

**İNBRED OBEZ FARE MODELLERİNDEKİ DEĞİŞİK ADİPOZ
DOKULARIN YAPI, FONKSİYON VE İÇERİĞİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Proje No: SBAG BM0901-40 (110S235)

Prof.Dr. Feride SEVERCAN
Prof.Dr. Mete SEVERCAN
Doç.Dr. Sreeparna BANERJEE

ÖNSÖZ

Berlin inbred obez fare modellerinin inguinal (IF) ve gonadal (GF) adipoz dokuların makromoleküllerinde (protein, karbonhidrat, yağ, nükleik asit v.b) oluşan yapısal, fonksiyonel ve dinamik değişimlerin tespit edilmesi, lipit çeşitlerinin ve dağılımlarının tayin edilmesi ile obeziteye bağlı görülen beyaz ve kahverengi adipoz dokulardaki değişimler ve bu değişime bağlı olarak beyaz adipoz dokudan salgılanan önemli adipokin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi ve böylelikle kendiliğinden gelişen obezitenin moleküler temellerinin anlaşılmasına ışık tutmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma Şubat 2011 tarihinde başlamış ve Ağustos 2013 tarihinde bitmiştir. Proje BM0901 kodlu "SYSGENET" COST Aksiyonunun Milli projesi olarak TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından 303.670,00TL olarak desteklenmiştir (SBAG BM0901-40 (110S235)).

Prof. Dr. Feride SEVERCAN

İÇİNDEKİLER

TABLolar	v
ŞEKİLLER	vii
KISALTMALAR	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı	1
1.2. Proje Önerisinde Tanımlanan Çalışma ile Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması	3
2. GENEL LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1. Obezite	5
2.2. Adipoz doku ve insülin direnci	6
2.2.1. Beyaz ve Kahverengi Adipoz doku	9
2.3. Obezite araştırmalarında kullanılan hayvan modelleri	10
2.4. Yapısal çalışmaların obezite araştırmalarındaki önemi	11
2.5. Projede yapısal ve içeriksel çalışmalarda kullanılan Biyofiziksel ve Biyokimyasal Teknikler	12
2.5.1. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve mikrospektroskopisi	12
2.5.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Hayvan modelleri	18
3.2. Hayvan deneyleri	18
3.3. ATR-FTIR spektroskopisi	19
3.3.1. Spektral verilerinin toplanması	19
3.3.2. ATR-FTIR spektroskopik çalışmalarında kullanılan spektrum analiz yöntemleri	20
3.4. ATR-FTIR spektrumlarına uygulanan Kemometrik analiz yöntemleri	21
3.5. ATR-FTIR spektrumlarından protein ikincil yapı tayini	22
3.5.1. Protein ikincil yapılarının FTIR spektrumlarından Yapay Sinir Ağları kullanılarak kestirimi	22
3.5.2. ATR-FTIR İkincil türev spektrumlarından protein ikincil yapı tayini	27
3.6. FTIR mikrospektroskopik çalışmaları	28
3.6.1. FTIR mikroskopisi için örneklerin hazırlanması	28
3.6.2. FTIR Mikrospektroskopi deneyleri	29
3.7. UCP1 İmmunohistolojik Boyama Tekniği	31
3.8. HPLC-ELSD Çalışmaları	32
3.8.1. HPLC Çalışmaları	32
3.8.2. Lipit Ekstraksiyonu	32
3.8.3. HPLC-ELSD Deneyleri	33
3.8.4. HPLC-ELSD Standartların hazırlanması	34
3.8.5. HPLC-ELSD Örneklerin hazırlanması	35
3.9. QRT-PCR Çalışmaları	35
3.9.1. RNA İzolasyon Deneyleri	35
3.9.2. DNaz Muamele Deneyleri	37
3.9.3. cDNA Sentezi Deneyleri	37
3.9.4. RT-PCR ve QRT-PCR Deneyleri	38
3.10. İstatistiksel Analiz	41

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1. Adipoz dokuların spektroskopik incelenmesi	42
4.1.1 ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmaları	42
4.1.2. Protein İkincil Yapı Kestirimi	69
4.1.3. Kemometrik analizler	76
4.2. FTIR mikrospektroskopisi çalışmaları.....	85
4.3. WAT VE BAT DOKU çalışmaları	94
4.3.1. İmmünohistokimyasal boyama çalışmaları.....	94
4.3.2. FTIRM çalışmaları	104
4.4. HPLC Sonuçları	107
4.5. Genetik çalışmalar	125
4.5.1. BFMI fare modelleri adipoz dokularında gen ifadelerindeki değişimler.....	125
4.5.2. Gen İfadesindeki Değişimler (Fold Changes in Expression):	135
4.6. Genel değerlendirme	140
5. SONUÇ	147
KAYNAKÇA	150
EKLER.....	170

TABLolar

Tablo 1. Spektral haritalarda gerçekleştirilen bant alanı hesaplamaları için kullanılan b6lgeler.	30
Tablo 2. Spektral haritalarda g6r6nt6lenen bant alan oranları	31
Tablo 3. HPLC deneylerinde kullanılan mobil fazların akış hızı ve zamana bağlı gradyanları	34
Tablo 4. QRT-PCR deneylerinde kullanılan oligolar ve ampikon uzunlukları.....	38
Tablo 5. QRT-PCR deneylerinde kullanılan genlerin ve internal kontrol geninin reaksiyon karışımları	39
Tablo 6. Beta actin geni için reaksiyon koşulları.....	39
Tablo 7. Tnf- α geni için reaksiyon koşulları	40
Tablo 8. Ppar γ -2 geni için reaksiyon koşulları	40
Tablo 9. Leptin geni için reaksiyon koşulları.....	40
Tablo 10. Igf-1 geni için reaksiyon koşulları	41
Tablo 11. Adipoz dokusu IR spektrumundaki başlıca soğurmalar (Rigas v.d., 1990; Wong v.d., 1991; Takahashi v.d., 1991; Jackson v.d., 1998; Lyman v.d., 1999; Melin v.d., 2000; Cakmak v.d., 2006; Toyran v.d., 2006; Movasaghi v.d., 2008; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010).....	45
Tablo 12. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında g6r6len bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak g6sterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	48
Tablo 13. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında g6r6len bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak g6sterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	49
Tablo 14. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında g6r6len bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak g6sterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	50
Tablo 15. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında g6r6len bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak g6sterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	51
Tablo 16. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında g6r6len bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak g6sterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	56
Tablo 17. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında g6r6len bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak g6sterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	57

Tablo 18. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	58
Tablo 19. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).	59
Tablo 20. Dişi fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi	70
Tablo 21. Erkek fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi.....	71
Tablo 22. Dişi fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi	72
Tablo 23. Erkek fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi.....	73
Tablo 24. Dişi fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi	74
Tablo 25. Erkek fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi.....	75
Tablo 26. Dişi fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi	75
Tablo 27. Erkek fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi.....	75
Tablo 28. Farklı lipit standartların tutulma zamanları	107
Tablo 29. Dişi fare GF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar.	135
Tablo 30. Erkek fare IF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar.	136
Tablo 31. Dişi fare IF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar	136
Tablo 32. Erkek fare IF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar	137

ŞEKİLLER

Şekil 1. Adipoz dokunun genel görünümü (http://histologyolm.stevegallik.org/node/97)	7
Şekil 2. Kahverengi adipoz doku (solda) ve beyaz adipoz doku (sağda) (http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc_topics/brownfat.html)	10
Şekil 3. Çok yansımali ATR sistemi yapısı (<i>Wang v.d., 2007</i>).....	13
Şekil 4. FTIR mikrospektroskopu çalışma prensibi (<i>Gazi v.d., 2006</i>).....	14
Şekil 5. ELS dedektörlerinin çalışma prensibi (http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19182-Optimizing-the-Sensitivity-of-an-Evaporative-Light-Scattering-Detector/).	16
Şekil 6. Atmosferik havanın 4000-650 cm ⁻¹ bölgesindeki ATR-FTIR spektrumu	20
Şekil 7.Yapay Sinir Ağı Modeli	23
Şekil 8. İleri beslemeli bir YSA'da bir katmanın yapısı.....	24
Şekil 9. İkincil yapıları bilinen 18 referens protein spektrumu.....	25
Şekil 10. BFMI860 ırkına ait dişi GF adipoz dokusunun 1700-1600 cm ⁻¹ arası örnek soğurma ve ikincil türev spektrumları.....	28
Şekil 11. Dişi ve erkek fare IF adipoz dokusundan elde edilen RNAların jel fotoğrafı.....	36
Şekil 12. Dişi ve erkek fare GF adipoz dokusundan elde edilen RNAların jel fotoğrafı.....	37
Şekil 13. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFMI860 erkek fare ırkları inguinal adipoz dokularına ait 4000-950 cm ⁻¹ frekans aralığında 3307 cm ⁻¹ 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.	43
Şekil 14. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFMI860 erkek fare ırkları gonadal adipoz dokularına ait 4000-950 cm ⁻¹ frekans aralığında 3307 cm ⁻¹ 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.	44
Şekil 15. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFMI860 erkek fare ırkları gonadal adipoz dokularına ait 3025-2800 cm ⁻¹ frekans aralığında 3307 cm ⁻¹ 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.	46
Şekil 16. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFMI860 erkek fare ırkları gonadal adipoz dokularına ait 1800-950 cm ⁻¹ frekans aralığında 3307 cm ⁻¹ 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.	47
Şekil 17. Olefinik gerilim/toplam lipit bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.	60
Şekil 18. Doymamış/doymuş lipit bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.	61
Şekil 19. Lipit /protein bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.	62

Şekil 20. CH2 antisimetrik gerilim /CH3 antisimetrik gerilim bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.	63
Şekil 21. CH2 antisimetrik gerilim / toplam lipit bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.	64
Şekil 22. Amid I / Amid II bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.	65
Şekil 23. Amid II / 1345 cm ⁻¹ bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.	66
Şekil 24. Dişi GF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.	70
Şekil 25. Erkek GF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.	71
Şekil 26. Dişi IF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.	72
Şekil 27. Erkek IF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.	73
Şekil 28. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) dişi bireylere ait gonadal adipoz doku kümeleme analizi sonucu.	76
Şekil 29. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) erkek bireylere ait gonadal adipoz doku kümeleme analizi sonucu.	77
Şekil 30. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) dişi bireylere ait inguinal adipoz doku kümeleme analizi sonucu.	77
Şekil 31. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) erkek bireylere ait inguinal adipoz doku kümeleme analizi sonucu.	78
Şekil 32. Obez (BFMI) dişi bireylere ait gonadal adipoz doku kümeleme analizi sonucu.	78
Şekil 33. Obez (BFMI) erkek bireylere ait gonadal adipoz doku kümeleme analiz sonucu.	79
Şekil 34. Obez (BFMI) dişi bireylere ait inguinal adipoz doku kümeleme analiz sonucu.	79
Şekil 35. Obez (BFMI) erkek bireylere ait inguinal adipoz doku kümeleme analiz sonucu.	80
Şekil 36. Dişi GF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.	81
Şekil 37. Dişi IF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.	81
Şekil 38. Erkek GF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.	82

Şekil 39. Erkek IF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.	82
Şekil 40. Dişi GF BFMI 852/856 ırkları ile BFMI 860/861 ırklarının PCA metodu ile ayrışması.	83
Şekil 41. Dişi IF BFMI 852/856 ırkları ile BFMI 860/861 ırklarının PCA metodu ile ayrışması	83
Şekil 42. Erkek GF BFMI 852/856 ırkları ile BFMI 860/861 ırklarının PCA metodu ile ayrışması.	84
Şekil 43. Erkek IF BFMI 852/856 ırkları ile BFMI 860/861 ırklarının PCA metodu ile ayrışması.	84
Şekil 44. Örnek bir kontrol (DBAJ) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş kesit görüntüsü (A), kırmızı ile işaretlenmiş bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B), ve elde edilen spektral haritadan çıkarılan örnek bir adipoz doku spektrumu (C) görülmektedir.	85
Şekil 45. Örnek bir kontrol (DBAJ) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (A.1), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (A.2), Örnek bir obez (BFMI) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (B.1), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B.2) görülmektedir.	86
Şekil 46. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki lipit/protein bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar	89
Şekil 47. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı/CH ₃ antisimetrik gerilim bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.	90
Şekil 48. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki olefinik bant alanı/ CH ₂ antisimetrik bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.	91
Şekil 49. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki karbohidrat/protein bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.	92
Şekil 50. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki karbonil grubu /CH toplam alan bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.	93
Şekil 51. Kontrol (DBAJ) grubu fareden alınmış adipoz dokuya ait mikroskop görüntüsü (40X)	95
Şekil 52. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskobunda çekilmiş 20X'lik görüntüler.	95
Şekil 53. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskobunda çekilmiş 40X'lik görüntüler.	95
Şekil 54. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskobunda çekilmiş 20X'lik görüntüler.	96
Şekil 55. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskobunda çekilmiş 40X'lik görüntüler.	96

Şekil 56. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntüler.....	97
Şekil 57. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntüler.....	97
Şekil 58. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntüler.....	98
Şekil 59. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntüler.....	98
Şekil 60. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal adipoz dokuların ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntülerinde dişi ve erkek bireylerin karşılaştırılması	100
Şekil 61. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal adipoz dokuların ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntülerinde dişi ve erkek bireylerin karşılaştırılması	101
Şekil 62. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait inguinal adipoz dokuların ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntülerinde dişi ve erkek bireylerin karşılaştırılması	102
Şekil 63. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait inguinal adipoz dokuların ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntülerinde dişi ve erkek bireylerin karşılaştırılması	103
Şekil 64. Kontrol (DBAJ) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskopunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda).....	104
Şekil 65. Obez (BFMI) erkek bireyden alınan gonadal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskopunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.....	104
Şekil 66. Obez (BFMI) dişi bireyden alınan gonadal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskopunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.....	105
Şekil 67. Obez (BFMI) erkek bireyden alınan inguinal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskopunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.....	105
Şekil 68. Obez (BFMI) dişi bireyden alınan inguinal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskopunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.....	106
Şekil 69. TG ve diğer lipidlerin temsili kromatogram sonucu.....	108
Şekil 70. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 852 Dişi, Inguinal.....	109
Şekil 71. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 852 Erkek, Inguinal.....	109
Şekil 72. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 856 Dişi, Inguinal.....	110
Şekil 73. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 856 Erkek, Inguinal.....	110

Şekil 74. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 860 Dişi, Inguinal.....	111
Şekil 75. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 860 Erkek, Inguinal.....	111
Şekil 76. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 861 Dişi, Inguinal.....	112
Şekil 77. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 861 Erkek, Inguinal.....	112
Şekil 78. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 852 Erkek, Gonadal.....	113
Şekil 79. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 852 Erkek, Inguinal.....	113
Şekil 80. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 856 Erkek, Gonadal.....	114
Şekil 81. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 856 Erkek, Inguinal.....	114
Şekil 82. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 860 Erkek, Gonadal.....	115
Şekil 83. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 860 Erkek, Inguinal.....	115
Şekil 84. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 861 Erkek, Gonadal.....	116
Şekil 85. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 861 Erkek, Inguinal.....	116
Şekil 86. BFMI ırkları arasındaki TG (mg/ml) konsantrasyonları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.).....	118
Şekil 87. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki TG (mg/ml) konsantrasyon farklılıkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.).....	118
Şekil 88. BFMI ırkları arasındaki kolesterol (mg/ml) farklılıkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.).....	119
Şekil 89. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki kolesterol (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.).....	120
Şekil 90. BFMI ırkları arasındaki DG (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.).....	121
Şekil 91. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki DG (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.).....	121

Şekil 92. BFMI ırkları arasındaki MG (mg/ml) farkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.)	122
Şekil 93. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki MG (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.).....	123
Şekil 94. BFMI ırkları arasındaki PC (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, § ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.).....	124
Şekil 95. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki PC (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.)	124
Şekil 96. Beta actin geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi.....	126
Şekil 97. Beta actin geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 0.90 ve R ² ise 0,99 olarak hesaplandı	126
Şekil 98. Beta actin geninin melt A.Green erime grafiği	127
Şekil 99. Tnf-α geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi	127
Şekil 100. Tnf-α geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 0.84 ve R ² ise 0,99 olarak hesaplandı.	128
Şekil 101. Tnf-α geninin melt A.Green erime grafiği.	128
Şekil 102. Pparγ-2 geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi.....	129
Şekil 103. Pparγ-2 geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 0.99 ve R ² ise 0,99 olarak hesaplandı.	129
Şekil 104. Pparγ-2 geninin melt A.Green erime grafiği.....	130
Şekil 105. Leptin geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi	130
Şekil 106. Leptin geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 1.09 ve R ² ise 0,99 olarak hesaplandı.	131
Şekil 107. Leptin geninin melt A.Green erime grafiği.....	131
Şekil 108. Igf-1 geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi	132
Şekil 109. Igf-1 geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 1.06 ve R ² ise 0,99 olarak hesaplandı.	132
Şekil 110. Igf-1 geninin melt A.Green erime grafiği.....	133
Şekil 111. Il-6 geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi	133
Şekil 112. Il-6 geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 1.05 ve R ² ise 0,99 olarak hesaplandı.	134
Şekil 113. Il-6 geninin melt A.Green erime grafiği	134

KISALTMALAR

FTIR	Fourier dönüşüm kızılötesi
FTIRM	Fourier dönüşüm kızılötesi mikroskopisi
ATR	Attenuated total reflectance
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ELSD	Evaporatif Işık Saçılım Dedektörü
PCA	Temel bileşen analizi
YSA	Yapay sinir ağı
BFMI	Berlin lipit faresi inbred
SBD	Standart beslenme diyeti
NEFA	Esterifiye olmamış yağ asidi
ipITT	İntraperitoneal insülin duyarlılığı testi
UCP1	Uncoupling protein 1
PCR	Polimeraz zincir tepkimesi
RT-PCR	Ters transkriptaz - Polimeraz zincir tepkimesi
QRT-PCR	Kantitatif ters transkriptaz - Polimeraz zincir tepkimesi
WAT	Beyaz adipoz doku
BAT	Kahverengi adipoz doku
GF	Gonadal adipoz doku
IF	İnguinal adipoz doku
TNF α	Tümör nekroz faktörü α
IGF 1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
Ppar γ 2	Peroksizom çoğaltıcısı ile uyarılan reseptörler γ 2
IL 6	İnterlökin 6
NEFA	Esterifiye olmayan yağ asitleri
TG	Trigliserit
DG	Digliserit
MG	Monogliserit
PC	Fosfatidilkolin
FFA	Serbest yağ asiti
ER	Endoplazmik retikulum
ROS	Reaktif oksijen türleri

ÖZET

Obezitenin doku, hücre ve membran moleküllerinin yapısal ve fonksiyonel bozukluklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışma, obeziteye bağlı inguinal (IF) ve gonadal adipoz (GF) doku moleküllerinde yapısal ve içeriksel anlamda meydana gelen değişimleri incelemeyi ve böylece BFMI fare ırklarını karakterize ederek kendiliğinden oluşan obeziteyi daha iyi anlamayı amaçlamıştır. Bu amaç doğrultusunda, Azaltılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüşüm infrared (ATR-FTIR) spektroskopi ve FTIR mikrospektroskopi (FTIRM) teknikleri kullanılarak BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 (BFMI) ve kontrol (DBAJ) farelerinin IF ve GF dokularındaki moleküllerin yapı ve içeriği karakterize edilmiştir. Adipoz dokularda, özellikle IF dokusunda doymamış lipit oranı BFMI860 ve 861 ırklarında en düşük bulunmuştur; bu parametre lipit peroksidasyonun varlığını göstermektedir. En yüksek lipit/protein oranı da bu ırklarda elde edilmiştir. Spektral değişimleri baz alarak kemometrik metodlarla bu ırklar kontrol (DBAJ) ve BMFI 852 ve 856 dan başarı ile ayrılmıştır. HPLC tekniği ile BFMI 860 ve 861 ırklarının diğer BFMI ırklarına göre daha fazla lipit, özellikle trigliserit, kolesterol ve monogliserit içerdiğini göstermiştir. Adipoz doku proteinlerinde ikincil yapıdaki değişimler araştırılmış ve BMFI ırklarında, en belirgin olarak da 860 ırkında, protein bozunmasına karşılık gelen düzensiz halka miktarında artış bulunmuştur.

Histokimyasal ve FTIRM çalışmaları BFMI ırklarda kontrole göre kahverengi adipoz doku (BAT) oranının azaldığı ve yerini beyaz adipoz doku (WAT) ya bıraktığını göstermiştir. GF'de BAT miktarı IF'e oranla daha fazla gözlenirken, IF'de ise yoğun olarak WAT'a rastlanmıştır. Erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir. Genel olarak BFMI860 ve BFMI861 ırklarına ait GF ve IF dokularda daha fazla WAT olduğu ve çok az miktarda BAT olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, BFMI861 ırkında leptin direncinin en fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, kendiliğinden gelişen obeziteye model oluşturan inbred fare ırklarından BFMI860 ve BFMI861 farelerinin obezite çalışmalarına daha uygun oldukları belirlenmiştir.

Sonuç olarak, adipoz dokuda obeziteden kaynaklanan etkinin cinsiyete, adipoz doku tipine ve ırklarda görülen farklılıklara bağlı olarak değiştiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Obezite, Adipoz Doku , Inguinal, Gonadal, BFMI, WAT, BAT, FTIR, HPLC, UCP1, Leptin

ABSTRACT

Obesity is thought to be a result of the structural and functional disorders related to the molecules of the tissues, cells and membranes. Therefore, this research aims to study the structural and compositional changes in inguinal (IF) and gonadal (GF) adipose tissues on the molecular level and thus, to try to understand the spontaneous obesity better by characterizing BFMI mouse lines. To accomplish this, the tissues of BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 obese and DBAJ control mouse lines were characterized by Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) and FTIR Microspectroscopy (FTIRM). It was found that especially in the IF tissues the unsaturated lipid ratio is lowest in BFMI860 and 861, indicating lipid peroxidation presence. The highest lipid/protein ratio is also in the same tissues. Using the spectral profile changes and with the help of chemometric methods, these two tissues were successfully differentiated from the Control, BMFI 852 and 856. The HPLC results showed that BFMI860 and BFMI862 had the highest lipid content, especially Triglyceride, Cholesterol and Monoglyceride. Protein secondary structure studies showed the increase in random coil in BFMI lines, especially in BFMI860, indicating increase in protein denaturation.

According to histochemical and FTIRM studies, BFMI lines have lower brown (BAT) and higher white (WAT) adipose tissue levels with respect to Control. GF tissues have higher BAT compared to IF tissues, and consequently the IFs have higher WAT. Male tissues have higher BAT than females. In general BFMI860 and BFMI861 tissues have higher WAT and lower BAT. Additionally, BFMI861 was found to have the highest leptin resistance. According to these results, among the spontaneous obesity mouse lines, BFMI860 and BFMI861 lines are most suitable for obesity studies.

As a summary, obesity-induced effect on the adipose tissues vary considerably with adipose tissue type, gender and the animal line.

