocken ve ark. (66) yaptığı çalışmanın bulgularıyla paralellik göstermektedir. Desnutrin/ATGL lipolitik kaskatta görevli üç enzimin en önemlisidir. Çünkü desnutrin/ATGL TAG'daki ilk ester bağına hidrolize uğratmaktadır (115). Enzim substrat bağıntısını hatırlarsak, substratın optimal olarak ürüne çevrilebilmesi için yeterli miktarda enzimin bulunması şarttır. Çalışmamızda MetS oluşturulurken bol miktarda karbonhidrat (fruktoz) kullandık. Organizmada bulunan aşırı karbonhidrat hiç şüphesiz yağ sentezine neden olacaktır. Dolayısı ile artan yağın organizmanın kilosunu dengede tutması için yıkılması yönünde reaksiyon gerçekleşecektir. Yağ yıkım reaksiyonunda görevli desnutrin/ATGL'nin azalması ve yetersiz olduğundan organizmada obezite ve metabolik sendrom geliştiğini düşünmekteyiz. Çalışmanın başlangıç safhalarında ratlarımız kilo alamamaktaydı. Deneyin ilk haftalarında hayvanların kilo alamamasının temel sebebinin desnutrin üreten tüm dokuların tam kapasite ile çalıştığı ve ratların vücudunda da bu yüzden yağ depolanmadığını düşünmekteyiz. Yani desnutrin üreten dokular ihtiyacı karşılayamaz duruma gelmektedir. Bu yüzden obezite ve MetS ortaya çıkmaktadır.

Hormona duyarlı lipaz yokluğunda adipositlerdeki trigliserit lipaz aktivitesinin %60'ı oranında devam ettiği bildirilmiştir (97). Yani hormona duyarlı lipaz, trigliseritleri hidrolize eden tek lipaz değildir (Şekil 5). Muhtemelen yağ yıkımında primer öneme sahip olan desnutrin/ATGL basamağıdır. Dolayısı ile bu basamak yağ yıkımının en önemli kontrol basamaklarından biri olduğu görülmektedir. Bu basamakta ki yetersizlik yağ yıkımını sekteye uğratacaktır. Diğer bir anlatımla yağ yıkımındaki desnutrin/ATGL basamağındaki eksiklik; organizmanın insülin direnci sendromuna giden ilk biyokimyasal basamağını oluşturduğunu düşünmekteyiz. Çünkü organizmada desnutrin/ATGL yetersizliğine bağlı olarak yağ hacmi artmaktadır.

Ancak kısa süreli yağlı diyetle beslenenlerde desnutrin/ATGL miktarının fizyolojik sınırlarda tutulması vücutta yağ birikimini engellediğini düşünmekteyiz. Yağ hidrolizinin anahtar enzimi olan desnutrin/ATGL, metabolizmayı olumlu yönde etkileyerek dengeli bir kilo kontrolünü sağlayabileceğinden gelecekte obezite tedavisinde hak ettiği yeri alacağı kanaatindeyiz.

Bu çalışmada desnutrin/ATGL'ye ek olarak fruktoz ile MetS oluşturulmuş ratlarda chemerin düzeylerinin MetS'de nasıl değiştiği de araştırıldı. Çünkü chemerin'in insülin aracılı glukoz regülasyonu üzerinde etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir (165). Bu sebepten dolayı chemerin insülin direnci ve MetS ile ilişkili hastalıkların risklerini azaltmada önemli bir aracı olabileceğini düşünmekteyiz. Abdominal viseral yağ birikimi, kan basıncı, lipit profili ve serum chemerin düzeyi arasında bağlantı bulunmaktadır (166, 167). Ancak artmış chemerin düzeyleri obezite ve obezite ilişkili hastalıklarla ilişkili olduğu (168, 169) bildirilmesine rağmen altta yatan mekanizma tam aydınlatılamamıştır. Biz bu çalışmada chemerin'in glukoz homeostazisini sağlayarak, insülin miktarının dengede tutulmasına aracılık ederek vücutta enerji metabolizmasının düzenlenmesine katkıda bulunduğunu düşünüyoruz.