Keywords: Obesity, Adipose tissue, Inguinal, Gonadal, BFMI, WAT, BAT, FTIR, HPLC, UCP1, Leptin

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Amacı

Literatürde obezitenin genetik temelini araştıran çalışmalarda, obezite ile bağlantısı olduğu düşünülen gen ya da genler, hayvan modellerinde nakavt (knock-out) yapılarak çalışılmış; bu çalışmalarda söz konusu genlerin bazı serum parametreleri üzerindeki etkileri ile, vücutta insülin direncinde rol oynayan ve adipoz dokuda üretilen adipokinler incelenmiş ve bu kapsamda çalışılan genlerle insülin direnci oluşumu arasındaki ilişki çözülmeye çalışılmıştır (**Tschöp ve Heiman, 2002**). Fakat obeziteye bağlı yağ doku biyomoleküllerinde (lipit, protein, karbonhidrat ve nükleik asit) miktar, yapı ve fonksiyonel açıdan meydana gelebilecek değişimler ile makromoleküller etkileşimleri henüz tam olarak açıklanamamıştır. Makromoleküllerin miktar, içerik, yapı ve fonksiyonlarındaki değişimlerin hücrenin normal işleyişi ile yakın ilişkili olduğu son yıllarda artan kanıtlarla gösterilmiştir. Örneğin, trigliseritlerin adipoz dokuda depolanmaları ve parçalanarak mobilize edilmelerinde, yapıları içerisinde bulunan yağ asitlerinin zincir uzunlukları ve doymamışlık miktarlarının önem taşıdığı bilinmektedir (**Raclot, 1997; Raclot ve Ourdard, 2000**). Protein yapılarındaki ve buna bağlı olarak da fonksiyonlarındaki değişimler, yalnızca gen ekspresyonundaki veya protein sentezindeki farklılaşmalara bağlı değildir. Ekspresyon değişikliği olmadan da var olan proteinlerin yalnızca ikincil yapılarının değişmesi de proteinlerde fonksiyon bozulmalarına yol açabilmektedir. Bu nedenle, obezitede oluşan işlevsel bozuklukları anlayabilmek için moleküler etkileşimlere bağlı olarak dokularda proteinlerin ve lipitlerin yapısal değişimlerini saptamak, karmaşık nedenler sonucu oluşan obezitenin mekanizmasının anlaşılabilmesi açısından çok önemlidir.

Bu amaçla bu proje çalışmasında, katıldığımız COST-SYSGENET (European systems genetics network for the study of complex genetic human diseases using mouse genetic reference populations) katılımcıları arasında yer alan Berlin Humboldt üniversitesinde işbirliği yaptığımız grup tarafından yetiştirilen dişi ve erkek inbred Berlin obez fare (BFMI) ırklarının yağ dokuları incelenmiştir. Bu hayvan modelleri genetik yapıları bakımından kompleks farelerdir. Bu farelerin, genomlarında delesyon ya da nakavt mutasyonları yapılmadığı için, spontan obez fenotipi gösterme nedeni, adipoz doku miktarlarının artış sebebi ve adipoz dokusundaki yapısal değişiklikler tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle bu farelerde obez fenotipin oluşmasında etkili olan faktörler henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Obezitenin mekanizmasında henüz tam olarak açığa çıkmamış yapısal, fonksiyonel ve içeriksel faktörlerin açıklanmasına katkıda bulunmak amacıyla önerilen projemizde, standart diyet ile beslenmiş BFMI852, BFMI856, BFMI860 ve BFMI861 olmak üzere 4 farklı obez ırk ve kontrol olarak DBAJ farelerinin deri altı yağ dokuları olan (inguinal) ve iç organlara ait yağ dokularında olan (gonadal) adipoz dokuları hem erkek hem de dişi farelerde çalışılmıştır. DBAJ fare ırkı ticari olarak elde edilebilen ve örneklerimizin mutasyona uğramamış (wildtype) özelliklerini gösteren bir fenotip inbred ırk olup genellikle kontrol hat olarak kullanılmaktadır.

Projede

1. Yağ dokularında obeziteye ve cinsiyete bağlı olarak oluşan yapısal, fonksiyonel ve içeriksel farklılıklar FTIR spektroskopi ve görüntüleme yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu kapsamda,

- makromolekülerin dağılımlarının ve birbirlerine göre miktar oranlarındaki (protein/lipit, nükleik asit/protein, karbonhidrat/lipit, doymamış lipit/doymuş lipit, v.b.) değişimler saptanmış,
- doymuş ve doymamış lipitlerin yapısı ve dinamiğinde meydana gelen değişimler belirlenmiş,
- biyoinformatik metotlar kullanılarak proteinlerin ikincil yapılarındaki değişimler ortaya konulmuş,
- Kemometrik analiz metodları ile söz konusu biyomoleküler içerik ve yapısal değişimlere dayalı fare ırkları arasındaki fenotipik farklılıklar karakterize edilmiştir.

Bu çalışmalara ilaveten

2. Beyaz adipoz doku (WAT) ve kahverengi adipoz dokuların (BAT) miktarlarındaki değişim UCP1 boyama tekniği ile incelenmesi ve böylelikle, adipoz dokuda gerçekleşen transdiferansiyasyon oranı hakkında bilgi edinilmesi, ve ayrıca histokimyasal sonuçları karşılaştırmak üzere BAT ve WAT dokularındaki değişimlerin FTIR görüntüleme tekniği ile desteklenmesi.
3. Obezite oluşumunda lipitlerin rolü hakkında daha detaylı bilgi almak amacıyla obez ve kontrol fare gruplarında, HPLC tekniği ile iki farklı adipoz dokusundaki lipit çeşitleri ve her bir lipit cinsinin miktarlarındaki değişimler belirlenmesi.
Amaçlarımız arasındadır. Bu çalışmalara ilaveten.
4. Obezite oluşumunda etkili olduğu ve adipojenik etki gösterdiği düşünülen PPAR γ 2 geninin, insüline benzer büyüme faktörü 1'in (IGF-1) ve anti-adipojenik etkileri olduğu düşünülen interlökin 6 (IL-6), leptin, tümör nekroz faktörü α 'nın (TNF α) inguinal ve

gonodal yağ dokularındaki mRNA ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Böylelikle, genotipi bilinmeyen BFMI fareleri yağ dokularında bu gen ve adipokinlerin miktarlarında olan değişimler tespit edilerek bu değişimlerin yağ doku transdiferansiyasyonundaki etkileri, dolayısı ile obezite oluşumundaki rolleri gösterilmiştir.

Ayrıca projede incelenen farelerde, obezite gelişimi sırasında izlenmesi gereken glikoz ile lipit metabolizması, insülin direnci ve toleransı üzerinde oluşan değişiklikler, hayvan modellerini yetiştiren Humboldt Üniversitesi grubu tarafından ölçülmüş ve bu sonuçlar, projede elde edilen verilerin yorumlanmasında kullanılmıştır.

Tüm bu parametrelerin incelenmesi ile makromoleküler etkileşmelerdeki farklılıkların ortaya çıkarılması, ve böylelikle obezitenin oluşum mekanizmalarının açıklanmasına katkıda bulunulmuştur.

1.2. Proje Önerisinde Tanımlanan Çalışma ile Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması

Proje önerisinde incelenen ırklar COST Aksiyonunda ortaklaşa çalıştığımız Alman grubu tarafından, dişi ve erkek kontrol inbred ırkı (DBAJ), dişi ve erkek 4 Berlin lipit inbred fare ırkı (BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861) olarak belirlenmiştir. Bu proje çalışmasında proje önerisinde belirtilen dokular, proje kapsamında önerildiği şekilde kapsamlı olarak incelenmiş ve obezite çalışmalarında kullanılacak en uygun fare ırkları açığa çıkarılmıştır. Belirtilen bu ırklardan alınan örnekler ATR-FTIR spektroskopisi ve mikroskopisi ile detaylı çalışılmış, doymuş ve doymamış lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerin miktarları ile , lipit dinamiği, lipit ve protein yapısındaki değişimler çalışılan obez ırklara ve cinsiyete bağlı olarak araştırılmış, WAT ve BAT miktarlarındaki değişim hem UCP1 immunohistolojik boyama tekniğiyle hem de FTIR görüntüleme tekniği ile incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. FTIR spektroskopisinden elde edilen global lipit değişimine ilaveten daha detaylı lipit içeriği değişimleri HPLC tekniği ile belirlenmiştir. Ayrıca projede önerildiği şekilde obezite oluşumunda etkili olduğu düşünülen PPAR γ 2 geninin, interlökin 6 (IL-6), leptin, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve insüline benzer büyüme faktörü 1 (IGF-1) adipokinlerinin inguinal ve gonadal yağ dokularındaki mRNA ekspresyon seviyeleri qPCR tekniği ile ölçülmüştür. Glikoz ve lipit metabolizması, insülin direnci ve toleransı gibi biyokimyasal testler proje önerisinde belirttiğimiz şekilde COST aksiyonu SYSGENT çalışma grubunda işbirliği yaptığımız hayvan

örneklerini bize sağlayan Humboldt Üniversitesi grubu tarafından ölçölüp değerler bize bildirilmiştir.

2. GENEL LİTERATÜR BİLGİLERİ

Bu kısımda proje konusu ile ilgili olarak önemli literatür örneklerini kapsayacak şekilde genel bilgiler verilmiştir. Gerekli diğer literatürler ise bulgular ve tartışma kısmında yer almaktadır.

2.1. Obezite

Obezite, genetik yatkınlık ya da çevresel faktörlerin etkisi ile enerji alımı ve harcanması arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır ve insülin direnci, hipertansiyon, hiperlipidemi ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi ikincil metabolik sendromların oluşmasına neden olmaktadır. Tüm dünyada yaygınlaşan modern yaşam tarzı ile yüksek miktarda yağ içeriği olan besinlerin tüketilmesi ve fiziksel aktivitenin azalması nedeniyle obezite neredeyse tüm dünyada bir sağlık problemi haline gelmiştir (**Gedik, 2003; Stuart v.d., 2003**). Bu nedenle obezite, son yıllarda tüm yaşam bilimi ve sosyal bilimler alanlarında yoğun olarak çalışılan önemli bir araştırma konusudur. Obezite, özellikle yüksek miktarda yağ içeren besinlerin tüketilmesi ile fiziksel aktivitenin azalması dolayısı ile alınan ve harcanan enerji arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanır. Vücut homeostazının bozulması sonucunda vücut yağ kitlesi artmakta, özellikle abdominal bölgede toplanan yağ dokusu, insülin direnci ve karbonhidrat metabolizması bozukluğunu ortaya çıkaran nedenler arasında önemli bir rol oynamaktadır. Vücutta değişen enerji metabolizması ve yağ dengesi sonucu oluşan obezite başka metabolik rahatsızlıkların oluşmasına neden olmaktadır. Bu rahatsızlıklar arasında, dislipidemi, kardiyovasküler problemler ve hipertansiyon gibi değişik klinik bozukluklar obezitenin yakın ilişki içerisinde bulunduğu en temel metabolik hastalıklardır (**Reaven, 1988; Goodpaster v.d., 2004; Kuhlmann v.d., 2005**).

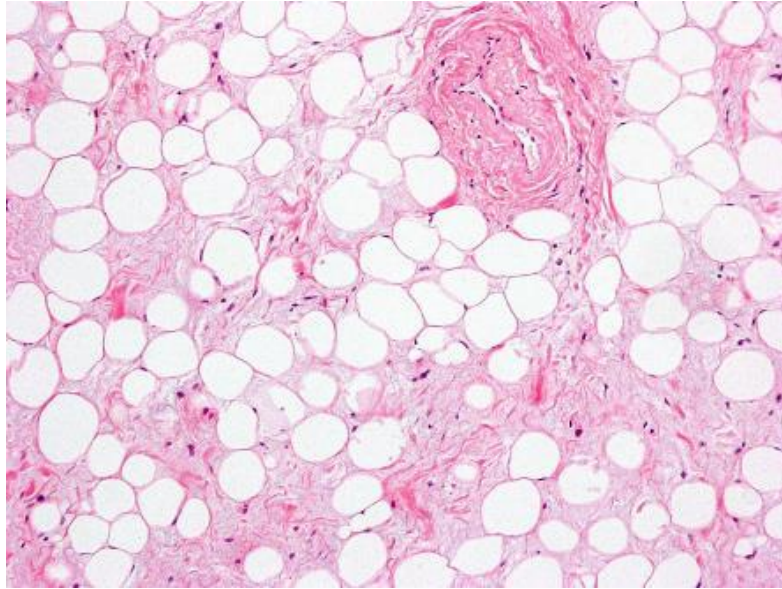
Genel olarak metabolik hastalıklar birbirleriyle ilişki içindedirler ve bu hastalıkları birbirlerinden tamamen ayırmak mümkün değildir. Obezitenin tip 2 diyabet gibi metabolik bozukluklarla paylaştığı ortak özellik, vücutta insülin üretimi olmasına rağmen, üretilen insülinin dokularda etkisini gösterememesidir. İnsülinin, iskelet kası ya da yağ dokusu gibi periferik dokularda etkisini gösterememesi durumuna insülin direnci adı verilir (**Gerich, 2003**). Metabolik bozuklukların oluşumunda önemli rol oynayan insülin direnci oluşum mekanizması hakkında değişik öneriler olduğu halde, kesin olarak mekanizması henüz açıklanabilmiş değildir (**Kahn ve Flier, 2000; Han v.d., 2004**). Bu öneriler arasında, reseptörlerin insüline duyarlıklarının azalması, insülin reseptör sayısında azalma olması, hiperglisemi varlığı, insülin sinyal yolağındaki proteinlerin işlevlerini kaybetmeleri sayılabilir. Obezite gibi metabolik

hastalıkların patolojilerinin anlaşılabilmesi için tüm vücutta insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanması gerekmektedir (*Furler v.d., 1997; Nguyen v.d., 2006*). Obezite ve insülin direnci arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için pek çok çalışma yürütülmüştür (*EI-Haschimi v.d., 2000; Stepan v.d., 2001; Xu v.d., 2003*). Yapılan çalışmalarda, insülin sinyal yolağını inhibe ederek insülinin hücrede etkisini göstermesini önleyen tümör nekroz faktörü α (TNF- α) gibi bazı sitokinlerin, obezitede adipoz dokusu ve makrofaj gibi immün sistem elemanlarından yüksek miktarda salgılandıkları tespit edilmiştir (*Hotamışlıgil v.d., 1996; Hotamışlıgil v.d., 1993; Sethi ve Hotamışlıgil, 1999; Aguirre, 2000*). Bunun yanı sıra, plazma lipit ve yağ asidi oranının da obezitede arttığı ve hücre içerisinde depolanan yağ asitlerinin de insülin yolağı üzerine olumsuz etkileri olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (*Kanety v.d., 1996; Schulman, 2000*). Bu yağ asitleri ve sitokinlerin, insülin reseptörüne bağlanan proteinleri (IRS) serin aminoasitlerinden fosforlayarak inhibe etmek suretiyle insülin sinyal yolağını olumsuz etkiledikleri ve obezitede görülen insülin direnci oluşum mekanizmasına katkıda buldukları düşünülmektedir (*Wellen ve Hotamışlıgil, 2005*). Bununla beraber, obezitede görülen artmış sitokin salgılanması, obeziteye kronik bir enflamasyon durumunun eşlik ettiğini göstermektedir (*Hotamışlıgil, 2003*). Obezitedeki insülin direnci oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülen bir diğer mekanizma ise hücre içine alınan yağ asitlerinin miktarlarının artmasıyla birlikte mitokondri işlevlerindeki artan gereksinim nedeni ile reaktif oksijen türlerinin yoğun olarak üretilmesidir. Reaktif oksijen türlerindeki artış da immün sistemi ve sitokin üretimini tetikleyerek insülin yolağı üzerine olumsuz etki yapmaktadır (*Furukawa v.d., 2004; Lin v.d., 2005*). Bu etkinin yanı sıra, üretilen bu reaktif oksijen türleri dokulardaki makromoleküller üzerinde zararlı etkiler oluşturabilmektedir (*Severcan v.d., 2005a*).

2.2. Adipoz doku ve insülin direnci

Adipoz dokusu adipositlerden meydana gelmiştir ve normal ağırlıktaki insanlarda, erkeklerde vücut ağırlığının %10-12, kadınlarda ise %15-20'sini oluşturur. Bu dokunun yaklaşık %80'i deri altındadır ve %20'si ise iç organların etrafında bulunur; beyaz ve kahverengi olmak üzere iki çeşidi vardır (*Ivkovic, 2003*). Adipoz dokunun genel görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir. Adipoz doku genel olarak triaçilgliserollerden oluşmuştur ve bu yüzden enerji deposu olarak tanımlanmaktadır. Bunun yanında, yağda eriyen vitaminlerin depolanması, fiziksel koruma ve termoregülasyon adipoz dokunun görevlerindedir (*Früchbek, 2008*). Adipoz doku içerisinde lipogenez ve lipoliz için gerekli enzimler de bulunur, böylelikle, adipoz

doku yağ dokusunu regüle etmekte ve besin homeostazında da görev almaktadır. Ayrıca, adipositlerde ve adipoz stromal hücrelerinde oluşturulan ve adipokin adı verilen pek çok enzim, hormon, büyüme faktörleri, sitokin, matriks ve membran proteinlerinin otokrin, parakrin ve endokrin olmak üzere hem lokal hem de sistemik etkileri olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (**Pinnick v.d., 2008; Ros, 2007; Mohamed-Ali v.d., 1998; Frühbek, 2008**). Adipoz doku, salgıladığı bu biyoaktif medyatörler sayesinde homeostaz, kan basıncı, lipit ve glikoz metabolizması ve enflamasyonda da görev aldığı için son zamanlarda bir endokrin organ olarak tanımlanmaktadır (**Rabe v.d., 2008**). Ayrıca bu adipokinler, insülin direnci ve obezite ile de yakın ilişki içindedir. Bunlardan bazıları; adiponektin, leptin, insülin benzeri büyüme hormonu (IGF-1), tümör nekroz faktör α (TNF- α) dır. Adiponektin, insülin duyarlılığının ayarlanmasından ve serbest yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumludur. Bu adipokinler içinde yer alan IGF-1, lipoliz inhibisyonu, glikoz transport ve oksidasyonun stimüle edilmesinde IL-6 lipoliz indüksiyonunda; leptin, lipoliz stimülasyonu ve otokrin leptin ekspresyonu regülasyonunda ve TNF- α ise lipoliz stimülasyonu, leptin salgılanması regülasyonunda, adiposit diferensiyasyonunun inhibisyonunda ve insülin direncinin oluşmasında görevlidir (**Kahn v.d., 2006; Fantuzzi, 2005; Nawrocki v.d., 2005; Berg v.d., 2005; Bell v.d., 2005; Trayhum, 2005; Trayhum ve Wood, 2004; Blake ve Ridker, 2002; Marette, 2002; Murdolo ve Smith, 2006; Frühbek, 2006**). Bu konuda en yeni bilgiler tüm referansları ile birlikte 2013 yılında yayınlanan bir derleme makalenin içinde yer almaktadır (**Musso v.d. 2013**).



Şekil 1. Adipoz dokunun genel görünümü (<http://histologyolm.stevegallik.org/node/97>)

İnsulin direnci, insülinin iskelet kası ve adipoz dokusu gibi periferik dokularda görevini yerine getirememesidir. İnsülin direnci, obezite ve tip 2 diyabet rahatsızlıklarının patofizyolojik özelliklerinden biridir (**Kahn Ve Flier, 2000; Han v.d., 2004**). Obezite ve insulin direnci arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için pek çok çalışma yürütülmüş ve değişik mekanizmalar önerilmiş olmasına rağmen, bütün vücuttaki insülin direncinin oluşumunun nedeni kesin olarak belirlenememiştir (**El-Haschimi v.d., 2000; Steppan v.d., 2001; Xu v.d., 2004; Qiu v.d., 2005**). Yapılan çalışmalarda, TNF- α gibi bazı sitokinlerin, insülin sinyal yolağını inhibe ederek, insülinin hücrede etkisini göstermesini önlediği gösterilmiş ve bu sitokinlerin, obezitede adipoz doku ve makrofaj gibi immün sistem elemanlarından yüksek miktarda salgılandıkları tespit edilmiştir (**Hotamışlıgil v.d., 1993; Hotamışlıgil v.d., 1996; Sethi ve Hotamışlıgil, 1999; Aguirre 2000**). Dolayısıyla, obezitede görülen artmış sitokin salgılanması, obeziteye kronik bir enflamasyon durumunun eşlik ettiğini göstermektedir (**Hotamışlıgil, 2003**). Adipozit fonksiyon bozukluğu fazla besin alınması yüzünden oluşur ve normalden fazla besin alınması, adipoz dokuda fazla lipit birikmesine ve endoplazmik retikulum (ER) aktivitesinin artmasına sebep olur. Bu aktivite artışı ER'ın yeni oluşan proteinleri katlama kapasitesini bozar. ER stresi, fazla miktarda serbest yağ asiti (FFA) olduğunda, mitokondride oksidatif strese yol açabilir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir, ayrıca FFA'lar, TNF- α yapımını stimüle ederek JNK aktivasyonuna sebep olur ve bu da hücreSEL insülin direncine katkıda bulunur (**Ferranti, 2008**). Ayrıca, ER stresi pankreatik beta hücrelerinin apoptozuna da sebep olur ve dolaşımda artan esterifiye olmayan yağ asitleri (NEFA) nedeniyle oluşan lipotoksitenin de buna etkisi büyüktür (**Busch v.d., 2005**).

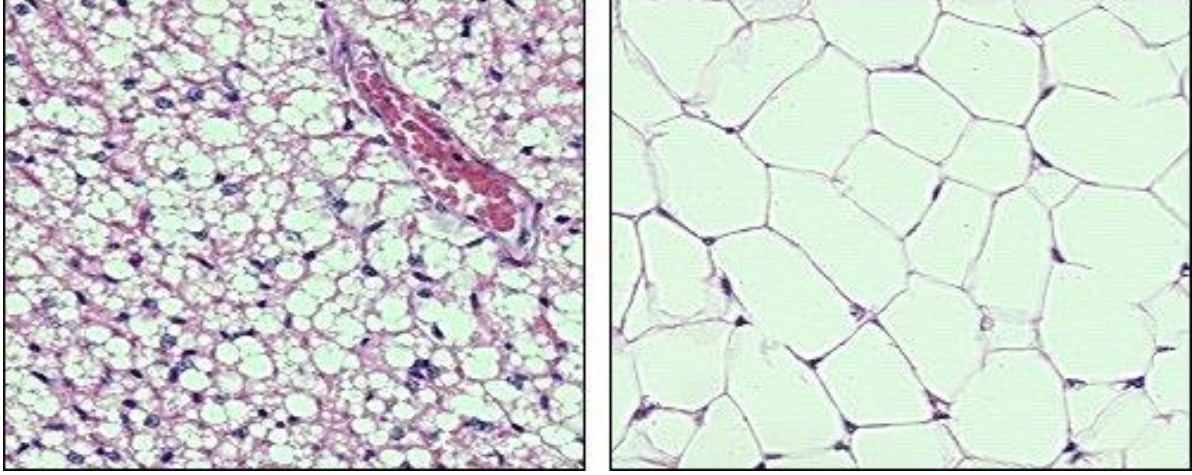
Obezitede plazma TG ve NEFA miktarında görülen artışın insulin direnci oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada da, obez ve obez olmayan deney gruplarında, plazma FFA seviyesine bakılmış ve FFA seviyesinin obezitede yükseldiği saptanmıştır. FFA'nın, glikoz taşınması ve/veya fosforilasyonu seviyesinde, insülinle stimüle edilmiş glikoz alımı, glikojen sentezi ve glikoz oksidasyonunu engellediği bulunmuştur, böylelikle serbest yağ asitlerinin, obezitede, insülin direncinin patogenezeine sebep olan önemli katkısı gösterilmiştir (**Boden, 2001**).

Adipoz dokuda lipit birikimi, sirküle eden FFA alımına bağlıdır (**Zechner v.d., 2009**). Bu FFA'lar, silomikronlarda (gıdaların sindirilip barsaklardan emilmesini takiben kan serumunda görülen yağ zerreciklerinden her biri) bulunan TG'lerin enzimatik olarak lipoprotein lipazları tarafından yıkımıyla üretilir. FFA'lar adipoz dokusuna girdikten sonra re-esterifikasyon ile tekrar TG formuna dönüştürülüp burada depolanır (**Vela, 2008**).

2.2.1. Beyaz ve Kahverengi Adipoz doku

Adipoz doku içerisinde beyaz (WAT) ve kahverengi (BAT) olmak üzere iki farklı doku çeşidi bulunmaktadır. Memelilerde, beyaz ve kahverengi adipozitler multi-depo organı olan adipoz dokusunda depolanır. Bu doku iki ana anterior ve posterior subkütan (deri altı) depodan ve visceral (iç organlara ait) depolardan meydana gelir (**Cinti, 1999**). Beyaz ve kahverengi adipozitlerin miktarları ırk, yaş, cinsiyet, çevresel ve besinsel koşullara göre değişiklik gösterir. Beyaz adipozitler, kahverengi adipozitlere göre daha büyüktür, fakat ikisi de farklı miktarlarda lipitlerden oluşmuştur. Bu lipitler WAT'da tek damlacık şeklinde, BAT'da ise birden çok damlacık şeklinde bulunmaktadır (**Cinti, 2006**). Kahverengi ve beyaz dokunun genel görüntüsü Şekil 2'de verilmiştir. BAT dokusunun kahverengi rengi, içerdiği çok sayıda kan damarları ve mitokondrilerindeki renkli sitokromlardan kaynaklanır. Uniloküler bir yağ dokusu olan WAT vücudun her tarafına yayılmıştır, fakat multiloküler bir yağ dokusu olan BAT vücudun belli yerlerinde toplanmıştır. WAT'ın en önemli fonksiyonu yüksek enerjili molekülleri depo etmek ve öğün arasında organizmadaki bütün hücrelere yakıt sağlamaktır. Termogenezden sorumlu olan BAT adrenerjik olarak stimüle edilmediği zaman, kahverengi karakteristiklerinin çoğunu kaybederek WAT'a benzer dokulara dönüşür (transdiferansiyasyon). Bu morfolojik dönüşüm de UCP1 geninin inhibisyonu ve leptin geninin aktivasyonu ile meydana gelir (**Cancello v.d., 1998**). Bu transdiferansiyasyon sayesinde, miktarı ve hacmi artan WAT'tan salgılanan IL-6, TNF α ve IGF-1 gibi adipokinlerin ve Ppar γ 2 gen ekspresyonu seviyeleri de değişmektedir. WAT ve bazı immün hücrelerinden yüksek miktarda salgılanan bu sitokinlerin, hem obezitede görülen metabolik bozukluk haline, hem de kronik enflamasyona eşlik ettiği tespit edilmiştir (**Hotamisligil v.d., 1993; Hotamisligil v.d., 1996; Sethi ve Hotamisligil, 2003; Aguirre 2000**). Obezitenin gelişimi, sadece besin alımındaki dengenin bozulmasına değil, beyaz adipoz dokuyla (WAT), kahverengi adipoz dokunun (BAT) arasındaki dengeye de bağlıdır. Organizmanın, enerji ihtiyacını karşılamak için, BAT'ın özelleşmesiyle bu denge değişir (**Gesta v.d., 2007**). WAT miktarının artması, adipozitlerin hiperplazisi (hücrelerin anormal çoğalması) ve hipertrofisine (aşırı büyüme) sebep olur ve bu durum obezitenin oluşması ile ilişkilendirilmektedir (**Rodeheffer v.d., 2008**). WAT birçok faktör salgılayarak organizmanın bütün vücut metabolizmasını etkiler. Bu faktörler içinde en önemlisi leptin hormonudur (**Zhang v.d., 1994**). Leptin, sitokinlere benzer yapıda bir hormon olup, hipotalamustaki reseptörüne bağlanır ve IL-1 vasıtasıyla, insanlarda yemek yeme hissini azaltarak kilo alımını engeller. Kandaki leptin düzeyi yağ dokusu ile doğru orantılıdır (**Özbalcı ve Şahin, 2007**). Ayrıca, düşük dereceli inflamasyon durumu ile insülin direnci oluşumu

arasındaki bağlantıyı sağlayan proinflamatuvar sitokinlerin de WAT'tan salgılandığı gösterilmiştir (**Funaki, 2009**).



Şekil 2. Kahverengi adipoz doku (solda) ve beyaz adipoz doku (sağda) (http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc_topics/brownfat.html)

BAT ise WAT'dan çok daha farklı bir göreve sahiptir, termogenezden sorumludur, besinlerden aldığı enerjiyi ısıya transfer eder (**Klaus v.d., 1991; Cannon v.d., 2004**). Sadece BAT' da ifade edilen önemli bir protein olan uncoupling protein 1 (UCP1), oksidatif metabolizmada kullanılmayan enerjinin ısı enerjisine dönüştürülmesinden sorumludur (**Cannon v.d., 1982**). BAT adrenerjik olarak stimüle edilmediği zaman, kahverengi karakteristiklerinin çoğunu kaybederek ünilocüler hücrelerden oluşan WAT'a benzer dokulara dönüşür.

2.3. Obezite araştırmalarında kullanılan hayvan modelleri

Nissen-Meyer ve arkadaşları (2008) çalışmalarında, hayvan modeli kullanımının, hastalıkların ve ilaçların dokular üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmadaki önemini vurgulamışlardır. Hayvan deneyleri, yaşam biçiminden ve farklı kişisel hastalık karakteristiklerinden kaynaklanan olası değişimleri elememizi sağlamaları açısından hastalık ve/veya ilaç alakalı etkilerin çalışılmasında faydalı modellerdir (**Nissen-Meyer v.d., 2008**). Bugüne kadar obezite ve insülin direncinin oluşmasına sebep olduğu düşünülen genlerin

araştırılması için yapılan çalışmalarda, kendiliğinden obez olan Zucker (fa/fa) sıçanlar (**Phillips v.d., 1996**), leptin eksikliği olan obez (Lepob/Lepob) fareler (**Zhang v.d., 1994**), adiposit diferensiyasyonunda görev alan C/EBP- α transkripsiyon faktörünün nakavt edilmesiyle “CCaat Enhancer Binding Protein – α ” (C/EBP- α) transkripsiyon faktörünün nakavt edilmesiyle Cebpa fare modelleri, (**Lefterova ve Lazar, 2009**), PPAR γ 2 transkripsiyon faktörünün nakavt edilmesiyle oluşturulan Prarg fareleri (**Lefterova ve Lazar, 2009**), Agpat2 nakavt fareleri (**Cortes v.d., 2009**) ve Cav1 nakavt fareleri kullanılmıştır (**Razani v.d., 2001**).

Bu projede ise obezite araştırmalarında çok önemli model organizmalar olan Berlin Fat Mouse Inbred (BFMI) ırklarından, BFMI852, BFMI856, BFMI860 ve BFMI861 kullanılmıştır. Projemiz bünyesinde incelenen fare modelleri uzun bir süreçte yüksek yağ oranlarına (BFMI ırkları) göre seçtikleri için obezite oluşumunda ve gelişim üzerinde rol oynayan yeni genlerin bulunması amacıyla yapılan çalışmalara ışık tutmaktadırlar. Bu fare ırkları, genomlarında delesyon ya da nakavt mutasyonları yapılmadığı ve inbred olarak çiftleştirilme ile nesiller boyu seçilerek yetiştirildikleri için genetik yapıları bakımından kompleks farelerdir (**Wagener v.d., 2006; Meyer v.d., 2009**). Projemizin Alman ortağı olan Prof. Dr. Gudrun Brockmann ve grubu, bu karmaşık genetik yapıya sahip inbred fare modellerinin gösterdikleri obezite fenotipinin altında yatan genetik nedenleri araştırmaktadır. Bu fare modelleri gerek karmaşık genetik yapıları gerekse yüksek yağ içerikli diyetle verdikleri muazzam cevap nedeni ile insanlarda görülen obeziteye benzer bir obezite durumu gösterdikleri için ileride yapılacak obezite araştırmalarında çok önemli model organizmalar olacaklardır.

2.4. Yapısal çalışmaların obezite araştırmalarındaki önemi

Yukarıda da bahsedildiği gibi Literatürde obezitenin genetik temelini araştıran çalışmalarda obezite ile bağlantısı olduğu düşünülen gen ya da genler hayvan modellerinde nakavt yapılarak çalışılmış; bu çalışmalarda bu genlerin bazı serum parametreleri üzerindeki etkileri ile vücutta insülin direncinde rol oynayan ve adipoz dokuda üretilen adipokinler incelenmiş ve bu genlerle insülin direnci oluşumu arasındaki ilişki çözülmeye çalışılmıştır (TSCHÖP ve HEİMAN, 2002). Fakat yağ dokularında biyomoleküllerin (lipit, protein, karbonhidrat ve nükleik asit) miktar, yapı ve fonksiyonlarında meydana gelebilecek obeziteye bağlı değişimler ve moleküller etkileşimleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Biyolojik moleküllerin miktar, içerik, yapı ve fonksiyonlarındaki değişimlerin hücrenin normal işleyişi ile yakın ilişkili olduğu son yıllarda artan kanıtlarla gösterilmektedir. Örneğin, trigliseritlerin adipoz dokuda depolanmaları ve parçalanarak mobilize edilmelerinde, yapıları içerisinde bulunan yağ

asitlerinin zincir uzunlukları ve doymamışlık miktarlarının önem taşıdığı bilinmektedir (**Raclot, 1997; Raclot ve Ourdart, 2000**). Çoğu hastalığın, dokularda moleküllerin ve hücre zarı gibi moleküllerden oluşan toplulukların yapısal ve regülatör değişimleri sonucu oluşan bazı işleyiş bozukluklarından kaynaklandığı bilinmektedir. Bu bozuklukların temelinde, protein yapısal değişimlerine ilaveten, makromoleküllerin konsantrasyon ve dağılımındaki değişimler ile lipit yapı ve dinamiği, ve lipit asimetrisindeki değişimlerin de var olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla önerilmektedir (**Awayda v.d., 2004; Wang VE Zhang, 2005; Yeagle, 2005; Luneva v.d., 2007; Toyran v.d., 2007; Ozek v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011; Bozkurt v.d., 2012; Aksoy v.d., 2012**). Ayrıca, doku proteinlerinin ikincil yapılarında meydana gelen değişimler de çeşitli işleyiş bozukluklarına neden olabilmektedir (**Toyran v.d. 2007; Bozkurt v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011; Bozkurt v.d., 2012**). Adı geçen yapısal ve içeriksel çalışmalarda FTIR spektroskopisi ve mikrospektroskopisinin önemli bir yeri vardır ve ayrıca yapı- fonksiyon ilişkisini aydınlatmada başarı ile kullanılmaktadır (**Severcan ve Haris, 2012**). Daha detaylı lipit içerikleri ise projede HPLC tekniği ile araştırılmıştır.

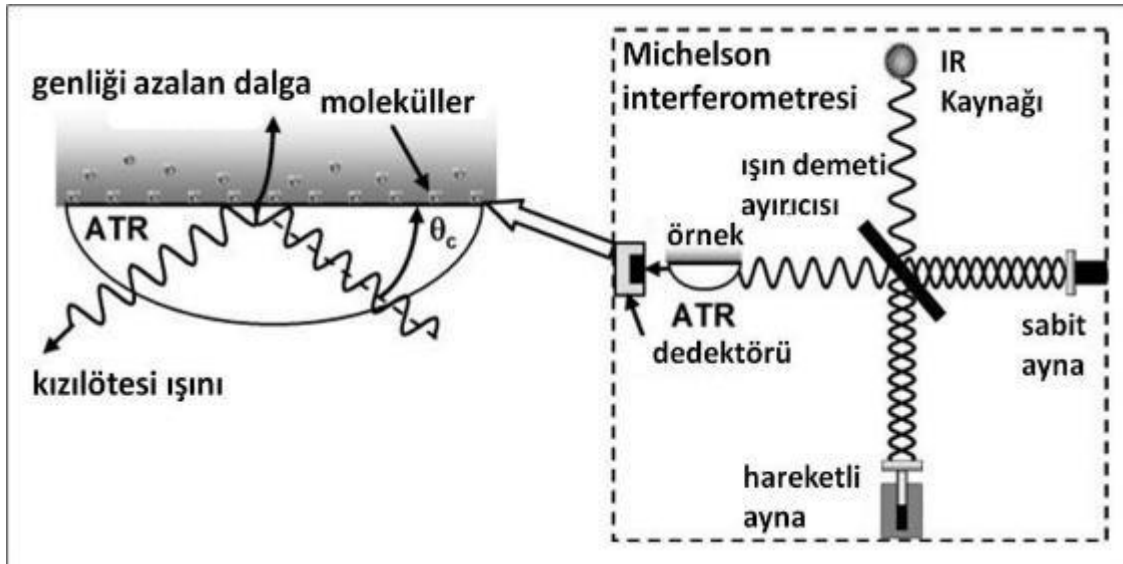
2.5. Projede yapısal ve içeriksel çalışmalarda kullanılan Biyofiziksel ve Biyokimyasal Teknikler

2.5.1. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve mikrospektroskopisi

Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kızılötesi dalga boyunda elektromanyetik ışınla uygulamasıyla moleküllerin titreşimlerini ölçerek değişik titreşim gruplarını görüntüleyen ve böylece moleküllerin mikro çevresi hakkında önemli bilgiler veren hassas bir tekniktir. FTIR spektroskopisinden elde edilen bir spektrum, bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısı ile sistemde mevcut moleküllerin belirlenmesi; bunların konsantrasyonu ile yapı ve fonksiyonu hakkında önemli bilgiler verir. FTIR spektroskopisi ile kullanılan örneğe zarar vermeden biyolojik sistemler hakkında değerli bilgiler elde edilebilir (**Ozek v.d., 2009; Garip v.d., 2009**). Bir bileşiğin titreşim spektrumu o bileşiğe özgüdür ve optik izomerler dışında hiçbir bileşiğin titreşim spektrumu bir başkası ile aynı değildir. Her bir fonksiyon grubunun teşhisi o grup için belirgin olan titreşim frekansları ile sağlanır. Değişik fonksiyonel gruplara ait titreşim frekansları, daha önce literatürde yer verilen bilgilerden veya atlaslardan faydalanılarak tanımlanmaya çalışılır.

Bu teknik kullanılarak çok düşük konsantrasyondaki örnekler hem in vivo hem in vitro koşullarda incelenebilmekte; protein, lipit, DNA, kolesterol, karbonhidrat gibi hücrelerin yapıtaş molekülünün fonksiyonel gruplarındaki değişimler, ve dolayısıyla bu fonksiyonel grupların ait oldukları moleküllerdeki değişimler hassaslıkla belirlenebilmektedir (**Severcan v.d., 2000; Severcan v.d., 2003; Boyar v.d., 2004; Severcan v.d., 2005a; Cakmak v.d., 2006; Toyran v.d., 2006; Doğan v.d., 2007; Bozkurt v.d., 2007; Ozek v.d., 2009; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). FTIR spektroskopisi sağladığı yüksek sinyal-gürültü oranı ile düşük geçirgenliğe sahip sulu protein çözeltilerinin de incelenebilmesine olanak sağlamakta (**Pelton ve Mclean, 2000**); özellikle proteinlerin ikincil yapı ve miktarları hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir (**Haris ve Severcan, 1999; Severcan v.d., 2004; Nilsson, 2004**).

FTIR spektroskopisi tekniği ile çok çeşitli katı ya da sıvı örnekler hızlı bir şekilde incelenebilir. Örneklerin hazırlanması için gereken süre, seyreltilmiş toplam yansıtma (Attenuated total reflectance, ATR) ataçmanı takılarak minimal süreye indirilebilir ve kısa sürede sonuç elde edilebilen ATR-FTIR spektroskopi yöntemi ile bir örnek için elde edilen spektral çekimlerin sayısı kolaylıkla arttırılabilir. Kızılötesi kaynağından gelen ışının örnek ile teması ile oluşan, ışığın örnek içerisinde toplam iç yansımada meydana gelen değişimleri belirlemek bu ataçmanın temel prensibini oluşturmaktadır (Şekil 3).

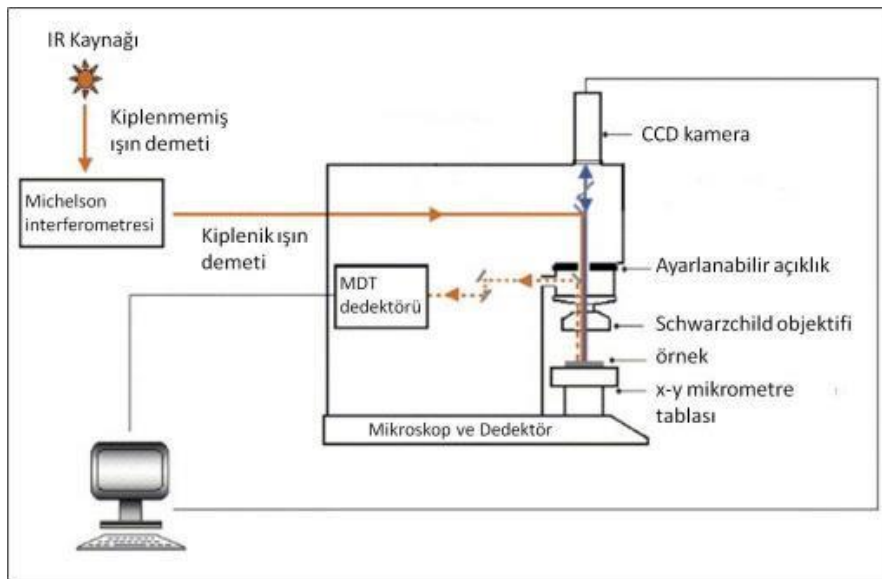


Şekil 3. Çok yansımalı ATR sistemi yapısı (**Wang v.d., 2007**).

Bir kızılötesi ışın belli bir açı doğrultusunda yüksek refraktif indeksi ile ATR kristali yönlendirilir. Eğer kristalle örnek arasındaki ara yüzeyde geliş açısı, iki yüzey arasında kırılma endeksi fonksiyonu olarak tanımlanan kritik bir açıdan daha fazla ise, toplam iç yansıma meydana gelir. Bu ataçman kullanımı ile kızılötesi ışınlardan kaynaklı sinyalin elde edilebilmesi için örnek ile gelen ışının çok yakın bir temasta olması gerekmektedir. Bu nedenle, belirli bir basınç uygulanarak kristal ve örnek arasında yakın temas olması sağlanmaktadır. Örnek infrared spektrumunun bir bölgesinde enerji soğurduğu zaman, geriye kalan radyasyon zayıflatılmış olacaktır. Bu zayıflatılmış radyasyon spektrometre ile tespit edilir ve böylelikle örneğe ait kızıl ötesi spektrumu elde edilmiş olur.

ATR için birçok uygun kristal materyalleri bulunmaktadır. Bu kristaller, Germanyum (Ge), Silika (Si), elmas (Di), ve çinko-selenit (ZnSe) ham maddelerinden oluşabilmektedir. Kullanılan örneğin özelliğine ve incelenmek istenen kızılötesi bölgesine göre kullanılacak kristalin materyali seçilmektedir. Bu çalışmada, orta-IR bölgesinde kullanıma uygun olan, suya dayanıklı, düşük maliyetli Di/ZnSe (elmas/çinko-selenit) kristali kullanılmıştır. Bu kristal, orta-IR bölgesinde kuru, ıslak veya sulu örnekleri analiz etmek için idealdir.

Son yıllarda FTIR spektroskopisi ile kombine edilerek geliştirilmiş olan FTIR mikrospektroskopisi sayesinde ön hazırlık gerektirmeden ve boyama uygulanmadan, çalışılan örneğin kesitindeki ilgili bölge boyunca noktasal spektrumlar ya da organik fonksiyonel grupların dağılımı ve konsantrasyonunu temsil eden kimyasal haritalar elde edilebilir (**Kidder v.d., 1997; Kneipp v.d., 2002**). FTIR mikrospektroskopisi çalışma prensibi Şekil 4'de gösterilmektedir.



Şekil 4. FTIR mikrospektroskopu çalışma prensibi (**Gazi v.d., 2006**)

Hastalıkların dokularda neden oldukları patolojileri sistemi bozmadan, etkin ve hassas bir şekilde saptamak ve patolojik bölgeleri FTIR mikrospektroskopisi ile incelemek mümkün olmaktadır (**Camacho v.d., 1999; Fernandez v.d., 2005; Toyran v.d., 2006; Krafft ve Sergio, 2006; Lin v.d., 2007; Toyran v.d., 2007; Boskey ve Camacho, 2007; Toyran v.d., 2008; Cakmak v.d., 2012**). FTIR spektroskopisi ve mikrospektroskopisinin biyomedikal ve diğer biyolojik sistemlerdeki uygulamaları yeni basılan bir kitapta kapsamlı olarak yer almaktadır (**Severcan and Harris, 2012**).

2.5.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

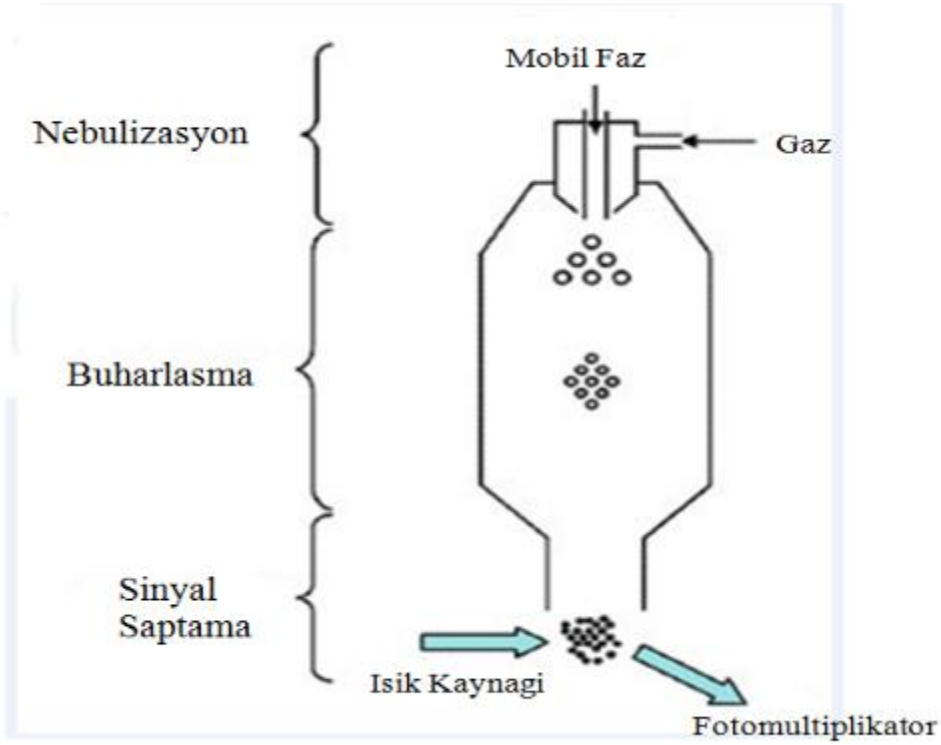
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), bir karışımın içindeki maddeleri saf bir halde ayırmak ve nitel ve nicel olarak tanımlamak için kullanılan ve bu ayırım için yüksek basınç kullanan bir kromatografi tekniğidir. HPLC tekniğinde farklı durağan faz çeşitlerine sahip kolonlar kullanılır. Ayırılmak istenilen madde yüksek basınçla bu kolondan geçirilir ve bir dedektör yardımıyla sinyal alınır. HPLC kullanarak bir maddenin tutulma süresi belirlenebilir ve gözlenen tutulma süresi bahsedilen maddeye özgüdür. Ayrıca, maddenin verdiği bant alanı maddenin miktarıyla doğru orantılıdır.