Bu açıklamalardan sonra şu bilimsel soru akla gelebilir. Madem chemerin insülin seviyelerinin ayarlanmasında görev yapmaktadır, öyleyse bu deneyde ratlarda nasıl MetS oluştu? Daha önce belirttiğimiz desnutrin/ATGL basamağındaki aksamaları bir kenara bırakacak olursak, muhtemelen chemerine karşı bir direnç geliştiği ve bu yüzden de chemerinin daha önce atf edilen görevleri yerine getirememesi, yani insülin miktarlarını fizyolojik sınırlara çekememesi sebebiyle organizmada yağ yapımı başlamış ve bu yüzden MetS gelişmiş olabileceği kanaatindeyiz. Benzer durumu desnutrin içinde söyleyebiliriz. Çünkü yağ yıkımından sorumlu desnutrin azalmış ve yağ depolanması artmış, dolayısı ile MetS gelişmektedir.

Mevcut çalışmamızın sonuçları; yağ yıkımından sorumlu desnutrin enzim basamağında mı bir inhibisyon var, yoksa miktarları artsa bile insülin miktarlarını nötralize edemeyen chemerin derişimlerin de mi bir sorun var, tam olarak ortaya koyamamaktadır. Bu gelecekte önemli bir araştırma konusu olarak geride kalmıştır.

Bu hayvan deneyinde gözlenen artmış chemerin düzeyleri MetS'li insan çalışmalarının sonuçlarını da teyit etmektedir (170). Mevcut çalışma ve daha önce yapılan insan çalışmaları chemerinin MetS ile doğrudan bağlantılı olduğunu

göstermektedir. Takahashi ve ark. (171) farelerde insülin duyarlılığının chemerin düzeyi ile arttığını bildirmişlerdir. Daha önce yapılan bir başka çalışmada da bozulmuş glukoz toleransının chemerin düzeylerine etki ettiği gözlemlenmiştir (172). Yani chemerin düzeyi ile glukoz düzeyi arasında doğrudan bir bağlantı bulunmaktadır. Mevcut çalışmamızda da serum chemerin düzeyleri ile serum glukoz düzeyleri arasında korelasyon analizleri incelendiğinde pozitif yöndeki anlamlı ilişkinin aslında chemerinin kan glukoz düzeylerini düşürmek için arttığını fakat bu etkinin normal sınırlar içerisine çekmede yetersiz kaldığı göstermektedir. Burada ki muhtemel sebep ya insülin direncinde olduğu gibi chemerinin etkilerine karşı bir direnç gelişmiş olabileceği ya da chemerinin proinflamatuvar etkisinin insülin duyarlılığını artırma etkisini gölgede bıraktığını düşünmekteyiz.

Ayrıca çalışmamızda kullandığımız ELISA testi chemerini prochemerinden ayıramamaktadır. Bu yüzden de chemerin düzeyini prochemerinden ayıran testlerin kullanılmasının, chemerin ile MetS arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılmasında daha faydalı olacağı kanaatindeyiz. Ayrıca Desnutrin/ATGL'yi protein formunda değil de enzimatik aktivitesinin ölçülmesinin daha doğru olacağı kanaatindeyiz. Ancak henüz enzimatik aktiviteyi ölçen bir yöntem bulunmamaktadır.