HPLC enstrümanı ile ayırımı yapılacak maddelerin farklı özelliklerinden dolayı, çeşitli durağan fazlar geliştirilmiştir. Bahsedilen durağan fazlar arasında, ters; normal; iyon değişimi; jel filtrasyon ve displasman kromatografisi gibi farklı, incelenecek olan moleküllerin polaritesine, yük durumuna ve boyutuna göre kullanılan sistemler mevcuttur (**Christie, 1987**).

HPLC'nin bir maddeyi tanımlayabilmesi için, uygun dedektöre ihtiyacı vardır. Ayırılmak istenilen moleküllerin özelliklerine göre Mor Ötesi (UV) dedektörleri, Kırılma İndeksi (RI) dedektörleri, ve Evaporatif Işık Saçılım (ELS) dedektörleri gibi farklı, incelenecek olan moleküllerin, sırasıyla ışığı soğurmasına, ışığı kırmasına, ve ışığı saçmasına göre değişen dedektörler geliştirilmiştir (**Christie, 1992**).

Projede uygulanan HPLC çalışmalarında seçilen kolon, durağan fazı normal faz olan silika dolgu maddeli bir kolon olup, molekülü tanımlayacak olan dedektör ise ELS dedektörüdür. Normal fazlı kolonların kullanıldığı HPLC deneylerinde, durağan faz polar olduğu için, mobil fazın apolar olması gerekmektedir. ELS dedektörleri, mobil faz ve örnekten oluşan karışım, enstrümanın içinden geçerken, buharlaşmayan kısmın saçtığı ışık miktarını ölçer. Buharlaşmayan ya da yok olmayan her molekül sinyal verir. Saçılan ışık sinyali ise,

incelenecek olan molekülün miktarını gösterir. ELS dedektörlerinin çalışma prensibi üç ana aşamaya dayanır: nebulizasyon, buharlaşma ve sinyal saptama (Şekil 5).



Şekil 5. ELS dedektörlerinin çalışma prensibi (<http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19182-Optimizing-the-Sensitivity-of-an-Evaporative-Light-Scattering-Detector/>).

ELS dedektörlerinde veri hesaplanması sırasında, kullanılan standartların kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi esastır. İkincil dereceden hesaplanacak olan bir kalibrasyon eğrisi için, en az üç nokta, yani en az üç farklı konsantrasyonda ya da miktarda standart gerekmektedir ve eğri aşağıdaki denklemlerle hesaplanmaktadır (Empower 2 Data Acquisition and Processing Theory Guide):

$$y = A + Bx + Cx^2$$

y : Yazılım tarafından hesaplanan standart bantının verdiği sonuç

x : Bileşenin verdiği miktar ya da konsantrasyon

$A, B,$ ve C : Bant eğrisinin polinom katsayıları

Bileşen miktarını ya da konsantrasyonunu hesaplamak için ise aşağıdaki denklem kullanılmaktadır:

$$x = \frac{-B \pm \sqrt{B^2 - 4C(A-y)}}{2C}$$

Kalibrasyon eğrileri çizilirken, önemli olan bir diğer nokta da, standart eğrilerinin belirleme katsayısı (coefficient of determination) olan R^2 ' nin tayinidir. Uygun sınır değerler içerisinde bulunan bir belirleme katsayısı, kalibrasyonun uyum iyiliğini göz önüne sermektedir. Bu katsayı aşağıdaki denklemle hesaplanır (Empower 2 Data Acquisition and Processing Theory Guide):

$$R^2 = 1 - \frac{(S_y)^2}{\sigma_y^2}$$

R^2 = Belirleme katsayısı

S_y = Bileşenin verdiği miktar ya da konsantrasyonun, yazılım tarafından hesaplanan standart bantının verdiği sonuçtaki standart yanılma

σ_y^2 = Standart dağılımı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan modelleri

Projemizde kullanılan fare modelleri COST-SYSGENET aksiyonundan işbirliği yaptığımız Prof. Dr. Gudrun Brockmann'ın grubu tarafından Berlin Humboldt Üniversitesi'nde yetiştirilmiştir. Projede yüksek yağ içeriğine göre seçilerek geliştirilmiş olan ve sonra standart diyet ile beslenmiş (SBD) spontan olarak obezite gösteren 4 değişik dişi ve erkek BFMI (BFMI852, BFMI856, BFMI860 ve BFMI861) ırkı ile kontrol DBAJ ırkının gonadal (GF) ve inguinal (IF) adipoz dokuları kullanılmıştır. İncelenen BFMI ırkları yüksek yağ içeriğine sahip olma durumlarına göre seçilerek inbred olarak üretilmektedirler. Bu fare modelleri obezite oluşumu üzerinde rol oynayan yeni genlerin bulunması amacıyla yapılan çalışmalara ışık tutmaktadırlar. Kısaca, kullanılan BFMI ırkları, öncelikle vücutlarındaki protein içeriğinin ve daha sonra vücut ağırlığının az olmasına ve vücut yağ içeriğinin fazla olmasına göre seçilmiştir. Bu seçim sürecinde, bazı fareler fazla yağlı bir fenotip belirlediler ve bu yeni ırk Berlin yağ fareleri (BFM) olarak isimlendirilip 58 jenerasyonluk üretim süreci sonunda ayrılmıştır. Ayrılan bu ırklar daha sonrasında inbred olarak çiftleştirilerek projede kullanılan BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 ırkları oluşturulmuştur (**Wagener v.d., 2006, Meyer v.d., 2009**). DBAJ fare ırkı ise ticari olarak elde edilen ve doğal tür özelliği gösteren bir fenotip inbred ırk olup genellikle kontrol hat olarak kullanılmaktadır.

3.2. Hayvan deneyleri

Projede kullanılan fare modellerinin yetiştirme, barındırma ve bu farelerin vücut ağırlıklarının izlenmesi ile tüm serum parametreleri ölçümleri Prof. Dr. Gudrun Brockmann'ın Humboldt Üniversitesi bünyesindeki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Dişi ve erkek BFMI852 (n=6), BFMI856 (n=6), BFMI860 (n=6) ve BFMI861 (n=6) fare modelleri ile kontrol olarak DBAJ fareleri (n=6) çalışılmıştır. Böylece IF dokudan 30 'ar örnek ile aynı şekilde GF dokudan 30'ar örnek olmak üzere, her bir doku için 5 grubu göz önüne aldığımızda toplamda (dişi + erkek) 120 örnek incelenmiştir. Hayvanlar 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde 22±2 °C oda sıcaklığında ve %65 nemlilikte yiyecek ve suya istedikleri zaman ulaşabilecek şekilde barındırılmıştır. Tüm fare ırkları 10 hafta boyunca standart beslenme diyeti (SBD) ile beslenmiştir. Bu diyet hayvanlar 3 haftalık olduktan sonra uygulanmışlardır. Kullanılan SBD

(V1534-000, ssniff R/M-H, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest/Almanya) büyük çoğunluğu %58 oranında karbonhidratlardan, %33 proteinler ve %9 oranında yağ (soya yağı) oluşmaktadır ve verilen besin toplam 12.8 MJ/kg metabolize edilebilir enerji içermektedir. Bu oranlara çok yakın diyet Wagener v.d. tarafından da kullanılmıştır (WAGENER v.d., 2006). Farelerin vücut ağırlıkları düzenli aralıklarla ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Farelerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için bazı serum parametreleri ölçümü de yapılmıştır. Bu amaçla fareler, dekapitasyon öncesi 2 saat aç bırakılmış, bu süre sonunda serum parametrelerinin ölçümü için kan alınmış, ardından intraperitoneal insülin tolerans testi (ipITT testi) gerçekleştirilmiştir. Serumda kolesterol, esterifiye olmamış yağ asidi (NEFA), trigliserit, leptin ve adiponektin seviyeleri ile kan glikoz ve insülin seviyeleri ölçülmüştür. Kan glikoz seviyesi Bayer Plazma sayıcısı [mg/dl] ve insülin ticari olarak sağlanan iminoassay kitleri kullanılarak Luminex® xMAP® teknoloji ile ölçülmüştür (Mouse Serum Adipokine, Millipore Corporation, Billerica, USA). Sonuçlar Alman grubu tarafından bize yollanmıştır.

Hayvanlarla ilgili etik izin Alman grubu tarafından kendi ülkelerinin şartları doğrultusunda alınmıştır. Fareler 10 haftalık olduğunda Alman grup tarafından isofloran anestezisi altında dekapite edilerek inguinal (IF) ve gonadal (GF) adipoz dokuları ayrılmış olup, bahsedilen dokular çalışmalar başlayana kadar -80°C'de bekletilmiştir.

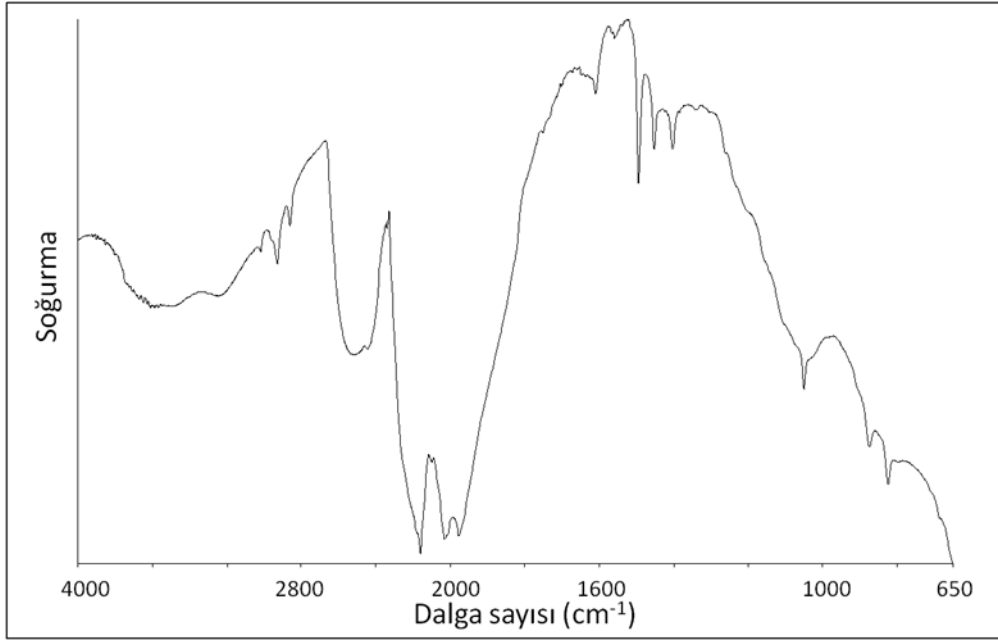
ATR-FTIR spektroskopisi deneyleri ve HPLC çalışmaları için kullanılacak olan adipoz dokuları hayvanlar dekapite edildikten sonra sıvı nitrojen içerisinde şok dondurma ile dondurulup -80°C'de saklanmıştır. Örnek taşınması sırasında ve deneylerden önce örneklerin tekrar tekrar dondurulup çözünmesinden kaçınılmıştır.

3.3. ATR-FTIR spektroskopisi

3.3.1. Spektral verilerinin toplanması

Doku örnekleri hiçbir ön işlem yapılmadan ATR ünitesinin elmas/çinko-selenit (Diamont/ZnSe) kristali üzerine yerleştirilerek ATR-FTIR spektroskopisi ile 4 cm^{-1} çözünürlüğün ve 50 çekim sayısı kullanılarak incelendi. Çekimler $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında Perkin Elmer Spektrum100 FTIR Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki tip dokuda da her bir bireye ait örneklerden 3 ayrı parça dokunun ATR-FTIR spektrumları elde edildi (3 ayrı replike çekimi). Bu replike spektrumların ortalamaları detaylı analizler için kullanıldı.

Atmosferdeki CO₂ ve H₂O'dan kaynaklanan soğurma bantları, araştırılan doku örneğinin soğurma bantlarını kamufle edebilir. Dolayısıyla, bu atmosferik su buharının etkisini azaltmak amacıyla FTIR spektrometresinden sürekli kuru hava geçirilmektedir. Buna ek olarak, örnek çekimi öncesinde havanın çekimi yapılmakta ve elde edilen spektrum bilgisayar programı aracılığıyla örnek spektrumundan matematiksel olarak çıkarılmaktadır. Sözü edilen hava spektrumu Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Atmosferik havanın 4000-650 cm⁻¹ bölgesindeki ATR-FTIR spektrumu

3.3.2. ATR-FTIR spektroskopik çalışmalarında kullanılan spektrum analiz yöntemleri

BFM ırkları spektrumlarına ait bant alanlarının ve bant frekans değerlerinin tayinini içeren detaylı spektral analizler, örnekler üzerinde herhangi bir su çıkarma işlemi uygulanmadan normalize edilmemiş ham spektrumlar kullanılarak Perkin Elmer Spektrum One analiz programı ile yapıldı. FTIR spektrumunda yer alan bandlardan pek çok bilgi elde edilebilir. Değişik bölgelerdeki bandlardaki frekans kaymaları ve sinyal şiddetlerindeki ve/veya alanlarındaki değişimler, sistemdeki çeşitli fizikokimyasal süreçler hakkında bilgi elde etmede kullanılır. Sinyal şiddeti ve/veya alan değerinin artması, adı geçen grubun konsantrasyonunun artması; azalması da o grubun konsantrasyonunun azalması anlamına gelmektedir (**Alo v.d., 1998; Freifelder v.d., 1982**). Membran hakkında yapısal bilgi veren parametreler düzen

(order), ve düzensizlik (disorder), parametreleridir. Bu parametreler FTIR analizinde CH₂ gerilme modu frekans (veya dalga sayısı) değeriindeki değişim ile monitör edilir (**Casal ve Mantsch, 1984, Cameron ve Charette, 1981**).

3.4. ATR-FTIR spektrumlarına uygulanan Kemometrik analiz yöntemleri

Bu çalışmada hiyerarşik kümeleme metodu ve temel bileşen analizi (PCA) metodu örneklerin ayrımı için uygulanmıştır. Elde edilen verilerin işlenmesi ve yorumlanması için istatistiksel ve matematiksel metodların kullanımı olarak tanımlanan bu metodlar, verilerin daha anlaşılabilir grafik formatında sunulmasında kullanılırlar. Aynı anda değişkenler ve gözlemler arasındaki ilişkileri değerlendirilmesine imkan veren bu analizler daha önceden ortaya çıkarılmamış ilişkileri ortaya çıkarma ve sıradan sonuçlar diye nitelenemeyecek tahminler yapmaya izin veren yöntemlerdir ve gözetimsiz örüntü tanımlama yöntemleri olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemler eğitici veri örnekleriyle ilgili öncül bilgiye ihtiyaç duymayan yöntemlerdir. Bu sayede daha önce tesbit edilememiş olan beklenilmeyen bir gruplandırma keşfedilmesine olanak tanır.

PCA tekniği farklı değişkenler arasındaki ilişkilerin görüntülenmesinde ve bu sayede örnekler arasında nasıl bir ilişki olduğunun belirlenmesinde yani örnekler arası benzerlik ya da farklılıkların yorumlanmasında yaygın kullanılan bir tekniktir. PCA, çok boyutlu bir veri kümesini en baskın bileşenlerinden oluşan daha küçük boyutta bir veri kümesine dönüştüren bir veri sıkıştırma yöntemidir. PCA veri içindeki doğal kümelenmeyi, sırasıyla değişintisi (varyansı) en yüksek birinci temel bileşenden başlayarak değişintisi giderek azalan ikinci, üçüncü, ..., temel bileşenler cinsinden gösterir. Diğer bir deyişle PCA çok sayıda birbiri ile ilişkili değişkenler içeren, eldeki veriyi daha az sayıda değişkenle ifade edebilecek en iyi dönüşümü belirlemeyi amaçlar. Tek bir örnek üzerinde birden fazla ölçüm yapılabilmesine çok değişkenli ölçüm adı verilmektedir (**Wang ve Mizaikoff, 2008**). Gürültüye karşı düşük hassasiyet, bellek ve kapasite ihtiyaçlarının azalması, az boyutlu uzaylarda daha etkin çalışması PCA'nin temel avantajları arasında sıralanabilir.

Kümeleme analizi ise bir tür çok değişkenli teknikler grubu olup, temel amacı nesnelere (birimleri) sahip oldukları karakteristik özellikleri baz alarak gruplamaktır. Kümeleme tekniği örnekler ya da değişkenler arasındaki benzerliklerin gösterilmesi ve yorumlanmasına yönelik sıkça kullanılan kemometrik yöntemlerden birisidir. Kümeleme analizi, nesnelere küme içerisinde çok benzer biçimde, kümeler arasında farklı olacak biçimde kümeler. Kümeler arasındaki farklılık heterojenite değerine göre belirlenir. Kümeleme analizi ile benzer örnekler aynı grup altında toplanabilmektedir. Bu teknikte elde edilen sonuçlar genelde Ward's

algoritması ile beraber Euclidian uzaklığı kullanılarak oluşturulan dendogramlar şeklinde gösterilmektedir. Örneklerin yakınlık derecesi dendogramın x eksenindeki benzemezlilik ölçüsü (dissimilarity measure) ile ifade edilmektedir. Benzemezlilik derecesi arttıkça örneklerin yakınlık derecesi azalmaktadır (Wang ve Mizaikoff, 2008).

3.5. ATR-FTIR spektrumlarından protein ikincil yapı tayini

FTIR spektrumlarının 1700-1600 cm^{-1} frekans aralığında yer alan amide I bandı ayrıştırmamış bandları içermektedir ve bu nedenle geniş bir bandtır. Bu banda, yapay sinir ağları gibi biyoinformatik yöntemler ve ayrıca ikincil türev-vektör normalizasyon metodu uygulanarak obez fare adipoz dokularında, protein ikincil yapı değişimleri belirlendi.

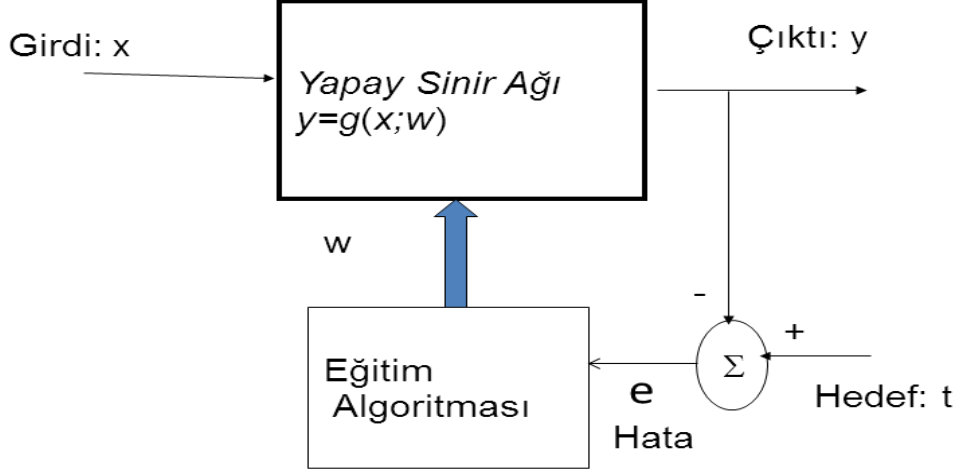
3.5.1 Protein ikincil yapılarının FTIR spektrumlarından Yapay Sinir Ağları kullanılarak kestirimi

Protein ikincil yapılarının belirlenmesinde FTIR, CD, Raman spektroskopisi gibi değişik spektroskopik yaklaşımlar uygulanmaktadır. Bu teknikler kullanılarak ikincil yapılarla ilgili niteliksel bazı bilgiler elde edilebilmesine karşın niceliksel bilgiler elde edebilmek için ayrıntılı çözümlenmeler gerekmektedir. Örneğin, proteinlerin FTIR spektrumlarından ikincil yapılarını kestirebilmek için eğri uyarlama (curve fitting), kısmi en küçük kareler (partial least squares) çözümlenmesi ve faktör çözümlenmesi (factor analysis) gibi teknikler uygulanmıştır. Bu yöntemlerin belli ölçülerde birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu çalışmada, bu yöntemlerle kıyaslandığında daha az kestirim hatası sağlayan Yapay Sinir Ağları (YSA) kullanılmıştır. Aşağıda kısaca yapay sinir ağları tanıtıldıktan sonra kullanılan metod ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

3.5.1.1. Yapay Sinir Ağları

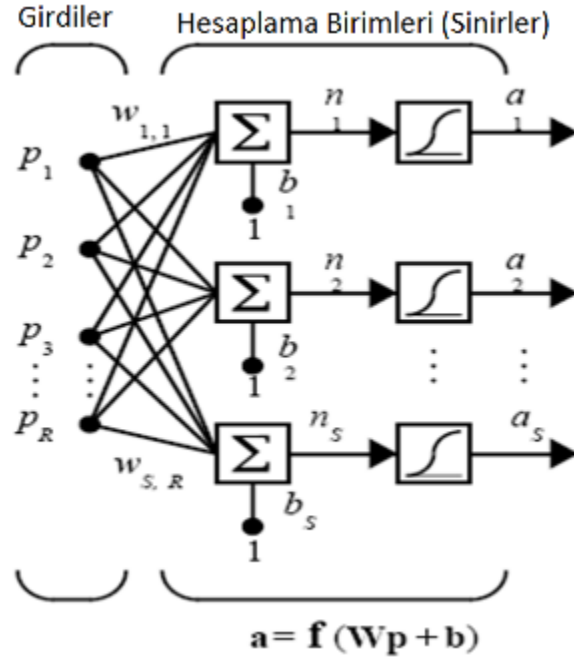
Matematiksel olarak YSA, bir \mathbf{x} girdi vektöründen bir $y=g(\mathbf{x};\mathbf{w})$ çıktı vektörüne doğrusal olmayan parametrik bir eşleştirme olarak tanımlanabilir. \mathbf{w} YSA içindeki bağlantı katsayılarını ifade etmektedir. Bu çalışma örneğinde, \mathbf{x} bir proteinin FTIR spektrumu değerlerinin belirlediği vektör, y ise bu proteinin ikincil yapı değerlerinden birisinin kestirimidir. İyi bir kestirim yapabilmek için uygun bir eşleştirme algoritması $g(\mathbf{x};\mathbf{w})$, ki bunu YSA mimarisi belirler, ve uygun bağlantı katsayıları, \mathbf{w} , değerlerinin bulunması gerekir. \mathbf{w} değerlerinin bulunması için Şekil 7'de görüldüğü gibi YSA'nın eğitilmesi gerekir. Bu amaçla daha önceden çıktı değerleri

(hedef değerleri) bilinen bir dizi \mathbf{p} girdi vektörü kullanılır. Uygun bir eğitim algoritması ile, YSA çıktısı ile hedef arasındaki $e=t-g(\mathbf{p};\mathbf{w})$ hata değerini en aza indirecek bağlantı katsayıları hesaplanır. Eğitim bir kez yapıldıktan sonra ikincil yapısı bilinmeyen protein spektrumundan kestirim yapabilmesi için sadece üstteki YSA kutusu kullanılır.



Şekil 7.Yapay Sinir Ağı Modeli

Bu çalışmada, uygulamada genellikle kullanılan ileri beslemeli (feed forward) yapay sinir ağları modeli kullanılmıştır. Bu tür YSA'lar iki veya daha çok katmanlı yapılardır. Her katman Şekil 7 ve 8'de görüldüğü gibi bir veya daha fazla hesaplama biriminden (nöron, sinir) oluşur. Hesaplama birimleri insan beynindeki sinir hücrelerinin çalışmasına benzer şekilde modellenmiştir. Her birim bir dizi girdinin toplandığı bir akümülatör ve bunun çıkışında sigmoid türü doğrusal olmayan bir eşleştirme biriminden oluşur.

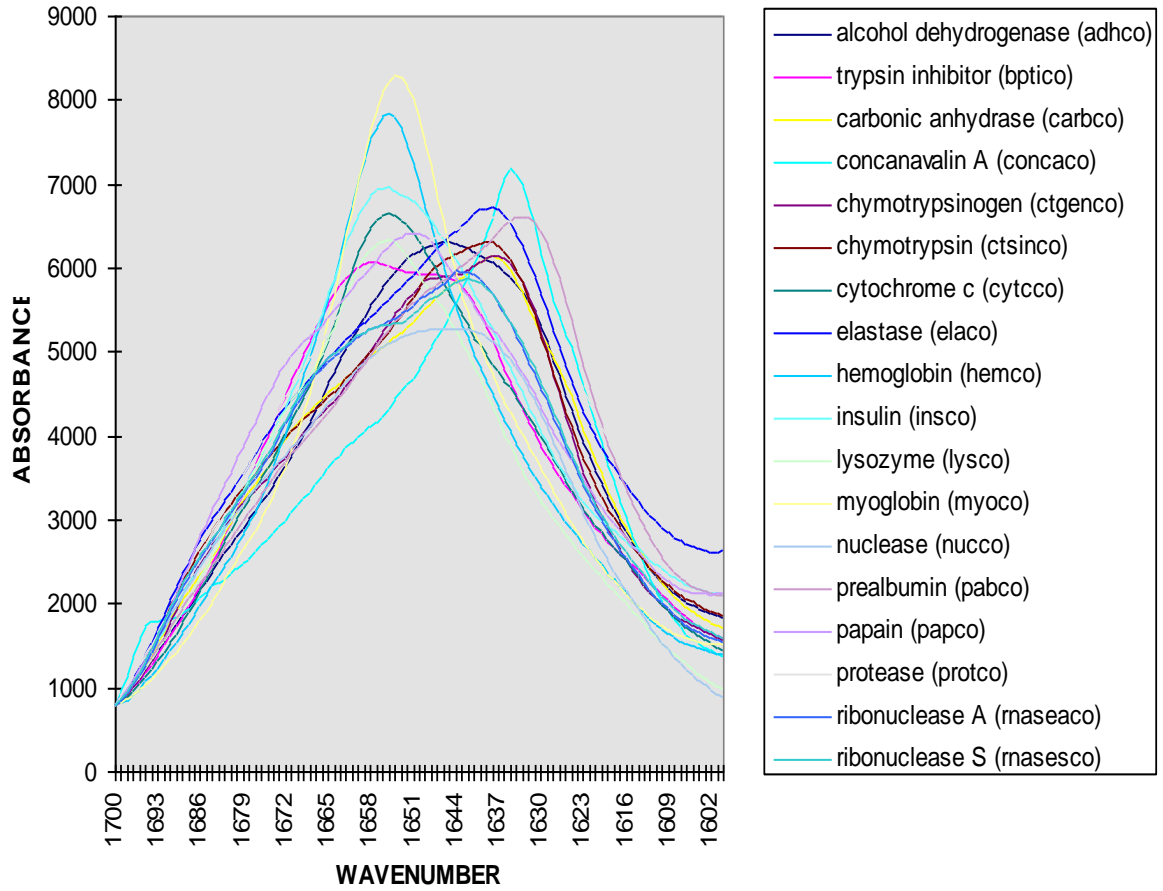


Şekil 8. İleri beslemeli bir YSA'da bir katmanın yapısı

Yapay sinir ağlarının eğitimi için uygulamada çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, YSA eğitimi için gerekli olan yapısı bilinen proteinlerin spektrumlarının sayısı çok sınırlı olduğundan, daha önceki çalışmalarımızda geliştirdiğimiz Bayes regülarasyonlu geri yayılım algoritmasının bir biçimi kullanılmıştır (**Severcan v. d., 2001, Severcan v. d., 2004**). Aşağıda anlatılan yöntem uygun YSA modelinin oluşturulması, YSA'nın eğitilmesi ve ikincil yapı kestirimlerinin ne şekilde yapıldığını anlatmaktadır.

3.5.1.2. Metod

Protein ikincil yapılarının belirlenmesi için FTIR spektrumunun 1700-1600 cm^{-1} , AMID I, bölgesi kullanılmaktadır. 1 cm^{-1} aralıklarla alınan spektrumlardan her birisi için 101 uzunluğunda vektörler elde edilir. YSA'ların eğitimi amacıyla Lee ve arkadaşlarının kullandığı x-ışını kristalografi metodu ile ikincil yapı içerikleri bulunmuş 18 adet FTIR spektrumu referans seti olarak kullanıldı (**Lee v.d., 1990**). Şekil 9'da bu spektrumlar görülmektedir.



Şekil 9. İkincil yapıları bilinen 18 referens protein spektrumu

YSA'nın eğitilmesini sınamak için de ayrıca test vektörleri gerekmektedir. En az bir test vektörü kullanılırsa geriye 17 adet eğitim vektörü kalmaktadır. Bu çalışmada eğitim başarımını artırmak için dönüşümlü olarak her seferinde farklı bir test vektörü kullanıldı. Bu yöntem birisini ayır (leave-one-out) yöntemi olarak bilinmektedir. 17 adet 101 uzunluklu eğitim vektörü kullanılması genelleştirme sorununa yol açmaktadır. YSA'nın, ikincil yapısı bilinmeyen yeni bir spektrum girdisi olması durumunda doğru sonuç vermesi beklenmektedir. YSA, eğitim sırasında bütün örnekler test edildiğinde doğru sonuç verebilir, ancak bilinmeyen bir spektrum için de doğru tahminde bulunması beklenir. Bağlantı katsayılarının toplam sayısı W olan bir YSA için genelleştirme sorunu yaratmayacak bir YSA'nın eğitimi için gerekli eğitim vektörü sayısı, N , pratik bir kural olarak $N = \frac{3}{8} W$ bağıntısından hesaplanmaktadır. Bu durumda, 101 girişli, 2 saklı birimli, 1 çıkışlı YSA'lar için gereken örnek sayısı 78 olmaktadır. Eğitim seti örnek

sayısı 17 olduğundan, $17 \times 8 / 3 = 45$ den az sayıda bağlantı ağırlığı olan YSA modelleri ancak iyi genelleştirme sağlayabilir. Bu koşulu sağlayabilmek için YSA giriş sayısının 101 in çok altında bir değere çekilmesi gereklidir. Bu çalışmada genelleştirme sorununu gidermek için 1)Ayrık Cosinüs Dönüşümü (Discrete Cosine Transform, DCT) kullanılarak veri sıkıştırması ve 2) Referans spektrumların enterpolasyonu ile yapay bir şekilde eğitim için gerekli spektrumların sayısının artırılması yoluna gidilmiştir.

Bilindiği gibi DCT, frekans domeninde enerjiyi düşük frekanslarda yoğunlaştıran en iyi transformlardan birisidir. 101 öğeli referans spektrum vektörlerinin ayrık kosinüs dönüşümü katsayılarının genlik değerleri ilk 10 ile 15 katsayının ardından %1 değerinin altına düşmektedir. Bu da 1/10 a varan bir sıkıştırma elde etmemizi dolayısıyla YSA girişindeki bağlantı katsayısı sayılarında büyük bir azalma elde etmemizi sağlamaktadır.

Referans spektrumların sayısının enterpolasyonla çoğaltılması empirik olarak bulunmuş bir yöntemdir ve YSA'nın kestirim başarımını artırdığı görülmüştür. Her iki referans spektrum belli oranlarda doğrusal olarak birleştirilerek yeni spektrumlar elde edilir. Yeni spektrumlara ait ikincil yapı değerleri de aynı oransal birleştirme ile elde edilir. Bu işlemin başarılı olmasının nedeni, YSA ile kestirim yapma işleminin aslında çok boyutlu uzayda bir eğri yakınlaştırma işleminden başka bir şey olmadığıdır. Bu çalışmada eğitim vektörleri sayısı yapay olarak 4 misline çıkarılmıştır. Yukarıdaki açıklamaların ışığında ikincil yapı kestirimi 2 aşamalı olarak aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. Aşama: (YSA mimarisinin saptanması: Girdi sayısı, saklı katman sinir sayısı, eğitimi durdurma kuralı (SSE=sum squared error=hata kareleri toplamı))

- 1) Tüm referans spektrumlar tepe değerleri aynı olacak şekilde normalize edilir.
- 2) Ayrık Cosinüs Dönüşümü elde edilir. (DCT)
- 3) Bir spektrum ayrılır. (Leave-one-out)
- 4) Kalan 17 spektrum vektöründen enterpolasyonla yeni spektrumlar elde edilir. Aynı şekilde X-ray kristalografi ile bulunmuş hedef ikincil yapı değerleri enterpole edilir.
- 5) YSA Bayes regülarasyonlu geri yayılım algoritması ile eğitilir.
- 6) Bulunan YSA ayrılan test vektörü ile sınanır.
- 7) 5 ve 6ncı adımlar çok sayıda (~400) kez tekrarlanır ve test sonuçları histogramı bulunur, buradan en olası kestirim (ML estimate) elde edilir. (ML kestirimi hata varyansını küçültmek amacıyla yapılmaktadır.)
- 8) 18 spektrumun her birisi için adımlar 3ten 7ye kadar tekrarlanır.
- 9) Her bir spektrum için kestirim hataları bulunur, buradan standart kestirim hatası (SEP=Standard Error of Prediction) elde edilir.

Yukardaki 9 adım kullanılarak

- Saklı katman sinir sayısı
- YSA girdi sayısı (=DCT katsayıları sayısı), ve
- Durdurma kuralı (SSE)

için en uygun değerler bulunur. Bir başka deyişle SEP değeri en küçük olan yukarıdaki 3 parametre elde edilir.

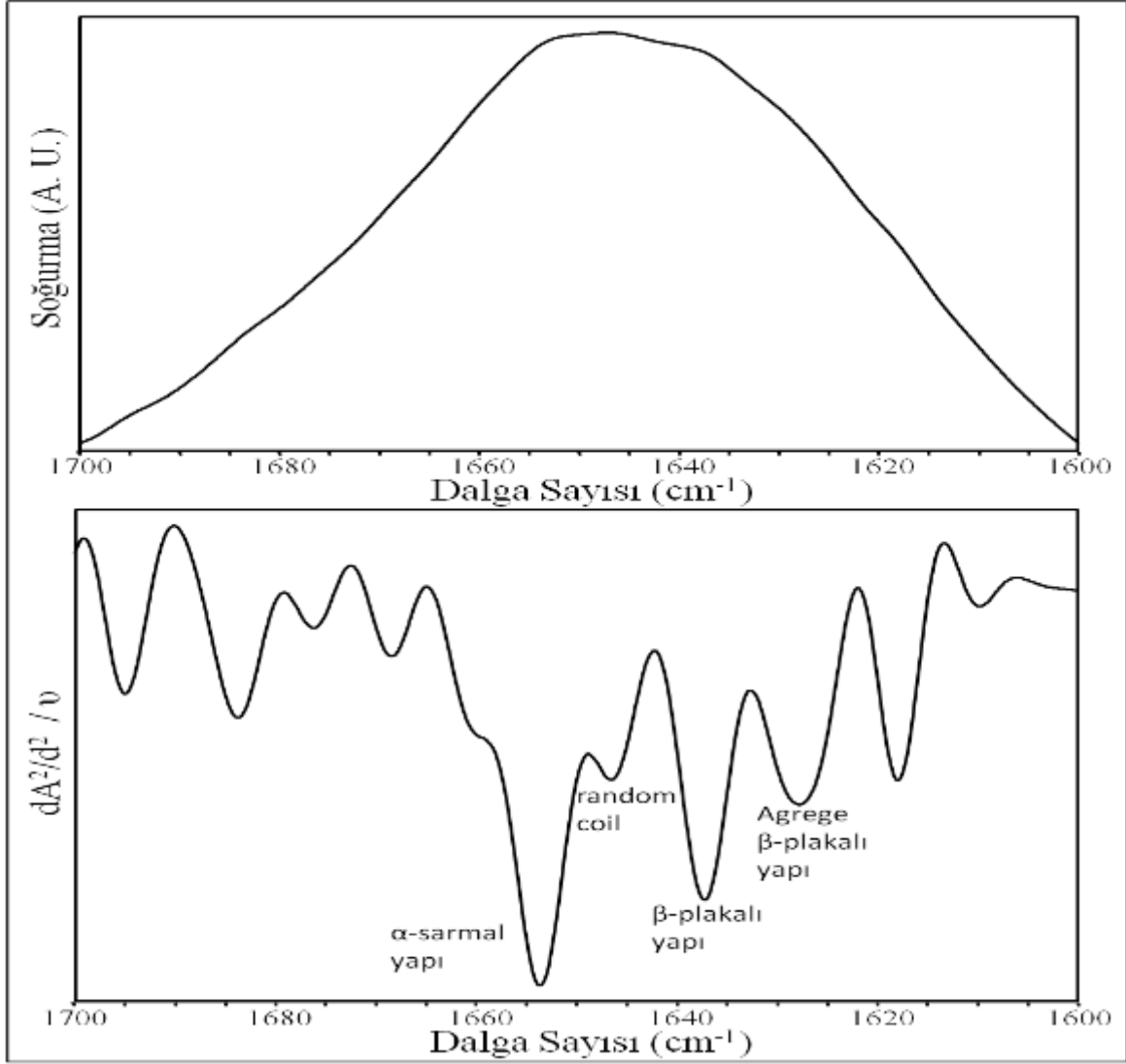
2.Aşama: (Kestirimlerin elde edilmesi)

- 1) 1nci aşamada bulunan YSA parametreleri kullanarak bir YSA modeli kurulur.
- 2) Bu YSA, 18 referans proteini kullanarak 1nci aşamadaki gibi eğitilir.
- 3) İkincil yapısı bilinmeyen yeni spektrum da referans spektrumlar gibi tepe normalizasyonu ve DCT işleminden geçirildikten sonra, 2nci adımda eğitilmiş olan YSA'ya uygulanır ve bir kestirim bulunur.
- 4) Yukarıdaki 3 adım çok sayıda (~400) tekrarlanarak 1nci aşamada açıklandığı biçimde istenen parametrenin en olası kestirimi (Maximum likelihood estimate) elde edilir.

Bu çalışmada her bir protein ikincil yapı parametresi, alfa-heliks, beta-tabaka, ve dönme içerikleri (percent content of alpha-helix, beta-sheet, ve turns) ayrı YSAlar kurularak elde edilmiştir. Eğitilmiş YSAların standard kestirim hataları alfa-heliks için %4.19, beta-tabaka için %3.49 ve dönme için %3.15 olarak elde edilmiştir.

3.5.2. ATR-FTIR İkincil türev spektrumlarından protein ikincil yapı tayini

YSA'lar ile mükemmel protein ikincil yapı kestirimi yapılabilmektedir, fakat bu methodla toplam beta yapısı hakkında bilgi edinilmektedir. Hem YSA metodu sonuçlarını desteklemek hem de betalardaki değişimi ayrıntılı saptayabilmek için ikincil türevden amid I protein bandı altında bulunan alt bantlar kullanıldı. Şekil 10'da bir adipoz doku örneğinde amide I protein bandı ve ikincil türev spektrumu görülmektedir. İkincil türevde bandların tepe konumu minimum olarak yer almaktadır. Band tanımları şekil üzerinde gösterilmiştir. İkincil türev spektrumu üzerinden okunan bandların sinyal şiddetleri değerleri, protein ikincil yapı değişimleri hakkında relatif bilgi vermektedir.



Şekil 10. BFM1860 ırkına ait dişi GF adipoz dokusunun 1700-1600 cm^{-1} arası örnek soğurma ve ikincil türev spektrumları

3.6. FTIR mikrospektroskopik çalışmaları

3.6.1. FTIR mikroskopisi için örneklerin hazırlanması

Standart diyet ile beslenmiş (SBD) spontan olarak obezite gösteren erkek ve dişi BFM1852, BFM1856, BFM1860 ve BFM1861 olmak üzere 4 farklı obez ırk ve kontrol olarak DBAJ farelerinin inguinal ve gonadal adipoz dokularının kesit alma işlemleri Shandon marka

soğutmalı mikrotomla yapıldı. Dokular herhangi bir işlem görmeden -80°C 'de saklandı. Dokuların bozulmaması için kesit alınacağı zaman mikrotoma kadar sıvı azot içinde taşındı ve bu süre içinde sıvı azot içinde saklandı. Dokulardan alınan örneklerle yaptığımız parafine gömme çalışmaları sonuç vermediği için daha sonra yapılan çalışmalarda Shandon (Thermo Scientific) cryomatrix içinde gömülerek kesit alınması uygun görüldü. Yapılan araştırmalarda adipoz dokunun zor kesit alınan bir doku olduğu ve genellikle -30°C ve altında kesit alınabildiği saptandı. Bu sebeple -25°C , -30°C ve mikrotomun elverdiği daha düşük sıcaklıklarda kesit alınmaya çalışıldı. Sıcaklık düştükçe daha sağlıklı kesit alınabildiği görüldü. Bu sebeple mikrotom içinde Richard-Allan Scientific (Thermo Scientific) soğutucu spreycilerle kesit alınmaya çalışıldı fakat mikrotomun iç sıcaklığı daha fazla düşürülemedi. Yapılan çalışmalarda adipoz dokunun çok hassas olması nedeniyle fırça ile çekme metodu kullanıldı. Bu metodu kullanırken mikrotomun kapağı açık kalmak zorunda olduğu için adipoz dokunun en ufak ısı değişiminden etkilendiği saptandı. Bu nedenle adipoz dokunun optimizasyon çalışmalarında zorluk çekildi. Alınan kesitler FTIR mikroskobuna uygun baryum florür cam üstüne alındı ve hızlı bir şekilde kurutma işlemine geçildi. Dokuların erimemesi için vakumlu desikatörde yapılan kurutma işlemlerinin soğuk odada yapılmasına karar verildi. 6, 12, 24 ve 48 saatlik periyotlarda desikatörde kurutma yapılarak en uygun kurutma süresinin 24 saat olduğu saptandı. Bunun dışında optimizasyon çalışmaları içinde doku kesit kalınlığı optimizasyonu yapıldı. Öncelikle 10 mikronluk kesitler alındı fakat mikroskop çalışmalarında absorbans değerleri çok yüksek çıktığı için daha ince kesitler alınmasına karar verildi. Daha sonra alınan 6 ve 9 mikron arası kesitlerde yapılan çalışmalarda 7 mikron kalınlığının altında olan kesitlerin cam üstünde toplanması sebebiyle 7 mikronluk kesitlerin en uygun olduğuna karar verildi.

3.6.2. FTIR Mikrospektroskopi deneyleri

Adipoz dokularından soğutmalı mikrotom kullanılarak $7\ \mu\text{m}$ kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitlerden ilki kızılötesi ışığı geçiren özel BaF_2 camları üzerine yerleştirildi ve erimemesi için soğuk odada 24 saatlik kurumaya bırakıldı. FTIR mikrospektroskopisi çalışmalarında "Perkin Elmer Spotlight 400" mikrospektroskopi sistemi kullanıldı. Kesitlerden $4000\text{-}750\ \text{cm}^{-1}$ frekans aralığında, $6.25 \times 6.25\ \mu\text{m}$ piksel büyüklüğü ve $8\ \text{cm}^{-1}$ spektral çözünürlük kullanılarak her pikselde 4 spektrumun ortalaması alınarak spektral haritalar toplandı. Her kesitten beşer spektral harita toplandı. İkinci seri kesitler ise immünohistolojik tanımlama için UCP1 boyamasına tabi tutuldu. Bu boyamaların sonuçları FTIR mikrospektroskopisi öncesinde kesitlerin histolojik yapısının görülmesi amacıyla kullanıldı.

Elde edilen spektral haritalar “Perkin Elmer Spektrum Image” programı kullanılarak incelendi. Kesitlerdeki olası kalınlık farklılıklarından kaynaklanabilecek yanlış ölçümlerden kaçınılması için bant alan oranları alınarak görüntüleme çalışmaları gerçekleştirildi. Elde edilen spektral haritalarda Tablo 1’de verilen bölgeler kullanılarak bant alanları hesaplandı, bu bant alanları kullanılarak Tablo 2’de verilen bant alan oranları görüntülendi.

Tablo 1. Spektral haritalarda gerçekleştirilen bant alanı hesaplamaları için kullanılan bölgeler.

Kızılötesi soğurma bandı	Kullanılan spektral bölge
CH gerilim bölgesi	2942-2906 cm^{-1}
Olefinik (HC=CH)	3028-3000 cm^{-1}
CH ₂ antisimetrik gerilim	2942-2906 cm^{-1}
CH ₃ antisimetrik gerilim	2980-2948 cm^{-1}
Karbonil (C=O) gerilim	1760-1724 cm^{-1}
Amid I	1700-1600 cm^{-1}
Karbonhidrat	1027-1030 cm^{-1}

Tablo 2’de görüldüğü gibi adipoz doku kesitlerdeki lipit/protein dağılımı (CH/amid 1), lipitlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim), doymamış/doymuş lipitlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim) ve karbonhidrat/protein dağılımı (1030 cm^{-1} /amid 1) görüntülendi. Elde edilen spektral haritalar arasındaki değişimler karşılaştırıldı.

Tablo 2. Spektral haritalarda görüntülenen bant alan oranları

Hesaplanan bant alan oranı	Açıklama
Lipit/protein	CH gerilim bölge alanı/amid I bant alanı
Doymamış lipit içeriğinin doymuş lipit içeriğine oranı	Olefinik (HC=CH) bant alanı/CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı
Lipit hidrokarbon zincir uzunluğu	CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı/ CH ₃ antisimetrik gerilim bant alanı
Lipit içeriğindeki karbonil grubu miktarı	Karbonil (C=O) gerilim bant alanı/CH gerilim bölge alanı
Karbonhidrat/protein	1030 cm ⁻¹ bant alanı/Amid I

3.7. UCP1 İmmunohistolojik Boyama Tekniği

Standart diyet ile beslenmiş (SBD) spontan olarak obezite gösteren erkek ve dişi BFMI852, BFMI856, BFMI860 ve BFMI861 olmak üzere 4 farklı obez ırk ve kontrol olarak DBAJ farelerine ait inguinal ve gonadal adipoz dokularında UCP1 immunohistolojik boyama tekniği kullanarak kahverengi adipoz dokusu (BAT) ve beyaz adipoz dokusu (WAT) miktarlarındaki değişimin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Böylelikle, adipoz dokuda gerçekleşen transdiferansiyasyon oranı hakkında bilgi edinilecektir.

Kesit alma işlemleri Shandon marka soğutmalı mikrotomla yapıldı. Herhangi bir işlem görmeden -80°C'de saklanan dokular, kesit alınacağı zaman mikrotoma kadar sıvı azot içinde taşındı ve bu süre içinde sıvı azot içinde saklandı. Dokuların Shandon (Thermo Scientific) cryomatrix içinde gömülerek kesit alınması uygun görüldü. -25°C'teki mikrotom içinde 7 mikron olarak alınan kesitler lam üzerine alınarak derhal soğuk odada bulunan desikatöre taşınıp burada 24 saatlik kurutma işlemine sokuldu. Ve boyama işlemi bir sonraki gün yapıldı.