Gelecekte yağ yıkım metabolizmasında görevli enzimlerin tümünün bir arada çalışılmasının MetS'in etyopatolojisinin aydınlatılmasına katkı yapacağını düşünmekteyiz. Ayrıca MetS'de bundan başka GLUT'lar ve lipolitik enzimler arasındaki bağlantının olup olmadığının araştırılmasının da uygun olacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; çağımızda endüstrileşme ile birlikte karbonhidratların türevleri özellikle fruktoz gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Enerjiden zengin beslenme ve bu enerjinin kullanılamaması sonucu bireylerde kilo alımı ve MetS gelişmekte ve tüm dünyada önemli morbidite/mortalite nedeni olarak olarak karşımızda durmaktadır. Bu çalışmanın limitasyonlarına rağmen chemerin ve desnutrin/ATGL'nin fruktoz ile MetS oluşturulmuş ratlarda insülin direnci ilişkisini ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu sonuçların gelecekte MetS değerlendirmelerinde prognostik rol oynayacağı düşünülmektedir. Artmış chemerin ve azalmış desnutrin seviyeleri MetS'in erken bir biyobelirteci ve diğer MetS kriterlerine ek iki parametre olarak kliniklerde yerlerini alacağını düşünmekteyiz.

5.KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Obesity and Overweight Fact sheet No311. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (ulaşım Ocak 2015).
2. Aydin S, Aksoy A, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, et al. Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* 2014;30(1):1-9.
3. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry* 2009;42(13-14):1331-1346.
4. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51(10):3120-3127.
5. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, et al. The Metabolic Syndrome. *Endocr Rev* 2008;29(7):777-822.
6. Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal* 2005;149(1):33-45.
7. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 1998;15(7):539-553.
8. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 2001;285(19):2486-2497.
9. Sarafidis PA, Nilsson PM. The metabolic syndrome: a glance at its history. *J Hypertens* 2006;24(4):621-626.
10. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37(12):1595-1607.

11. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of internal medicine* 1989;149(7):1514-1520.
12. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care* 1991;14(3):173-194.
13. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 1992;41(6):715-722.
14. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2006;23(5):469-480.
15. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 1999;16(5):442-443.
16. Bloomgarden ZT. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC. *Diabetes care* 2003;26(4):1297-1303.
17. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112(17):2735-2752.
18. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365(9468):1415-1428.
19. Mattsson N, Ronnema T, Juonala M, Viikari JS, Raitakari OT. The prevalence of the metabolic syndrome in young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J Intern Med* 2007;261(2):159-169.

20. Mozumdar A, Liguori G. Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. *Diabetes care* 2011;34(1):216-219.
21. Onat A, Yuksel M, Koroglu B, Gumrukcuoglu HA, Aydin M, Cakmak HA, et al. [Turkish Adult Risk Factor Study survey 2012: overall and coronary mortality and trends in the prevalence of metabolic syndrome]. *Turk Kardiyoloji Dernegi arsivi : Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir* 2013;41(5):373-378.
22. Bener A, Ziric M, Musallam M, Khader YS, Al-Hamaq AO. Prevalence of metabolic syndrome according to Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation criteria: a population-based study. *Metabolic syndrome and related disorders* 2009;7(3):221-229.
23. Massiera F, Barbry P, Guesnet P, Joly A, Luquet S, Moreilhon-Brest C, et al. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J Lipid Res* 2010;51(8):2352-2361.
24. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2010;7(5):251-264.
25. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011;2011:351982:1-14.
26. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006;36(3):485-501.
27. Chun MR, Lee YJ, Kim KH, Kim YW, Park SY, Lee KM, et al. Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diet composition on muscle insulin resistance in rats. *Journal of Korean medical science* 2010;25(7):1053-1059.
28. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam MA, Diwan V, et al. High-carbohydrate, High-fat Diet-induced Metabolic Syndrome and Cardiovascular Remodeling in Rats. *J Cardiovasc Pharm* 2011;57(5):611-624.

29. Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;52(3):934-944.
30. Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids in health and disease* 2010;9:60:1-10.
31. Menard SL, Croteau E, Sarrhini O, Gelinat R, Brassard P, Ouellet R, et al. Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2010;298(5):E1049-1057.
32. Axelsen LN, Lademann JB, Petersen JS, Holstein-Rathlou NH, Ploug T, Prats C, et al. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010;298(6):R1560-1570.
33. Couturier K, Batandier C, Awada M, Hininger-Favier I, Canini F, Anderson RA, et al. Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body composition in an animal model of the metabolic syndrome. *Archives of biochemistry and biophysics* 2010;501(1):158-161.
34. Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, et al. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology* 2010;151(5):2040-2049.
35. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological reviews* 2010;90(1):23-46.
36. Santure M, Pitre M, Marette A, Deshaies Y, Lemieux C, Lariviere R, et al. Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial

blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Brit J Pharmacol* 2002;137(2):185-196.

37. Coelho MS, Lopes KL, Freitas RD, de Oliveira-Sales EB, Bergasmaschi CT, Campos RR, et al. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Peptides* 2010;162(1-3):61-67.

38. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004;79(4):537-543.

39. Le KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2006;9(4):469-475.

40. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and cellular biochemistry* 2009;332(1-2):145-159.

41. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol-Renal* 2007;292(1):F423-F429.

42. Patel J, Iyer A, Brown L. Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J Biochem Bio* 2009;46(1):66-72.

43. Chang KC, Liang JT, Tseng CD, Wu ET, Hsu KL, Wu MS, et al. Aminoguanidine prevents fructose-induced deterioration in left ventricular-arterial coupling in Wistar rats. *Brit J Pharmacol* 2007;151(3):341-346.

44. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, et al. Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. *J Nutr* 2009;139(11):2067-2071.

45. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005;1(2):80-86.
46. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & metabolism* 2005;2(1):5:1-14.
47. Rutledge AC, Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev* 2007;65(6 Pt 2):S13-23.
48. Tappy L, Le KA. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiological reviews* 2010;90(1):23-46.
49. Murray RK, Kennelly, P.J.,Bender, D.A.,Rodwell,V.W.,Botham,K.M.,Weil,P.A. Harper's Illustrated Biochemistry. The McGraw-Hill Companies 28. Baskı 2009:178-179.
50. Harvey AR, Ferrier,D.R. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; Fifth Edition. 2011:137-140.
51. Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, et al. Abdominal obesity: Role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am J Med* 2007;120(2A):S3-S8.
52. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Archives of medical research* 2005;36(3):232-240.
53. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005;96(12):1221-1232.
54. Sandhofer A, Tatarczyk T, Laimer M, Ritsch A, Kaser S, Paulweber B, et al. The Taq1B-variant in the cholesteryl ester-transfer protein gene and the risk of metabolic syndrome. *Obesity* 2008;16(4):919-922.

55. Edwards KL, Talmud PJ, Newman B, Krauss RM, Austin MA. Lipoprotein candidate genes for multivariate factors of the insulin resistance syndrome: a sib-pair linkage analysis in women twins. *Twin research: the official journal of the International Society for Twin Studies* 2001;4(1):41-47.
56. Sniderman AD, Marcovina SM. Apolipoprotein A1 and B. *Clin Lab Med* 2006;26(4):733-750.
57. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990;82(2):495-506.
58. Sandhofer A, Kaser S, Ritsch A, Laimer M, Engl J, Paulweber B, et al. Cholesteryl ester transfer protein in metabolic syndrome. *Obesity* 2006;14(5):812-818.
59. Zambon A, Brown BG, Deeb SS, Brunzell JD. Hepatic lipase as a focal point for the development and treatment of coronary artery disease. *J Invest Med* 2001;49(1):112-118.
60. Jiang J, Torok N. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Metabolic syndrome and related disorders* 2008;6(1):1-7.
61. Khashab M, Chalasani N. Use of insulin sensitizers in NASH. *Endocrin Metab Clin* 2007;36(4):1067-1087.
62. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000;106(4):453-458.
63. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(4):473-481.
64. Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of Lipid Research* 2002;43(10):1585-1594.

65. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(52):40236-40241.
66. Jocken JWE, Langin D, Smit E, Saris WHM, Valle C, Hul GB, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocr Metab* 2007;92(6):2292-2299.
67. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *Febs Lett* 2008;582(1):97-105.
68. Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. Inflamed adipose tissue - A culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscl Throm Vas* 2007;27(11):2276-2283.
69. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112(12):1796-1808.
70. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocr Metab* 2007;92(3):1023-1033.
71. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(38):28175-28188.
72. Nagpal S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, et al. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol* 1997;109(1):91-95.
73. Rourke JL, Dranse HJ, Sinal CJ. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2013;14(3):245-262.

74. Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Serum Chemerin Levels Vary with Time of Day and Are Modified by Obesity and Tumor Necrosis Factor-alpha. *Endocrinology* 2010;151(6):2590-2602.
75. Tan BK, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Kaur J, Heutling D, et al. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes* 2009;58(9):1971-1977.
76. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003;198(7):977-985.
77. Doyle JR, Krishnaji ST, Zhu GL, Xu ZZ, Heller D, Ji RR, et al. Development of a Membrane-anchored Chemerin Receptor Agonist as a Novel Modulator of Allergic Airway Inflammation and Neuropathic Pain. *J Biol Chem* 2014;289(19):13385-13396.
78. Du XY, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, et al. Regulation of Chemerin Bioactivity by Plasma Carboxypeptidase N, Carboxypeptidase B (Activated Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor), and Platelets. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284(2):751-758.
79. Meder W, Wendland M, Busmann A, Kutzleb C, Spodsberg N, John H, et al. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *Febs Letters* 2003;555(3):495-499.
80. Yamaguchi Y, Du XY, Zhao L, Morser J, Leung LLK. Proteolytic Cleavage of Chemerin Protein Is Necessary for Activation to the Active Form, Chem157S, Which Functions as a Signaling Molecule in Glioblastoma. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286(45):39510-39519.
81. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, et al. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(41):34661-34666.

82. Zhao L, Yamaguchi Y, Sharif S, Du XY, Song JJ, Lee DM, et al. Chemerin158K Protein Is the Dominant Chemerin Isoform in Synovial and Cerebrospinal Fluids but Not in Plasma. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286(45):39520-39527.
83. Guillabert A, Wittamer V, Bondue B, Godot V, Imbault V, Parmentier M, et al. Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation. *J Leukocyte Biol* 2008;84(6):1530-1539.
84. Lorenz MC, Pan XW, Harashima T, Cardenas ME, Xue Y, Hirsch JP, et al. The G protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2000;154(2):609-622.
85. Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, et al. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(1):64-69.
86. Zabel BA, Nakae S, Zuniga L, Kim JY, Ohyama T, Alt C, et al. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med* 2008;205(10):2207-2220.
87. Berg V, Sveinbjornsson B, Bendiksen S, Brox J, Meknas K, Figenschau Y. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin(21-157). *Arthritis Res Ther* 2010;12(6):R228:1-12.
88. Kaneko K, Miyabe Y, Takayasu A, Fukuda S, Miyabe C, Ebisawa M, et al. Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13(5):R158:1-14.
89. Kaur J, Adya R, Tan BK, Chen J, Randeve HS. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem Bioph Res Co* 2010;391(4):1762-1768.
90. Roh SG, Song SH, Choi KC, Katoh K, Wittamer V, Parmentier M, et al. Chemerin - A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Bioph Res Co* 2007;362(4):1013-1018.

91. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, et al. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol* 2010;72(3):342-348.
92. Pfau D, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, et al. Serum Levels of the Adipokine Chemerin in Relation to Renal Function. *Diabetes care* 2010;33(1):171-173.
93. Adrych K, Stojek M, Smoczynski M, Sledzinski T, Sylwia SW, Swierczynski J. Increased serum chemerin concentration in patients with chronic pancreatitis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2012;44(5):393-397.
94. Stepan H, Philipp A, Roth I, Kralisch S, Jank A, Schaarschmidt W, et al. Serum levels of the adipokine chemerin are increased in preeclampsia during and 6 months after pregnancy. *Regul Pept* 2011;168(1-3):69-72.
95. Sell H, Divoux A, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Bedossa P, et al. Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(6):2892-2896.
96. Valcamonica E, Chighizola CB, Comi D, De Lucia O, Pisoni L, Murgo A, et al. Levels of chemerin and interleukin 8 in the synovial fluid of patients with inflammatory arthritides and osteoarthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 2014;32(2):243-250.
97. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research* 2009;50(1):3-21.
98. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003;14(3):281-287.
99. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annual review of medicine* 2002;53:319-336.

100. Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 2007;48(12):2547-2559.
101. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(45):46835-46842.
102. Beckman M. Cell biology - Great balls of fat. *Science* 2006;311(5765):1232-1234.
103. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7(5):373-378.
104. Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Molecular endocrinology* 2008;22(5):1023-1031.
105. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 2006;53(6):482-491.
106. Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:365-393.
107. Lafontan M, Berlan M. Fat-Cell Adrenergic-Receptors and the Control of White and Brown Fat-Cell Function. *Journal of Lipid Research* 1993;34(7):1057-1091.
108. Collins S, Cao W, Robidoux J. Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism. *Molecular endocrinology* 2004;18(9):2123-2131.
109. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc T* 2003;31:1120-1124.
110. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2006;7(2):85-96.

111. Vaughan M, Berger JE, Steinberg D. Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue. *J Biol Chem* 1964;239:401-409.
112. Donsmark M, Langfort J, Holm C, Ploug T, Galbo H. Hormone-sensitive lipase as mediator of lipolysis in contracting skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 2005;33(3):127-133.
113. Haemmerle G, Zimmermann R, Zechner R. Letting lipids go: hormone-sensitive lipase. *Curr Opin Lipidol* 2003;14(3):289-297.
114. Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase - New roles for an old enzyme. *Biochemical Journal* 2004;379:11-22.
115. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004;306(5700):1383-1386.
116. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(45):47066-47075.
117. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 2004;279(47):48968-48975.
118. Smirnova E, Goldberg EB, Makarova KS, Lin L, Brown WJ, Jackson CL. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *Embo Rep* 2006;7(1):106-113.
119. Jimenez-Atienzar M, Cabanes J, Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F, Perez-Gilabert M. Determination of the phospholipase activity of patatin by a continuous spectrophotometric assay. *Lipids* 2003;38(6):677-682.

120. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *Journal of Lipid Research* 2006;47(9):1940-1949.
121. Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R. Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* 2005;16(3):333-340.
122. Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li DM, et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *Journal of Lipid Research* 2005;46(11):2477-2487.
123. Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, et al. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(49):38022-38037.
124. Rydel TJ, Williams JM, Krieger E, Moshiri F, Stallings WC, Brown SM, et al. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry-Us* 2003;42(22):6696-6708.
125. Schneider G, Neuberger G, Wildpaner M, Tian S, Berezovsky I, Eisenhaber F. Application of a sensitive collection heuristic for very large protein families: Evolutionary relationship between adipose triglyceride lipase (ATGL) and classic mammalian lipases. *Bmc Bioinformatics* 2006;7:164:1-13.
126. Bartzt R, Zehmer JK, Zhu MF, Chen Y, Serrero G, Zhao YM, et al. Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-Mediated protein translocation. *J Proteome Res* 2007;6(8):3256-3265.
127. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 2006;312(5774):734-737.
128. Kim JY, Tillison K, Lee JH, Rearick DA, Smas CM. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR gamma. *Am J Physiol-Endoc M* 2006;291(1):E115-E127.

129. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37(5):1202-1219.
130. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JPC, Colledge WH, Doran J, et al. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J Exp Med* 2008;205(4):767-775.
131. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 2007;109(9):3625-3632.
132. Özdoğan MS. Metabolik sendrom oluşturulmuş ratlarda Alfa Lipoik Asit ve Koenzim Q10 uygulamasının oksidatif Stres ve Endotelyal disfonksiyon belirteçlerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2011.
133. Demir AF. Metabolik sendromlu ratlarda Resveratrol, Krom Pikolinat ve Tiazolidindionların adiposit yağ asid bağlayıcı protein, adiponektin ve tümör nekroz faktör- α düzeyleri üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2009.
134. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 1972;18(6):499-502.
135. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412-419.
136. Machado SM, Pacheco-Soares C, Marciano FR, Lobo AO, da Silva NS. Photodynamic therapy in the cattle protozoan *Tritrichomonas foetus* cultivated on superhydrophilic carbon nanotube. *Mat Sci Eng C-Mater* 2014;36:180-186.
137. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and cellular biochemistry* 2009;332(1-2):145-159.

138. Alzamendi A, Giovambattista A, Raschia A, Madrid V, Gaillard RC, Rebolledo O, et al. Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine* 2009;35(2):227-232.
139. Ochoa M, Lalles JP, Malbert CH, Val-Laillet D. Dietary sugars: their detection by the gut-brain axis and their peripheral and central effects in health and diseases. *European journal of nutrition* 2015;54(1):1-24.
140. Zhang Y, Lu X, Hong J, Chao M, Gu W, Wang W, et al. Positive correlations of liver enzymes with metabolic syndrome including insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Endocrine* 2010;38(2):181-187.
141. Forlani G, Di Bonito P, Mannucci E, Capaldo B, Genovese S, Orrasch M, et al. Prevalence of elevated liver enzymes in Type 2 diabetes mellitus and its association with the metabolic syndrome. *Journal of endocrinological investigation* 2008;31(2):146-152.
142. Kerner A, Avizohar O, Sella R, Bartha P, Zinder O, Markiewicz W, et al. Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein - Possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arterioscl Throm Vas* 2005;25(1):193-197.
143. Zhou J, Cerny V, Lehmann C. Fructose--the sweet poison. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 2011;35(2):158-159.
144. Mattioli LF, Thomas JH, Holloway NB, Schropp KP, Wood JG. Effects of intragastric fructose and dextrose on mesenteric microvascular inflammation and postprandial hyperemia in the rat. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 2011;35(2):223-228.
145. Roncal-Jimenez CA, Lanaspá MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, et al. Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism* 2011;60(9):1259-1270.

146. Altaş S. Metabolik sendrom oluşturulan ratlarda resveratrol uygulamasının serum resistin ve apelin düzeyleri üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2011.
147. Mackawy AM, Badawi ME. Association of vitamin D and vitamin D receptor gene polymorphisms with chronic inflammation, insulin resistance and metabolic syndrome components in type 2 diabetic Egyptian patients. *Meta gene* 2014;2:540-556.
148. Delarue J, Normand S, Pachiardi C, Beylot M, Lamisse F, Riou JP. The contribution of naturally labelled ¹³C fructose to glucose appearance in humans. *Diabetologia* 1993;36(4):338-345.
149. Tounian P, Schneiter P, Henry S, Jequier E, Tappy L. Effects of Infused Fructose on Endogenous Glucose-Production, Gluconeogenesis, and Glycogen-Metabolism. *Am J Physiol-Endoc M* 1994;267(5):E710-E717.
150. Mahmoud AA, Elshazly SM. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One* 2014;9(9):e106993:1-8.
151. Kim YB, Shulman GI, Kahn BB. Fatty acid infusion selectively impairs insulin action on Akt1 and protein kinase C lambda/zeta but not on glycogen synthase kinase-3. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277(36):32915-32922.
152. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li GB, Dobrowsky RT, Florant GL, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(12):10297-10303.
153. Samuel VT, Liu ZX, Qu XQ, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(31):32345-32353.
154. Iwawaki T, Akai R, Kohno K, Miura M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med* 2004;10(1):98-102.

155. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306(5695):457-461.
156. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clinical applications* 2012;6(1-2):91-101.
157. Dahlman I, Elsen M, Tennagels N, Korn M, Brockmann B, Sell H, et al. Functional annotation of the human fat cell secretome. *Arch Physiol Biochem* 2012;118(3):84-91.
158. Bluher M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Molecular metabolism* 2014;3(3):230-240.
159. Bluher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes & metabolism journal* 2012;36(5):317-327.
160. Sell H, Bluher M, Kloting N, Schlich R, Willems M, Ruppe F, et al. Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes care* 2013;36(12):4083-4090.
161. Kloting N, Bluher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2014;15(4):277-287.
162. Catak Z, Aydin S, Sahin I, Kuloglu T, Aksoy A, Dagli AF. Regulatory neuropeptides (ghrelin, obestatin and nesfatin-1) levels in serum and reproductive tissues of female and male rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Neuropeptides* 2014;48(3):167-177.
163. Archer ZA, Rayner DV, Mercer JG. Hypothalamic gene expression is altered in underweight but obese juvenile male Sprague-Dawley rats fed a high-energy diet. *J Nutr* 2004;134(6):1369-1374.

164. Thierry M, Pasquis B, Acar N, Gregoire S, Febvret V, Buteau B, et al. Metabolic Syndrome Triggered by High-Fructose Diet Favors Choroidal Neovascularization and Impairs Retinal Light Sensitivity in the Rat. *Plos One* 2014;9(11):e112450:1-13.
165. Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kitazawa R, et al. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Febs Lett* 2008;582(5):573-578.
166. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007;148(10):4687-4694.
167. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, et al. Chemerin Is Associated with Metabolic Syndrome Phenotypes in a Mexican-American Population. *J Clin Endocr Metab* 2009;94(8):3085-3088.
168. Li Y, Shi B, Li S. Association between serum chemerin concentrations and clinical indices in obesity or metabolic syndrome: a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(12):e113915:1-14.
169. Fatima SS, Bozaoglu K, Rehman R, Alam F, Memon AS. Elevated chemerin levels in Pakistani men: an interrelation with metabolic syndrome phenotypes. *PLoS One* 2013;8(2):e57113:1-7.
170. Chu SH, Lee MK, Ahn KY, Im JA, Park MS, Lee DC, et al. Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *PLoS One* 2012;7(4):e34710:1-6.
171. Takahashi M, Okimura Y, Iguchi G, Nishizawa H, Yamamoto M, Suda K, et al. Chemerin regulates beta-cell function in mice. *Scientific reports* 2011;1:123:1-10.
172. Tonjes A, Fasshauer M, Kratzsch J, Stumvoll M, Bluher M. Adipokine Pattern in Subjects with Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance in Comparison to Normal Glucose Tolerance and Diabetes. *Plos One* 2010;5(11)e13911:1-6.

6.ÖZGEÇMİŞ

Ordu'nun Ünye ilçesinde 1982 yılında doğdum. İlk, orta ve lise öğrenim hayatımı Ünye'de geçirdim. Tıp eğitimimi 2000-2007 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tamamladım. Mecburi hizmetimi Hakkari ili Çukurca ilçesinde 2007-2009 yılları arasında bitirdim. Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri ihtisasını 2010 Nisan TUS'u ile kazandım. Daha sonra Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na 2011 Mayıs TUS'u ile yerleştim. Temmuz ayından itibaren bu anabilim dalında araştırma görevlisi doktor olarak çalışmaktayım.

Evli ve bir çocuk babasıyım.