Boyama işlemlerinde "EXPOSE rabbit spesifik AP (red) detection IHC Kit" ve Biotin goat anti rabbit antikoru kullanıldı. İzlenen prosedür şu şekildedir: Lamların üzerine -20°C'de bekleyen asetondan 100-200 µl eklenir ve yine -20°C'de 5-10 dakika bekletilir. Lamlar PBS (Phosphate-buffered saline) tampon solüsyonda 3 defa yıkanır. Daha sonra lamların üzerine

“Protein Block” çözeltisinden 100er µl ekleyip 10 dakika bekletilir. Lamlar tekrar PBS tampon solüsyonda 3 defa yıkanır. 10 µl primary antibody 1/200 oranında PBS tampon solüsyonla dilüte ederek lamların üzerine 100-200 µl eklenir ve oda sıcaklığında 1 saat beklenir. Tekrar PBS tampon solüsyonda 3 defa yıkanır. “AP Conjugate” çözeltisi lamların üzerine 100-200 µl eklenerek oda sıcaklığında 15-30 dakika bekletilir ve sonrasında PBS tampon solüsyon ile 4 defa durulanır. Lamların üzerine 200 µl “Enhancer” çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 4 dakika beklenir. 1ml “Naphthol Phosphate” ve 1 ml “Fast Red” çözeltisi karıştırılıp lamların üzerine 200 µl olarak eklenir ve oda sıcaklığında 8 dakika beklenir. Sonrasında PBS tampon solüsyon ile 4 defa durulanır. Lamların üzeri hematoksin eklenip 1 dakika kadar daha bekletildikten sonra musluk suyu ile 7-8 defa yıkanıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Kalıcı preparat hazırlamak için üstlerine Eukitt kapama solüsyonu eklenip lamların üzerine lamel kapatılıp kurumaya bırakılır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda 20X ve 40X büyütme ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.8. HPLC-ELSD Çalışmaları

3.8.1. HPLC Çalışmaları

Bu projede, Berlin lipit inbred (BFMI) fare modellerinin Inguinal (IF) ve gonadal (GF), erkek (M) ve dişi (F/W) dokularında, obeziteye bağlı lipit çeşitlerini ve bu lipitlerin miktarlarındaki farklılıkları belirlemek amacıyla HPLC-ELSD (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – Evaporatif Işık Saçılım Dedektörü) tekniği kullanıldı. Optimizasyon aşamasında literatüre göre denenen metotların yeterli olmadığı anlaşıldı (**Perona ve Ruiz-Gutierrez, 2005, Descalzo v.d., 2003**). HPLC-ELSD deneyleri için halen kullanılmakta olan en son metot, çakışan lipit bantlarını ayrıştıracak şekilde ve yeni lipit bantları elde edecek şekilde geliştirildi ve lipitlerin tayini bu metotla yapıldı (**Olsson v.d., 2011, Restuccia v.d., 2011**). Klasik Folch metodu geliştirildi ve lipitlerin tayini bu yeni metotla yapıldı.

3.8.2. Lipit Ekstraksiyonu

HPLC-ELSD deneylerinde kullanılacak olan DBAJ kontrol fare ırklarının; BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 obez inbred fare ırklarının GF ve IF dokularından lipit ekstraksiyonuna başlanmadan önce, en etkili lipit ekstraksiyon metotları araştırıldı. Denenen

farklı metotlar arasında, en efektif protokol olan klasik Folch metodunun, lipit ekstraksiyon metodu olarak kullanılmasına karar verildi (**Folch v.d., 1957; Iverson v.d. 2001**). Özetle, kloroform ve metanol kullanılarak (2:1, v/v), son hacmi kullanılan dokunun yirmi katı olacak şekilde ULTRA-TURRAX T25 cihazı ile bir dakika boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenat kırk dakika boyunca orbital çalkalayıcı kullanılarak karıştırıldı. Daha sonra, homojenatta kalabilecek olan herhangi bir katı maddeyi bertaraf edebilmek için, santrifujde 2000 rpm hızında beş dakika boyunca santrifüjlendi. Katı fazından arınan homojenatın içine daha sonra 0.9%’ luk NaCl solüsyonu katıldı. Elde edilen karışım, oda sıcaklığında on dakika boyunca 2500 rpm’ de santrifüjlendi. Santrifüj sonucunda oluşan iki katmanlı fazın, alt katmanı HPLC-ELSD deneyleri için toplanırken, üst katman fazı içinde lipit kalması ihtimaline karşı, toplanıp üzerine kloroform ve metanol eklenerek bir kere daha 2500 rpm’ de santrifüjlendi. Böylece, ilk santrifüjden elde edilen üst fazda kalan lipitler geri kazanıldı. Lipitlerin, kullanılan deney tüpünün çeperine yapışması için, örnekler azot gazıyla kurutuldu. Örnekler, bir sonraki deneye kadar daha iyi muhafaza edilebilmeleri için buzdolabında - 20°C’ de saklandı.

3.8.3. HPLC-ELSD Deneyleri

HPLC-ELSD analizleri, Waters Alliance HPLC e2695 Separations Module enstrümanı ve Waters 2424 ELS dedektörü ile yapıldı. Analizlerde Agilent Polaris-Si marka silika dolgululu (150 x 4.6 mm, 3 µm partikül büyüklüğü) kolonu kullanıldı. Deneye başlanmadan önce, kullanılacak olan kolon, mobil çözücüler olan n-hekzan, izopropanol, metanol, asetik asit ve trietilamin ile iki saat kadar kalibre edildi (<http://www.nestgrp.com/pdf/colcare.pdf>). HPLC deneylerinde esas olan kolon şartlandırılması ise, kullanılan metodun süresi göz önüne alınarak, her defasında dörtten az olmamak koşuluyla gerçekleştirildi.

Optimizasyon aşamasında, denenen metotların yeterli olmadığı anlaşıldı ve tutulma süreleri birbirine çok yakın olduğu için ayrıışmayan, kullanılan çözücülerin özelliğinden dolayı bir arada çıkan lipitleri ayıracak ve çözünürlüğü arttıracak kendine has yeni bir metot geliştirildi. Kolon ve örnek odacıklarının, ve dedektörün sıcaklığının değiştirilmesi, gaz akışının hızlandırılması ve çözücülere trietilamin ve asetik asitin eklenmesiyle optimizasyon aşamasında denenen bütün metotlardan daha iyi sonuç elde edildi. Bu metotla, polarite değerleri ve molekül ağırlıkları birbirine yakın olan kolesteril oleat, gliseril trioleat, kolesterol ya da 1-oleoil-rak-gliserol gibi lipitlerin birbirinden ayrımı başarıyla gerçekleştirildi. Ayrıca, kromatogramların fosfolipit bölgesindeki düşük çözünürlüğü de, bu yeni metotla bertaraf edildi.

Kolon sıcaklığı, deneyde 22 °C olacak şekilde ayarlandı. Standartların ve örneklerin yürütüldüğü sıcaklık ise 25 °C olarak tutuldu. Metotta mobil çözücüler için gradyan akışlı metot uygulandı. Çözücü A (n-hekzan) ve çözücü B (isopropanol, metanol, asetik asit ve trietilamin (60:40:0,2:0,1, wt) zamana bağlı olarak farklı gradyantlarda kullanıldı (Tablo 3). Mobil çözücülerin total akış hızı 0,8 ml/dk olarak ayarlandı fakat Triglisetiri Digleseritten daha iyi ayırt edebilmek için ilk 3 dakika daha yuksek (1,2 ml/dk) akış hızı ayarlandı. ELS dedektöründe nebülizör için soğutucu modu seçildi (örnek kaybını azaltmak için). Dedektörün sıcaklığı 70°C olup, dedektöre gelen gaz akış hızı ise, 60 psi (4.13 bar) olarak ayarlandı.

Tablo 3. HPLC deneylerinde kullanılan mobil fazların akış hızı ve zamana bağlı gradyanları

SÜRE (Dk.)	DEBİ (ml/dk)	A (%)	B (%)
0	1.20	100	0
3.00	1.00	100	0
6.00	0.80	80	20
16.00	0.80	60	40
18.00	0.80	0	100
23.00	0.80	0	100
26.00	0.80	90	10
28.00	0.80	100	0

3.8.4. HPLC-ELSD Standartların hazırlanması

DBAJ, ve BFMI inbred farelerinin GF ve IF dokularından elde edilen lipitlerin nitel ve nicel karakterizasyonu için, trigliserit (TG), digliserit (DG), kolesterol (CHOL), monogliserit (MG) ve fosfatidilkolin (PC) standartları 1.5 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. Standartlar kloroform-metanol (2:1, v/v) karışımında çözüldü (**Avalli v.d., 2005**). Elde edilen çözeltiler belirtilen metoda göre HPLC-ELSD enstrumanında yukarıda belirtilen gradyan akış hızı ve

sıcaklık şartlarında, 5 µl (trigliserit için) ve 10 µl (diğer lipitler için) alınarak yürütüldü ve sonucunda kromatogram elde edildi.

Yürütülmüş olan örneklerin lipitlerinin miktarını kesin olarak tayin edebilmek için, standartlar farklı molaritelerde yürütüldü. Bunun sebebiyse, bu farklı konsantrasyonlar arasında kalan örnek lipitlerinin miktarını belirleyebilmektir. Bundan dolayı, her bir standart için ayrı bir kalibrasyon eğrisi Waters Empower Pro adlı bilgisayar programı kullanılarak çizildi.

3.8.5. HPLC-ELSD Örneklerin hazırlanması

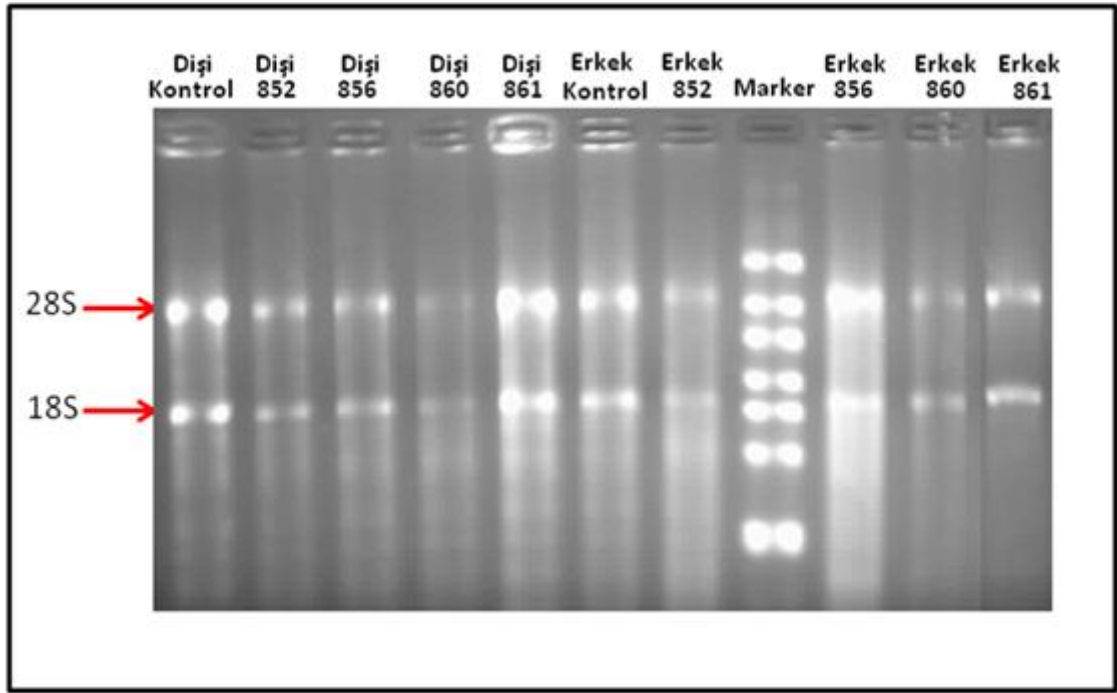
DBAJ, ve BFMI inbred farelerinin GF ve IF dokularından klasik Folch metoduyla elde edilen lipitler, -20°C' de muhafaza edildikleri yerden çıkartılıp, 6 ml kloroform ve metanol (2:1, v/v) solüsyonlarında çözünerek HPLC viallere 1.5 µg olarak dağıtıldı ve HPLC-ELSD cihazına yukarıda bahsedilen geliştirdiğimiz metoda uygun yürütüldü ve sonucunda kromatogram elde edildi. Lipit standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak örneklerin lipit kompozisyonları tayin edildi.

3.9. QRT-PCR Çalışmaları

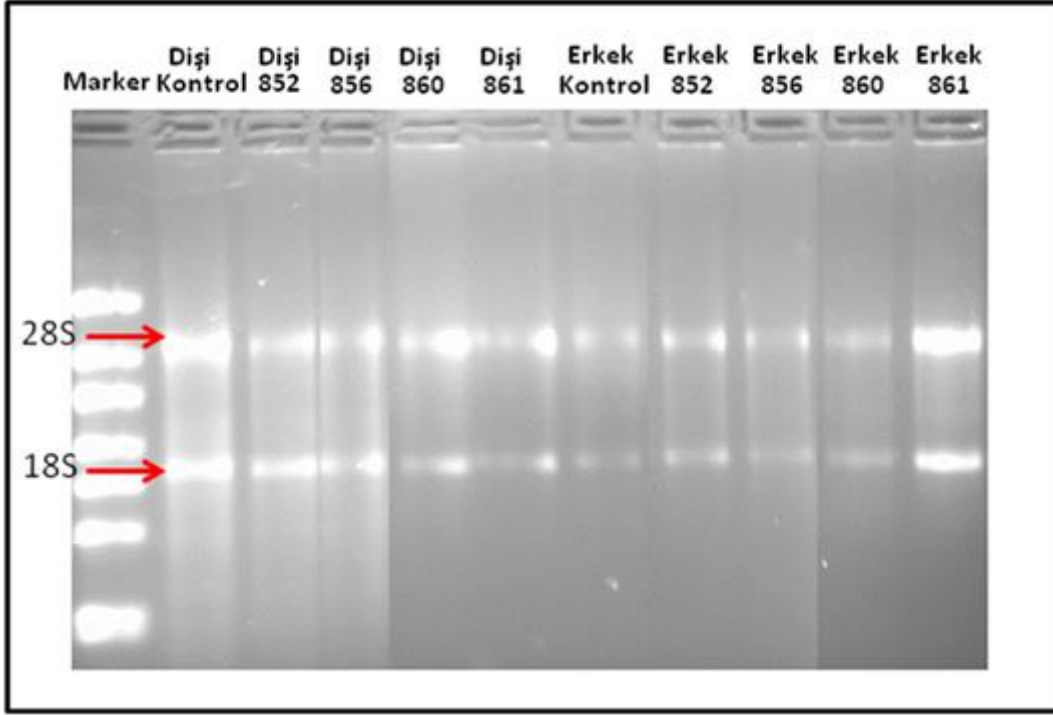
3.9.1. RNA İzolasyon Deneyleri

Projede belirtildiği gibi, RNA izolasyon deneyleri öncelikle Macherey-Nagel NucleoSpin RNA II kiti ile denendi. Fakat, adipoz doku içerisindeki yağ miktarının normal dokulara göre çok yüksek olması nedeniyle yeterli miktarda RNA elde edilemedi. Bunun üzerine, bu dokulardan Trizol ile RNA izole edilmeye çalışıldı. Literatürdeki yöntemler denendi **(Chomczynski ve Sacchi, 1987; Lee v.d., 2009; Mendez v.d., 2011; Ong v. d., 2009)** ve elde edilen protokollere birkaç basamak eklenip, yöntemler modifiye edilerek elimizdeki adipoz dokulardan RNA elde edilebilecek bir metod oluşturuldu. Bu metoda göre; 100 mg doku kesilerek üzerine 1ml Tri-Reagent eklendi ve dokular matkap ve özel teflon uçlu homojenizatör ile özel tüpü içinde homojenize edildi. Homojenize edilen ve tamamen trizol içinde parçalanmış dokular, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra doku içindeki yağın ayrılabilmesi için 3000xg'de 20 dakika santrifüj edilip üst kısımda kalan yağ bırakılarak altta kalan trizol kısmı alınıp 1.5 ml'lik tüplere aktarıldı. Üzerine 0.3ml kloroform eklenip vorteks cihazında kloroform ile içinde parçalanmış dokular bulunan trizol şiddetli bir şekilde karıştırıldı ve 15 dakika oda

sıcaklığında bekletildi. Daha sonra bu karışım 12000xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu basamağın sonunda elimizdeki karışım üç ayrı faza ayrıldı. Bu fazlardan en alttaki proteinlerden oluşan kırmızı renkteki kısım organik fazdır, ortada DNA fazı ve en üstte de aköz faz olan RNA fazı bulunmaktadır. Üstte bulunan RNA fazı başka bir tüpe geçirildi, üzerine 0.5ml izopropanol eklendi ve takiben 15 dakika buzda inkübe edildi. Bundan sonraki aşamada, karışım 18000xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant dökülüp tüpün dibinde kalan RNA pelleti taze olarak hazırlanan %75'lik 1 ml etanol ile yıkandı ve 18000xg'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Son olarak, supernatant olan etanol dökülüp RNA'nın tamamen etanolden arınması için, örnek ateş yanında bekletilerek kurutuldu ve RNA üzerine, 50µl DEPC (Diethylpyrocarbonate) ile muamele edilen su konularak çözülmesi sağlandı. Dişi ve Erkek örnekler için IF ve GF dokularından izole edilen RNA'ların jel görüntüleri sırasıyla Şekil 11 ve 12'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Dişi ve erkek fare IF adipoz dokusundan elde edilen RNAların jel fotoğrafı



Şekil 12. Dişi ve erkek fare GF adipoz dokusundan elde edilen RNAların jel fotoğrafı

3.9.2. DNaz Muamele Deneyleri

Trizol ile elde edilen RNAlar içinde bir miktar genomik DNA olduğu için DNaz muamele kiti (Fermentas DnaseI kit) kullanılarak daha sonra yapılacak olan PCR (Polymerase Chain Reaction) ve RT-QPCR (Reverse Transcriptase Quantitative PCR) deneyleri için genomik DNAlar ortamdaki uzaklaştırıldı. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen her bir RNA örneği 2 µg olacak şekilde hesaplandı ve 15 µl'ye tamamlanacak şekilde DNaz ve RNaz içermeyen su eklendi. 2 µg RNA için 2 µl MgCl₂ içeren 10X'lik reaksiyon tampon, 1 µl RNaz inhibitörü ve 2 µl DNaz enzimi eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 2 µl EDTA eklenerek 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bu işlem RNA'nın yüksek sıcaklıkta hidrolize olmasını engellemek amacı ile yapıldı.

3.9.3. cDNA Sentezi Deneyleri

Elde edilen her biri 22 µl olan saf RNAlar'dan cDNA elde edilebilmesi için cDNA sentez kiti kullanıldı (Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit). cDNA sentezi için kit içinde bulunan kılavuzdaki talimatlara göre deneyler yapıldı. İlk olarak 2 µl OligodT eklenerek

65°C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra reaksiyona 8 µl 5X'lik reaksiyon tampon çözelti, 10Mm'lık dNTP karışımı, 2µl Ribolock RNAz inhibitörü ve 2 µl RevertAid Reverse Transkriptaz enzimi eklendi. Bu karışım sırasıyla 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakika bekletilmiş ve 4°C'ye soğutulduktan sonra elde edilen cDNAlar -20°C'de saklandı.

3.9.4. RT-PCR ve QRT-PCR Deneyleri

RT-QPCR deneylerine geçmeden önce, oligoların çalıştığı en uygun sıcaklığı bulabilmek için RT-PCR deneyleri yapıldı. Kullanılan oligolar Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. QRT-PCR deneylerinde kullanılan oligolar ve ampikon uzunlukları

Genler	Oligo	Oligo Sekansları	Ampikon Uzunluğu
Beta actin	Forward Oligo	5'- TGTCCACCTTCCAGCAGATGT- 3'	101 bp
	Reverse Oligo	5' – AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA -3'	
Leptin	Forward Oligo	5' – AGACCGGGAAAGAGTG -3'	204 bp
	Reverse Oligo	5' – GCCATAGTGCAAGGTT -3'	
Igf-1	Forward Oligo	5' – AGAAGGTGCTGTTGAGTAA -3'	190 bp
	Reverse Oligo	5' – AACTAGAAGTCAGAAGTGTCA -3'	
Tnf-α	Forward Oligo	5' – CCACCACGCTCTTCTGTCTA -3'	184 bp
	Reverse Oligo	5' – AGCTGCTCCTCCACTTGGTG -3'	
Pparγ-2	Forward Oligo	5' – TCTGGGAGATTCTCCTGTTGA -3'	112 bp
	Reverse Oligo	5' – GGTGGGCCAGAATGGCATCT -3'	

RT-PCR deneyleri sonucu elde edilen oligoların çalıştığı en uygun sıcaklık bilgisi kullanılarak QRT-PCR deneyleri yapılmaya başlandı. Bu deneylerde, Sybr Green kiti (Roche Fast Start Universal SYBR Green Master) ve kitin içinde bulunan kılavuzdaki karışım oranları

kullanılarak deneyler yapıldı. Kullanılan malzemelerin miktarları her gen için ayrı ayrı optimize edildi. Kullanılan malzemeler miktarlarıyla birlikte Tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5. QRT-PCR deneylerinde kullanılan genlerin ve internal kontrol geninin reaksiyon karışımları

	Leptin	Igf-1	Tnf- α	Ppar γ -2	Beta actin
SybrGreen Karışımı	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
ForwardOligo (5 μ M)	2 μ l	2 μ l	0,5 μ l	2 μ l	2 μ l
Reverse Oligo (5 μ M)	2 μ l	2 μ l	0,5 μ l	2 μ l	2 μ l
cDNA	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Saf su	4 μ l	4 μ l	7 μ l	4 μ l	4 μ l
Son Hacim	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

QRT-PCR deneylerinde kullanılan aday genlerin reaksiyon koşulları belirlenmiştir. Tablo 6-10'da her gen için belirlenen reaksiyon koşulları verilmiştir.

Tablo 6. Beta actin geni için reaksiyon koşulları

İlk Denatürasyon	95 $^{\circ}$ C	15 dakika	Tekrarlanan Döngü
Denatürasyon	95 $^{\circ}$ C	30 sn	} 40 Döngü
Yeniden birleşme	60 $^{\circ}$ C	30 sn	
Uzatma	72 $^{\circ}$ C	30 sn	
Erime	50 $^{\circ}$ C – 99 $^{\circ}$ C	-	

Tablo 7. Tnf- α geni için reaksiyon koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	15 dakika	Tekrarlanan Döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	} 40 Döngü
Yeniden birleşme	55°C	30 sn	
Uzatma	72°C	30 sn	
Erime	50°C – 99°C	-	

Tablo 8. Ppary-2 geni için reaksiyon koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	15 dakika	Tekrarlanan Döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	} 40 Döngü
Yeniden birleşme	55°C	30 sn	
Uzatma	72°C	30 sn	
Erime	50°C – 99°C	-	

Tablo 9. Leptin geni için reaksiyon koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	15 dakika	Tekrarlanan Döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	} 40 Döngü
Yeniden birleşme	55°C	30 sn	
Uzatma	72°C	30 sn	
Erime	50°C – 99°C	-	

Tablo 10. Igf-1 geni için reaksiyon koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	15 dakika	Tekrarlanan Döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	} 40 Döngü
Yeniden birleşme	54°C	30 sn	
Uzatma	72°C	30 sn	
Erime	50°C – 99°C	-	

3.10. İstatistiksel Analiz

Kontrol ve BFMI grupları arasındaki değişimler ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığın hesaplanması için One-way ANOVA yöntemi ve art analiz olarak Dunnett's testi kullanılarak tüm gruplar kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu karşılaştırılma sırasında istatistiksel anlamlılık BFMI ırkına göre tespit edilmişse # işareti ile, DBAJ ırkına göre tespit edilmişse * işareti ile gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 şeklinde belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu proje kapsamında yapılan çalışmalar 3 ana alt başlık altında rapor edilmiştir:

1. Adipoz dokuların spektroskopik incelenmesi
 - a) ATR-FTIR spektroskopisi çalışmaları,
 - b) Spektral datalardan protein ikincil yapılarının tayini
 - c) ATR-FTIR spektrumlarına Kemometrik (hijerarşik kümeleme ve PCA analizi) methodların uygulanması
2. FTIR mikrospektroskopisi ile görüntüleme çalışmaları çalışmaları
3. Histokimyasal ve FTIRM teknikleri ile WAT VE BAT DOKU çalışmaları
4. HPLC çalışmaları
5. Genetik çalışmalar

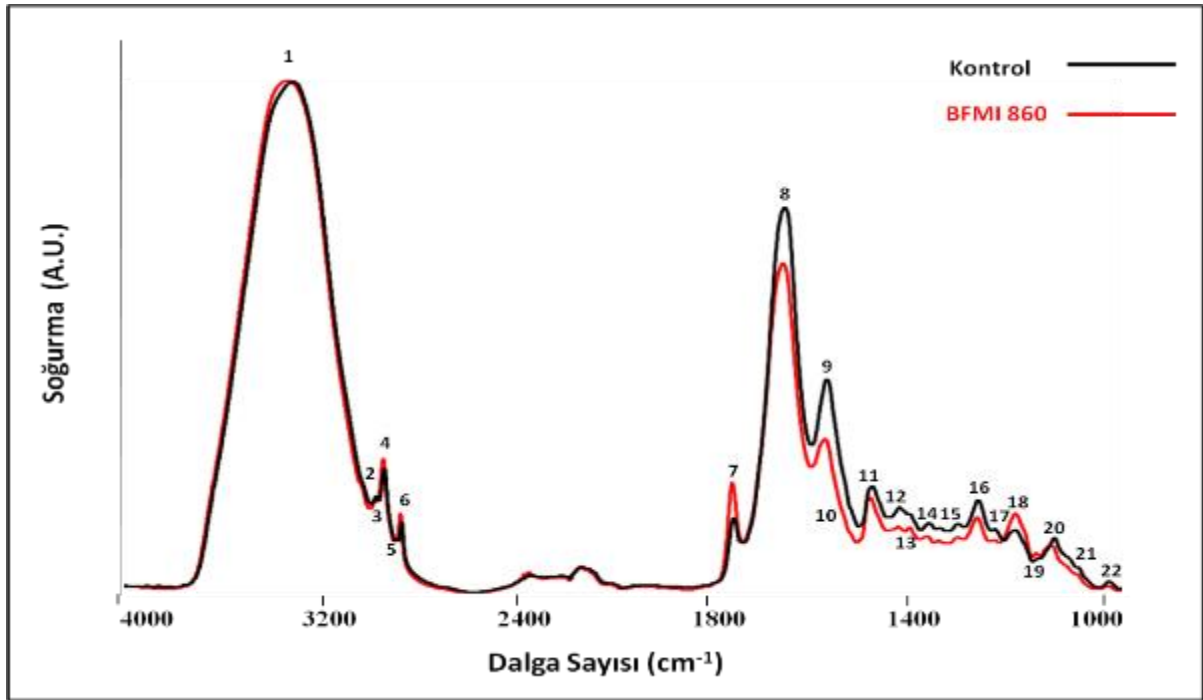
Çalıştığımız BFMI fare örneklerinde hayvanların yetiştirilmesi sırasında ve öldürülmeden önce gerçekleşen fare ırklarının vücut ağırlıklarında görülen değişimler ile fare ırkları serum parametreleri ve ipITT sonuçları projenin sonunda ek 1 de verilmiştir.

4.1. Adipoz dokuların spektroskopik incelenmesi

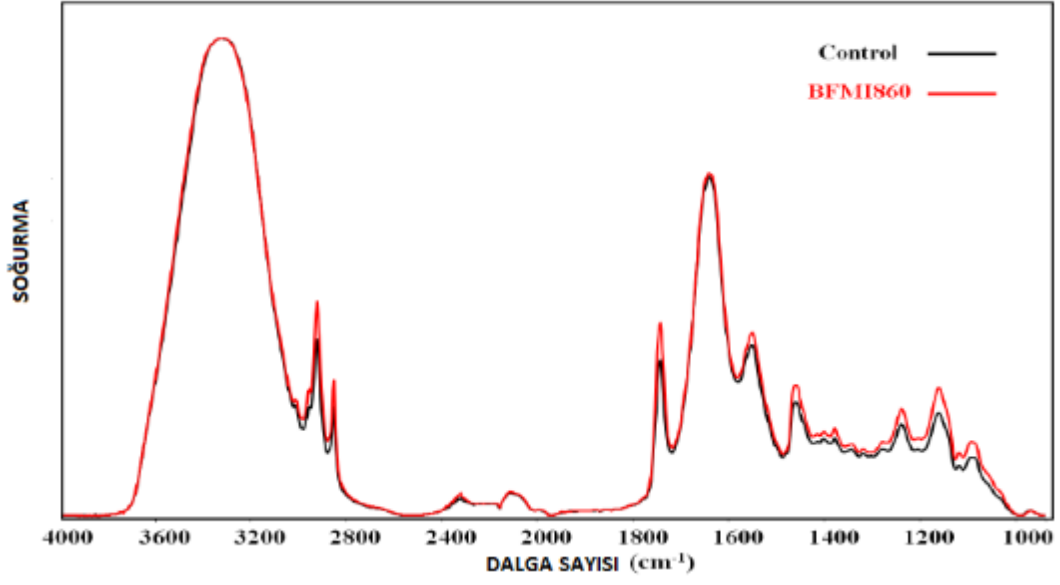
4.1.1 ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmaları

ATR-FTIR spektroskopi tekniği, moleküllerin değişik dalga boylarındaki titreşim gruplarını görüntüleyerek bu moleküllerin yapısal, fonksiyonel ve dinamik özelliklerinin karakterize edilmesine olanak sağlar. Bu teknik, obez fare modellerinde IF ve GF adipoz doku molekülleri (lipit,protein,karbonhidrat, kolajen ve nükleik asitlerin) relatif miktarlarının ve dinamiğinin tespiti ve yapısal özelliklerinin araştırması amacıyla kullanılmıştır.

FT-IR spektroskopisi yöntemi kullanılarak elde edilen spektrumda farklı moleküllerde bulunan değişik fonksiyonel gruplardan kaynaklanan karakteristik soğurma bantları bulunmaktadır. (Mantsch, 1984; Diem v.d., 1999; Cakmak v.d., 2006, Cakmak v.d., 2011). Örnek olarak Şekil 13 de IF yağ dokusunun kontrol ve BMFI860 ırkının ortalama spektrumunun 4000-950 cm^{-1} frekans aralığındaki soğurma bantları gösterilmiştir. Şekil 13'de numaralandırılmış bantların tanımları literatüre göre Tablo 11'de belirtilmiştir. Verilen band tanımları GF adipoz dokuları için de geçerlidir. Şekil 14'de ise GF yağ dokusunun kontrol ve BMFI860 ırkının ortalama spektrumunun 4000-950 cm^{-1} frekans aralığındaki soğurma bantları gösterilmiştir.



Şekil 13. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFMI860 erkek fare ırkları inguinal adipoz dokularına ait 4000-950 cm^{-1} frekans aralığında 3307 cm^{-1} 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.



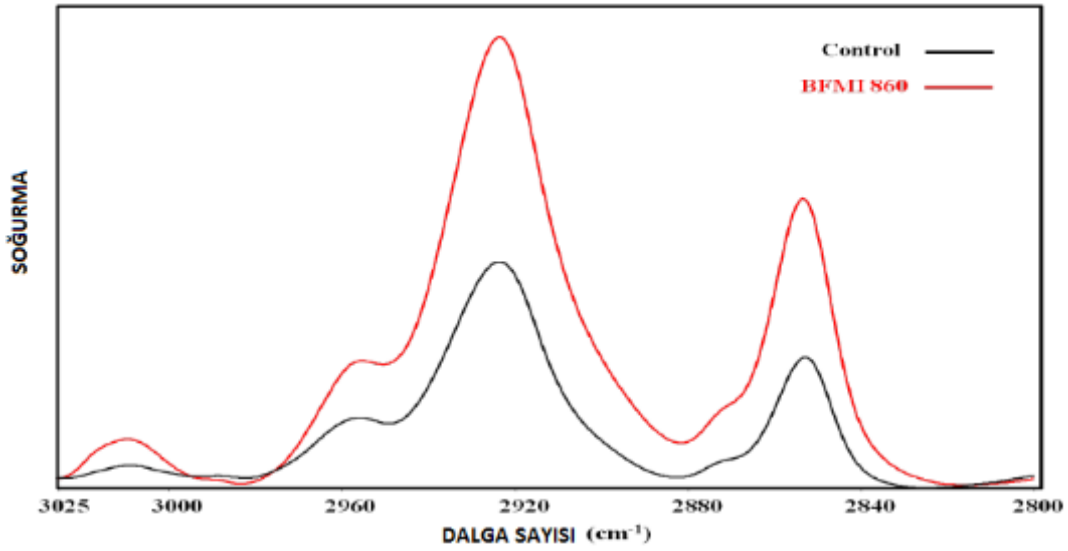
Şekil 14. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFM1860 erkek fare ırkları gonadal adipoz dokularına ait 4000-950 cm⁻¹ frekans aralığında 3307 cm⁻¹'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.

Tablo 11. Adipoz dokusu IR spektrumundaki başlıca soğurmalar (Rigas v.d., 1990; Wong v.d., 1991; Takahashi v.d., 1991; Jackson v.d., 1998; Lyman v.d., 1999; Melin v.d., 2000; Cakmak v.d., 2006; Toyran v.d., 2006; Movasaghi v.d., 2008; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010).

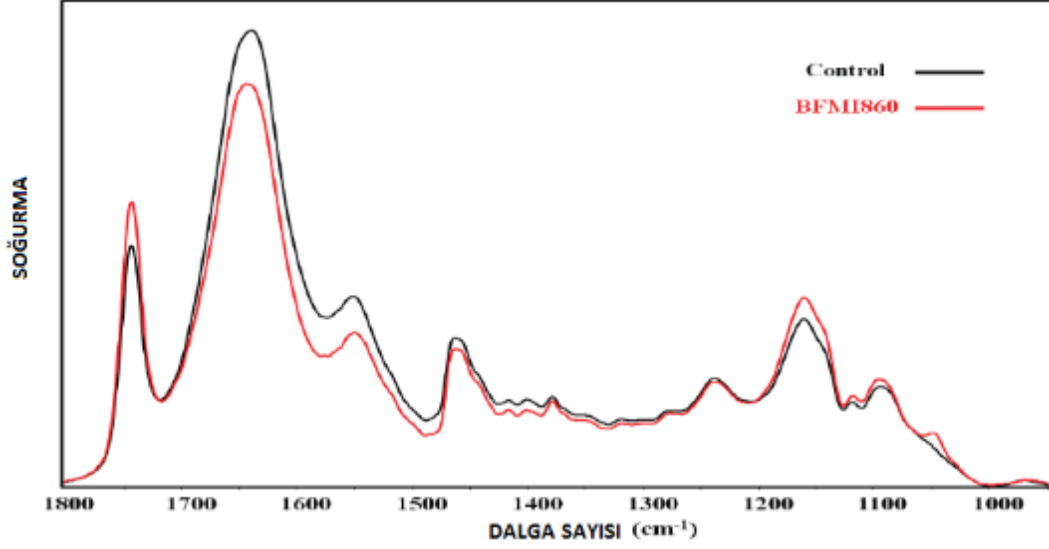
Bant No	Frekans (cm ⁻¹)		Tanım
	GF	IF	
1	3307	3307	Amid A: N-H gerilme, protein
2	3009	3009	Olefinik HC=CH gerilme: doymamış lipit,
3	2957	2957	CH ₃ antisimetrik gerilme: lipit ve protein
4	2923	2925	CH ₂ antisimetrik gerilme: çoğunlukla lipit
5	2873	2873	CH ₃ simetrik gerilme: başlıca protein
6	2853	2854	CH ₂ simetrik gerilme: başlıca lipit
7	1743	1743	Kolesterol-Ester C=O gerilme: lipit
8	1642	1642	Amid I:protein (80% C=O gerilme, 10% N-H bükülme, 10% C-N gerilme)
9	1551	1551	Amid II: protein (60% N-H bükülme, 40% C-N gerilme)
10	1457	1455	CH ₂ bükülme: lipit
11	1416	1410	C-H ve N-H deformasyon, C-N gerilme çoğunlukla aminoasit
12	1400	1402	COO ⁻ simetrik gerilme: yağ asitleri ve aminoasitler
13	1377	1382	C-O gerilim, protein ve karbonhidrat
14	1366	1368	C-O gerilim, protein ve karbonhidrat
15	1345	1343	CH ₂ kolajen yan zincir titreşimleri
16	1280	1281	Kolajen, amid III protein
17	1235	1239	Ağırlıklı olarak Nükleik asit, az miktarda da PO ₂ ⁻ Antisimetrik Gerilim Titreşimleri, fosfolipitlerin katkısı
18	1158	1162	CO–O–C antisimetrik gerilim: fosfolipitler, trigliseritler ve kolesterol esterler
19	1118	1118	RNA içindeki ribozun C-OH grubu C-O gerilim titreşimleri
20	1093	1083	PO ₂ ⁻ simetrik gerilim, nükleik asit ve fosfolipitler
21	1027	1030	Glikojen, polisakkaritler, karbonhidratlar
22	970	971	Nükleik asit, Riboz, PO ₄ ,

Spektrumlerde görülen bantların pik konumları (frekans değeri), bant alanları, bant alan oranları ve bant genişliği hesaplanarak detaylı spektrum analizleri yapılmıştır. Infrared bantlarının sinyal şiddetleri ve bu bantların altında kalan alanlar, ait olduğu fonksiyonel grubun konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir (Freifelder, 1982; Takahashi v.d., 1991; Liu v.d., 2002; Severcan v.d., 2005a; Cakmak v.d., 2006; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010).

Değişimleri görsel olarak daha açık bir şekilde izlemek için iki spektral bölge seçilmiştir. Şekil 15 ve 16 da ise örnek olarak kontrol ve BFMI860 obez erkek fare modeli GF adipoz dokusuna ait sırasıyla 3025-2800 cm^{-1} ve 1800-950 cm^{-1} aralığında, amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar verilmiştir.



Şekil 15. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFMI860 erkek fare ırkları gonadal adipoz dokularına ait 3025-2800 cm^{-1} frekans aralığında 3307 cm^{-1} 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.



Şekil 16. SBD ile beslenmiş kontrol DBAJ ve BFMI860 erkek fare ırkları gonadal adipoz dokularına ait 1800-950 cm^{-1} frekans aralığında 3307 cm^{-1} 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.

Şekil 13, 14 ve daha belirgin olarak Şekil 15' de görülen bantlar, olefinik HC=CH gruplarındaki C-H gerilmelerinin titreşimlerinden (2 nolu band) , CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinden (band 3) , CH₂ antisimetrik gerilme titreşimlerinden (band 4), CH₃ simetrik gerilme titreşimlerinden (band 5) ve CH₂ simetrik gerilme (band 6) titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (**Watts ve De Pont, 1986; Severcan v.d., 2000; Severcan v.d., 2005a; Cakmak v.d., 2006; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010**). Bu bölgede bulunan CH₂ antisimetrik, CH₂ simetrik ve CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinin bant şiddetleri veya bant alanları olarak sistemdeki lipit miktarı ve CH₃ simetrik gerilme titreşimlerinin bant şiddeti ve alanı ise sistemdeki protein miktarları hakkında bilgi vermektedir (**Mantsch, 1984; Severcan v.d., 2000, Cakmak v.d., 2011**).

Tüm dokular için elde edilen başlıca fonksiyonel grupların normalize edilmemiş orijinal spektrumlar üzerinden elde edilen frekans değerleri Ek-2 de (Ek 2 Tablo 1-4) ve bant alanı, değerlerindeki değişimler ise Tablo 12-19'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

GF Dişi Alan (cm ⁻¹)	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	1,54 \pm 0,05	1,78 \pm 0,04* \uparrow	1,74 \pm 0,07	1,80 \pm 0,06* \uparrow	1,83 \pm 0,07 ** \uparrow
2957	1,53 \pm 0,02	1,57 \pm 0,01	1,60 \pm 0,01	1,44 \pm 0,01** \downarrow	1,34 \pm 0,02*** \downarrow
2923	3,77 \pm 0,19	3,75 \pm 0,16	3,92 \pm 0,28	3,59 \pm 0,18	3,42 \pm 0,25
2873	0,34 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02	0,29 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02
2853	1,19 \pm 0,08	1,17 \pm 0,07	1,26 \pm 0,11	1,18 \pm 0,08	1,09 \pm 0,10
1743	2,48 \pm 0,19	2,03 \pm 0,14	2,29 \pm 0,24	2,07 \pm 0,20	2,03 \pm 0,22
1642	11,53 \pm 0,64	11,02 \pm 0,50	10,87 \pm 0,68	11,18 \pm 0,62	10,78 \pm 0,64
1551	4,32 \pm 0,32	3,50 \pm 0,24	3,44 \pm 0,28	3,79 \pm 0,32	3,57 \pm 0,33
1457	0,63 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01*** \downarrow	0,54 \pm 0,01*** \downarrow	0,58 \pm 0,01* \downarrow	0,57 \pm 0,02** \downarrow
1416	0,45 \pm 0,02	0,38 \pm 0,02	0,43 \pm 0,02	0,40 \pm 0,02	0,39 \pm 0,02
1400	0,62 \pm 0,03	0,50 \pm 0,03	0,50 \pm 0,03* \downarrow	0,53 \pm 0,03	0,48 \pm 0,04* \downarrow
1377	0,48 \pm 0,01	0,40 \pm 0,01*** \downarrow	0,41 \pm 0,01** \downarrow	0,42 \pm 0,01** \downarrow	0,37 \pm 0,02*** \downarrow
1366	0,29 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01** \downarrow	0,32 \pm 0,01* \downarrow	0,29 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01*** \downarrow
1345	0,64 \pm 0,02	0,60 \pm 0,03	0,60 \pm 0,02	0,58 \pm 0,02	0,58 \pm 0,03
1280	0,48 \pm 0,02	0,39 \pm 0,01*** \downarrow	0,44 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01
1235	1,62 \pm 0,03	1,61 \pm 0,03	1,71 \pm 0,06	1,60 \pm 0,03	1,61 \pm 0,06
1158	3,19 \pm 0, 26	2,86 \pm 0,18	3,16 \pm 0,36	2,86 \pm 0,28	2,77 \pm 0,29
1118	0,41 \pm 0,03	0,37 \pm 0,02	0,46 \pm 0,05	0,35 \pm 0,03	0,36 \pm 0,04
1093	1,06 \pm 0,06	0,93 \pm 0,04	1,01 \pm 0,09	0,90 \pm 0,06	0,90 \pm 0,07
1027	0,17 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00*** \downarrow	0,07 \pm 0,01*** \downarrow	0,09 \pm 0,00*** \downarrow	0,11 \pm 0,01*** \downarrow
970	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00

Tablo 13. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

GF Erkek Alan (cm ⁻¹)	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	1,66 \pm 0,07	1,60 \pm 0,06	1,69 \pm 0,11	1,55 \pm 0,08	1,45 \pm 0,04
2957	1,41 \pm 0,02	1,56 \pm 0,01*** \uparrow	1,67 \pm 0,04*** \uparrow	1,56 \pm 0,01*** \uparrow	1,47 \pm 0,01
2923	3,52 \pm 0,19	4,42 \pm 0,21	4,65 \pm 0,30* \uparrow	4,40 \pm 0,32	4,04 \pm 0,17
2873	0,30 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01* \uparrow	0,37 \pm 0,02** \uparrow	0,33 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01
2853	1,10 \pm 0,08	1,52 \pm 0,09* \uparrow	1,53 \pm 0,13* \uparrow	1,51 \pm 0,14* \uparrow	1,29 \pm 0,07
1743	2,16 \pm 0,22	2,55 \pm 0,20* \uparrow	2,82 \pm 0,29* \uparrow	2,96 \pm 0,27*** \uparrow	2,74 \pm 0,14*** \uparrow
1642	10,74 \pm 0,78	8,92 \pm 0,69	9,12 \pm 0,91	8,80 \pm 0,67	8,48 \pm 0,48
1551	3,49 \pm 0,42	2,66 \pm 0,32	2,83 \pm 0,42	2,63 \pm 0,29	2,34 \pm 0,21
1457	0,57 \pm 0,01	0,52 \pm 0,00** \downarrow	0,59 \pm 0,01	0,66 \pm 0,01*** \uparrow	0,64 \pm 0,00*** \uparrow
1416	0,38 \pm 0,03	0,34 \pm 0,02	0,39 \pm 0,03	0,36 \pm 0,02	0,31 \pm 0,01
1400	0,47 \pm 0,05	0,38 \pm 0,03	0,41 \pm 0,05	0,38 \pm 0,03	0,32 \pm 0,02*
1377	0,33 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01	0,42 \pm 0,02*** \uparrow	0,41 \pm 0,01* \uparrow	0,37 \pm 0,01
1366	0,28 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01*** \downarrow	0,29 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01*** \uparrow	0,21 \pm 0,00*** \downarrow
1345	0,55 \pm 0,03	0,49 \pm 0,02	0,56 \pm 0,03	0,40 \pm 0,02** \downarrow	0,48 \pm 0,01
1280	0,53 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01***	0,39 \pm 0,01***	0,61 \pm 0,00*** \uparrow	0,67 \pm 0,01*** \uparrow
1235	1,59 \pm 0,03	1,78 \pm 0,02*** \uparrow	1,79 \pm 0,04*** \uparrow	1,52 \pm 0,06	1,37 \pm 0,02*** \uparrow
115	3,02 \pm 0,30	3,74 \pm 0,25	3,75 \pm 0,38	3,87 \pm 0,36	3,75 \pm 0,18
1118	0,38 \pm 0,04	0,50 \pm 0,03	0,50 \pm 0,05	0,47 \pm 0,04	0,48 \pm 0,02
1093	0,97 \pm 0,06	1,14 \pm 0,05	1,15 \pm 0,06	1,14 \pm 0,08	1,05 \pm 0,03
1027	0,12 \pm 0,01	0,10 \pm 0,00* \downarrow	0,09 \pm 0,01** \downarrow	0,10 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00
970	0,04 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00

Tablo 14. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

IF Dişi Alan (cm ⁻¹)	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	1,87 \pm 0,04	1,42 \pm 0,02*** \downarrow	1,52 \pm 0,03*** \downarrow	1,43 \pm 0,06*** \downarrow	1,50 \pm 0,03*** \downarrow
2957	1,59 \pm 0,05	1,66 \pm 0,04	1,39 \pm 0,02* \downarrow	1,44 \pm 0,07	1,42 \pm 0,03* \downarrow
2925	2,91 \pm 0,17	3,27 \pm 0,13	2,95 \pm 0,07	3,23 \pm 0,22	2,89 \pm 0,05
2873	0,30 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01	0,27 \pm 0,00	0,33 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01
2854	0,76 \pm 0,05	0,96 \pm 0,05* \uparrow	0,85 \pm 0,03	0,94 \pm 0,08	0,84 \pm 0,02
1743	0,98 \pm 0,08	1,22 \pm 0,08	1,29 \pm 0,11	1,36 \pm 0,24	1,23 \pm 0,13
1642	17,32 \pm 0,57	14,43 \pm 0,52* \downarrow	14,39 \pm 0,61* \downarrow	14,50 \pm 1,08* \downarrow	13,97 \pm 0,67* \downarrow
1551	9,35 \pm 0,55	6,30 \pm 0,47** \downarrow	5,68 \pm 0,47** \downarrow	6,72 \pm 0,93* \downarrow	5,72 \pm 0,64** \downarrow
1455	0,96 \pm 0,05	0,48 \pm 0,10*** \downarrow	0,56 \pm 0,03*** \downarrow	0,72 \pm 0,07* \downarrow	0,67 \pm 0,05* \downarrow
1410	0,57 \pm 0,03	0,58 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02*** \downarrow	0,66 \pm 0,08	0,54 \pm 0,05
1402	1,47 \pm 0,08	0,92 \pm 0,06*** \downarrow	1,17 \pm 0,08	0,87 \pm 0,11*** \downarrow	0,87 \pm 0,09*** \downarrow
1382	0,80 \pm 0,04	0,40 \pm 0,02*** \downarrow	0,44 \pm 0,03*** \downarrow	0,53 \pm 0,05*** \downarrow	0,40 \pm 0,03*** \downarrow
1368	0,45 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01** \downarrow	0,36 \pm 0,02* \downarrow	0,44 \pm 0,03	0,35 \pm 0,02* \downarrow
1343	1,24 \pm 0,05	0,84 \pm 0,04*** \downarrow	1,17 \pm 0,08	0,98 \pm 0,08* \downarrow	0,80 \pm 0,06*** \downarrow
1281	1,12 \pm 0,05	0,71 \pm 0,04*** \downarrow	1,01 \pm 0,06	0,89 \pm 0,07* \downarrow	0,94 \pm 0,07
1239	2,61 \pm 0,15	1,87 \pm 0,13** \downarrow	1,64 \pm 0,09*** \downarrow	2,08 \pm 0,19* \downarrow	1,73 \pm 0,12*** \downarrow
1162	2,10 \pm 0,10	1,94 \pm 0,14	1,95 \pm 0,09	2,23 \pm 0,28	2,01 \pm 0,12
1118	0,37 \pm 0,02	0,22 \pm 0,02*** \downarrow	0,26 \pm 0,02** \downarrow	0,25 \pm 0,04** \downarrow	0,24 \pm 0,02** \downarrow
1083	0,98 \pm 0,07	0,88 \pm 0,07	0,80 \pm 0,02	0,88 \pm 0,09	0,91 \pm 0,05
1030	0,29 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02* \downarrow	0,14 \pm 0,01** \downarrow	0,22 \pm 0,05	0,18 \pm 0,03
971	0,08 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00*** \downarrow	0,03 \pm 0,00*** \downarrow	0,05 \pm 0,01** \downarrow	0,04 \pm 0,00*** \downarrow

Tablo 15. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

IF Erkek Alan (cm ⁻¹)	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	1,81 \pm 0,05	1,43 \pm 0,04***↓	1,74 \pm 0,06	1,43 \pm 0,03***↓	1,31 \pm 0,03***↓
2957	1,44 \pm 0,05	1,66 \pm 0,02***↑	1,92 \pm 0,04***↑	1,43 \pm 0,03	1,29 \pm 0,01**↓
2925	3,07 \pm 0,24	3,22 \pm 0,18	3,73 \pm 0,14*↑	3,25 \pm 0,11	2,84 \pm 0,09
2873	0,28 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01***↑	0,26 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01
2854	0,87 \pm 0,09	1,00 \pm 0,07	1,10 \pm 0,06	1,01 \pm 0,05	0,85 \pm 0,04
1743	1,18 \pm 0,16	1,22 \pm 0,12	1,10 \pm 0,14	1,50 \pm 0,12**↑	1,41 \pm 0,13**↑
1642	13,89 \pm 0,67	14,69 \pm 0,61	14,26 \pm 0,85	14,00 \pm 0,50	13,14 \pm 0,63
1551	5,93 \pm 0,49	6,50 \pm 0,35	6,25 \pm 0,62	6,17 \pm 0,51	4,75 \pm 0,37
1455	0,68 \pm 0,05	0,61 \pm 0,02	0,63 \pm 0,05	0,79 \pm 0,05	0,61 \pm 0,02
1410	0,55 \pm 0,04	0,59 \pm 0,02	0,57 \pm 0,06	0,54 \pm 0,03	0,50 \pm 0,03
1402	0,81 \pm 0,06	0,99 \pm 0,04***↑	0,99 \pm 0,10	0,95 \pm 0,07	0,66 \pm 0,04
1382	0,44 \pm 0,03	0,49 \pm 0,02	0,46 \pm 0,04	0,42 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02
1368	0,39 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01	0,43 \pm 0,04	0,42 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01**↓
1343	0,86 \pm 0,05	0,96 \pm 0,04	0,90 \pm 0,09	0,91 \pm 0,05	0,74 \pm 0,04
1281	0,96 \pm 0,05	1,14 \pm 0,04	0,82 \pm 0,07	0,95 \pm 0,06	0,98 \pm 0,04
1239	1,87 \pm 0,13	1,87 \pm 0,07	1,91 \pm 0,14	1,82 \pm 0,13	1,51 \pm 0,05
1162	2,26 \pm 0,25	1,59 \pm 0,13*↓	2,14 \pm 0,19	2,29 \pm 0,15	2,21 \pm 0,14
1118	0,27 \pm 0,04	0,27 \pm 0,02	0,29 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	0,26 \pm 0,02
1083	0,79 \pm 0,08	0,87 \pm 0,05	0,86 \pm 0,03	0,77 \pm 0,03	0,70 \pm 0,02
1030	0,17 \pm 0,03	0,20 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
971	0,04 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01***↓	0,02 \pm 0,00**↓

Lipit bantlarındaki (2,3,4,6, ve 10 nolu bantlar) kaymalar lipitler hakkında yapısal bilgiler verir. **(Severcan 1997, Severcan v.d. 2005a)**. Örneğin bu bantların frekans değerinde görülen düşük değerlere kayma membranda bulunan lipitlerin daha düzenli bir yapıda bulduklarını göstermektedir **(Bizeau v.d., 2000; Severcan v.d., 2003, Severcan v.d. 2005b)**. Ek Tablo 1, 2, 3 ve 4 de görüldüğü gibi olefinik bantının (2 nolu) frekans değerinde kontrol gruba göre anlamlı bir artma veya azalma görülmemiştir. Fakat, CH₃ ve CH₂ antisimetrik gerilim bantlarının frekans değerlerinde anlamlı değişiklikler görülmüştür. CH₃ antisimetrik gerilme bandı lipitlerin açıl zincirlerindeki metil grupları, CH₂ antisimetrik ve simetrik gerilim bandı ise lipitlerin açıl zincirleri hakkında yapısal ve fonksiyonel bilgi vermektedirler **(Takahashi v.d., 1991, Severcan v.d. 2005)**. CH₃ antisimetrik gerilim bandı frekans değerinde, erkek ve dişi GF'de BFMI856 ırkında kayda değer azalma görülmüş, IF'de ise dişi farelerde BFMI852, BFMI856, BFMI861 ırklarında, erkek farelerde BFMI856 ırkında anlamlı azalma tespit edilmiştir. Bu azalma, lipit düzeninde artışa işaret etmektedir. CH₂ antisimetrik gerilim bandında ise, erkek farelerde GF'de BFMI852, BFMI856, BFMI861 ırklarında frekans değerinde anlamlı azalma görülmüştür. CH₂ antisimetrik ve simetrik bantlarının pozisyonları, lipit açıl zincirlerinin esnekliği, yani lipitlerin konformasyonel düzensizlikleri hakkında bilgi vermektedir **(Umemura v.d. 1980; Casal v.d., 1984; Boyar v.d., 1997; Bozkurt v.d., 2010)**. Frekansta görülen bir azalma, sistemdeki açıl zincirlerinin daha düzenli olduğu, yani trans/gauche oranının arttığı anlamına gelmektedir **(Liu v.d. 2002; Mantsch, 1984; Severcan, 1997; Bozkurt v.d., 2010)**. Frekanstaki herhangi bir artma ise, açıl zincirlerinin düzensizliğinin arttığını, dolayısıyla trans/gauche oranının azaldığını göstermektedir **(Cameron v.d., 1979; Mantsch, 1984; Bozkurt v.d., 2010)**. Dolayısıyla CH₂ antisimetrik gerilim bandı frekans değerinde daha düşük değerlere kayma, lipit açıl zincir esnekliğinde azalma ve lipit düzeninde artışa işaret etmektedir.

3010 cm⁻¹ konumunda gözlenen ve doymamış yağ asitlerinde bulunan HC=CH gruplarının C-H bağlarındaki gerilme titreşimlerinden kaynaklanan bandın şiddeti veya altındaki alan hidrokarbon zincirlerinin doymamışlığı hakkında bilgi vermektedir **(Takahashi v.d., 1991; Melin v.d., 2000; Cakmak v.d., 2003; Severcan v.d., 2005a, Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011)**. Bu bandın alan değerlerine göre, dişi farelerin GF dokularının doymamış yağ miktarında BFMI852, BFMI860, BFMI861 ırklarında anlamlı şekilde artış, IF dokusunda BFMI852, BFMI856, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında ise anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür. Erkek fare GF dokusunda, doymamış yağ miktarında BFMI852, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında anlamlı olmayan bir şekilde azalma tespit edilmiş olup, BFMI856 ırkında ise anlamlı olmayan artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, erkek fare IF dokusunda doymamış yağ içeriğinde, BFMI852 ve BFMI860 ırklarında kayda değer biçimde azalma

meydana gelmiştir (Tablo 12, 13, 14 ve 15). Olefinik bant alanında görülen bu azalmanın nedeninin, artan lipit peroksidasyonu sonucu dokudaki doymamış yağ asitlerinin azalmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür (**Curtis v.d., 1984; Bruch v.d., 1983; Bozkurt v.d., 2010; Severcan v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**).

C-H titreşim bölgelerinde yer alan doymuş lipitlere ait ana bandların (5 ve 6 nolu bandlar) alan değerleri incelendiğinde Şekil 13 ve 15 ile Tablo 12-15 in teyit ettiği üzere, erkek GF BMFI dokularında doymuş lipitlerde kontrole göre daha belirgin anlamlı artış gözlenmiştir. Bu bize bu ırklarda erkek GF dokularında doymuş lipit miktarının arttığını göstermektedir. Aynı dokuların dişilerinde ise bu bandlar için anlamlı bir değişim elde edilememiştir. IF adipoz dokularda lipitlerdeki düşük seviyede anlamlı artım sadece erkek 856 ırkı ve dişi 852 ırkı için görülmüştür. Parmak izi bölgesinde yer alan lipitlerden kaynaklanan 1455-1457 cm^{-1} aralığındaki CH_2 bükülme bandı (10 nolu bant) alan değerlerindeki değişim de lipit içeriği hakkında bilgi vermektedir. Bu band alan değerleri incelendiğinde diğer lipit bandlarından elde edilen sonuçları destekleyici olarak GF erkek BMFI860 ve 861 ırklarında kontrole göre anlamlı değişim görülmüştür. Aksine dişi farelerde her iki dokuda bütün ırklarda kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Kontrole göre, BFMI ırkları dişi ve erkek fare IF ve GF'de bu bandın frekans değerinde anlamlı bir değişim yoktur. Ancak, bant alanı değerleri göz önüne alındığında, dişi fare IF ve GF adipoz dokularında, kontrole göre bütün BFMI ırklarında anlamlı bir azalma, erkek GF'de BFMI860 ve BFMI861 ırklarında anlamlı bir artış vardır. Buna göre, dişi farelerde her iki adipoz dokuda bütün ırklarda, lipit konsantrasyonunda azalma erkek fare GF'de BFMI852 ırkında lipit konsantrasyonunda azalma, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında ise kontrole göre lipit içeriğinde artış olduğunu gösterir (**Bozkurt v.d., 2010; Garip ve Severcan, 2010; Ozek v.d., 2010**).

BFMI ırkları ve kontrol fare GF ve IF adipoz doku spektrumları parmak izi bölgesinde yer alan, trigliseritler ve kolesterol esterlerinden kaynaklanan 1743 cm^{-1} bandı frekans ve alan değerlerinde anlamlı bir değişim kontrole göre artış doğrultusunda tüm erkek GF BMFI ırklarında ve en belirgin olarak da BMFI 860 ırkında görülmüştür. Erkek IF dokularında ise trigliseritte anlamlı artış sadece BMFI 860 ve 861 ırkları için elde edilmiştir. Ayrıca tüm dişi BMFI ırklarında da kontrole göre anlamlı artış bulunmuştur (Şekil 14 ve Tablo 12-15).

Bu bölgede bulunan 1641-1643 cm^{-1} frekansındaki proteinlerden kaynaklanan amid I bandı %80 oranında C=O gerilme, %10 oranında C-N gerilme e %10 oranında N-H bükülme titreşimlerinden, 1549-1553 cm^{-1} frekansındaki yine proteinlerden kaynaklanan amid II bandı ise %60 oranında N-H bükülme ve %40 oranında C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (**Takahashi v.d., 1991; Wong v.d., 1991; Stuart, 1997; Haris and**

Severcan, 1999; Dogan v.d. 2007; Cakmak v.d., 2006; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010). Amid I ve amid II bantlarının alan değerleri Tablo 12-15 de verilmiştir. Bant alanı değerleri göz önüne alındığında ise protein miktarındaki değişim sadece dişi obez IF dokularında gözlenmiştir. Amid I ve amid II bantlarında, dişi IF'de bütün ırklarda kontrole göre anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Bu azalma ise, BFMI ırkları dişi IF'de protein içeriğinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığını göstermektedir (**Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010**).

IF'de 1416 cm^{-1} ve GF'de 1410 cm^{-1} 'da gözükten, C-H ve N-H deformasyon, C-N gerilme bandı çoğunlukla aminoasitlerden kaynaklıdır. Her iki doku ve cinsiyette, bu bandın frekans değerinde bir değişim görülmemektedir. Alan değerinde ise dişi IF'de BFMI856 ırkında kontrole göre anlamlı azalma olup aminoasit içeriğinde azalmaya karşılık gelmektedir.

GF'de 1400 cm^{-1} , IF'de 1402 cm^{-1} 'de görülen COO^- simetrik gerilme bandı çoğunlukla yağ asitlerinden ve aminoasitlerden oluşmaktadır (**Cakmak v.d., 2006; Movasaghi v.d., 2008**). Bu bandın frekans değerinde, sadece BFMI856 ırkında değişim görülmektedir ve bu değişim dişi GF'de kontrole göre anlamlı azalma, erkek GF'de kontrole göre anlamlı artış olarak görülmüştür. Bu değişim yağ asitleri ve aminoasitlerde yapısal bir değişiklik olabileceğini göstermektedir.

CH_2 kolajen yan zincir titreşimlerinden kaynaklanan (**Camacho v.d., 2001, Gough v.d., 2003; West v.d., 2004**) ve GF'de 1345 cm^{-1} , IF'de 1343 cm^{-1} 'de görülen bandın alanı erkek fare GF adipoz dokusunda BFMI860 ırkında ve dişi fare IF adipoz dokusunda BFMI852, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında kontrole göre daha az olarak tespit edilmiştir. Bu anlamlı sonuç, dişi farelerin IF dokusunda protein içeriğinin daha az bulunduğu sonucunu desteklemektedir. Bu bant, ayrıca kolajen moleküllerinin üçlü sarmal heliks yapısının düzenini izlemek için de kullanılabilir (**West v.d., 2004; Bozkurt v.d., 2010**).

Spektrumların $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığındaki bantlar daha çok nükleik asit ve fosfolipit gibi fosfat (PO_2^-) grupları içeren sistemlerin içindeki P=O bağının soğurma bantlarından oluşmaktadır (**Diem v.d., 1999; Liquier ve Taillandier, 1996; Cakmak v.d., 2006; Bozkurt v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Bu bantlar, membranlardaki fosfolipitlerin kafa grupları hakkında önemli bilgiler de vermektedir (**Mendelsohn ve Mantsch, 1986; Bozkurt v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). GF'de 1235 cm^{-1} ve IF'de 1239 cm^{-1} 'da gözlemlenen PO_2^- simetrik gerilim bandı frekans değerinde kontrole göre hiçbir ırkta anlamlı bir değişim görülmemiştir. Alan değerleri göz önüne alındığında ise dişi IF'de bütün ırklarda kontrole göre anlamlı bir azalma, erkek GF'de ise BFMI852 ve BFMI856'da anlamlı artış, BFMI861'de anlamlı azalma görülmüştür. Buna göre, dişi IF'de bütün ırklarda ve erkek GF'de BFMI861 ırkında nükleik asit ve membranlardaki fosfolipitlerin miktarlarının daha yüksek olduğu erkek

GF BFMI852 ve BFMI856'da kontrole göre daha düşük olduğu anlaşılmaktadır. (**Severcan v.d., 2010**).

GF'de 1027 cm^{-1} ve IF'de 1030 cm^{-1} frekans değerinde bulunan glikojen, polisakkaritler, genel olarak karbonhidratlardan oluşan bandın frekans değerlerinde kontrole göre anlamlı bir değişim görülmemiştir. Fakat, bu bandın alan değerleride anlamlı değişimler gözlemlenmiştir. Dişi GF'de bütün ırklarda, dişi IF'de BFMI852 ve BFMI856'da, erkek GF'de de BFMI852 ve BFMI856 ırklarında kontrole göre bant alan değerlerinde anlamlı bir azalma görülmüştür. Bahsedilen ırklarda görülen anlamlı azalma bu gruplarda karbonhidrat (özellikle glikojen) miktarının azaldığını göstermektedir (**Toyran v.d., 2006; Movasaghi v.d., 2008; Ozek v.d., 2010**).

Her iki dokuda da 1118 cm^{-1} frekansında görülen ve RNA içindeki ribozun C-OH grubundan kaynaklanan bant ve GF'de 970 cm^{-1} ve IF'de 971 cm^{-1} frekans değerlerinde gözlenen C-N+-C gerilme titreşim bandı nükleik asitlerden, özellikle de RNA riboz-fosfat ana zincir titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (**Chiriboga v.d. 2000; Banyay v.d., 2003**). Ek Tablo 1-4 den görüleceğe üzere, her iki doku ve cinsiyette 970 cm^{-1} bandının frekans değerinde kontrole nazaran bir değişim görülmemiştir. 1118 cm^{-1} bandında ise dişi GF'de BFMI856 ırkında, erkek GF'de BFMI856 ve BFMI861 ırklarında ayrıca dişi IF'de BFMI852 ırkında kontrole göre frekansta daha düşük değerlere kayma görülmüştür. Bu değişim, belirtilen gruplarda nükleik asitlerin (özellikle RNA) yapısal bir değişime uğramış olabileceğini göstermektedir. Alan değerleri göz önüne alındığında ise, her iki bantta, dişi IF'de, bütün ırklarda kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmektedir. Ayrıca, erkek IF'de BFMI860 ve BFMI861 ırklarında da bu anlamlı azalma görülmektedir. Bu sonuca göre, RNA miktarının belirtilen gruplarda daha az olduğu ve RNA sentezinin bu gruplarda daha az gerçekleştiği yorumu yapılabilir. Bu durum, dişi IF obez gruplarında tespit edilen, kontrole göre anlamlı olarak daha düşük olan protein miktarını da açıklamaktadır.

Bant genişliği ile ilgili yapılan spektral analizlerden elde edilen bilgilerin istatistiksel analiz sonuçları Ek 2 Tablo 5, 6, 7 ve 8 de verilmiştir. Lipit bantları göz öüne alındığında, kontrole göre BFMI ırkları bant genişliği değerlerinde, anlamlı bir değişim görülmemiştir. Ancak, proteinlerden kaynaklı Amid II bandında dişi GF'de BFMI852 ırkında ve erkek IF'de BFMI861 bandında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 16). Bu değişim proteinlerin yapısında bir değişim olabileceğini işaret etmektedir (**Cakmak v.d., 2006**).

Her ne kadar ATR-FTIR spektroskopisi örnek kalınlığı farkından ileri gelebilecek hatalardan etkilenmese de, son yıllarda spektral oranların kullanımı yaygınlaşmaktadır (**Cakmak v.d. 2012**). Bant alan oranı değerleri erkek ve dişi GF ve IF dokuları için Tablo 16,

17, 18 ve 19 da verilmiştir. Bu oranlar alınırken toplam lipit olarak CH₃ asimetric, CH₂ asimetric ve CH₂ simetric gerilme bandları alanlarının toplamı alınmıştır.

Tablo 16. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

GF Dişi Bant Alan Oranları ve anlamları	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
Doymuş Yağ CH ₂ asim. Gerilme+ CH ₂ sim.	4,96 \pm 0,27	4,92 \pm 0,23	5,18 \pm 0,39	4,77 \pm 0,26	4,51 \pm 0,35
Doymamış/Doymuş Lipit Olefinik HC=CH / Total CH ₂	0,31 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02	0,35 \pm 0,04	0,39 \pm 0,03	0,42 \pm 0,04
Lipit/Protein CH ₂ sim./CH ₃ sim.	3,52 \pm 0,11	3,46 \pm 0,09	3,94 \pm 0,14* \uparrow	4,03 \pm 0,14** \uparrow	3,66 \pm 0,56* \uparrow
Açıl Zincir Uzunluğu CH ₂ asim./CH ₃ Asim.	2,47 \pm 0,13	2,38 \pm 0,10	2,44 \pm 0,16	2,5 \pm 0,13	2,55 \pm 0,17
Karbonhidrat/ Protein 1030 cm ⁻¹ /Amid I	0,015 \pm 0,000	0,008 \pm 0,001*** \downarrow	0,006 \pm 0,001*** \downarrow	0,008 \pm 0,001*** \downarrow	0,010 \pm 0,001*** \downarrow
Nükleik Asit/ Protein 971 cm ⁻¹ / Amid I	0,002 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000	0,003 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000	0,003 \pm 0,000
Kolajen Bütünlüğü Amid II/ 1343 cm ⁻¹	7,07 \pm 0,58	5,90 \pm 0,38	5,74 \pm 0,50	6,58 \pm 0,69	6,34 \pm 0,85

Tablo 17. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

GF Erkek Bant Alan Oranları	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
Doymuş Yağ CH ₂ asim. +CH ₂ sim.	4,62 \pm 0,28	5,94 \pm 0,29	6,18 \pm 0,43	5,91 \pm 0,46* \uparrow	5,33 \pm 0,23
Doymamış/Doymuş Lipit Olefinik HC=CH / Total CH ₂	0,37 \pm 0,04	0,27 \pm 0,02	0,29 \pm 0,04	0,27 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02
Lipit/Protein CH ₂ sim./CH ₃ sim.	3,7 \pm 0,15	4,23 \pm 0,11* \uparrow	4,08 \pm 0,18* \uparrow	4,6 \pm 0,14** \uparrow	3,96 \pm 0,06* \uparrow
Açıl Zincir Uzunluğu CH ₂ asim./CH ₃ Asim.	2,51 \pm 0,15	2,83 \pm 0,14	2,8 \pm 0,22	2,82 \pm 0,20	2,74 \pm 0,11
Karbonhidrat/ Protein 1030 cm ⁻¹ /Amid I	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,011 \pm 0,002	0,013 \pm 0,001	0,016 \pm 0,002
Nükleik Asit/ Protein 971 cm ⁻¹ / Amid I	0,004 \pm 0,001	0,003 \pm 0,000	0,003 \pm 0,001	0,003 \pm 0,000	0,005 \pm 0,000
Kolajen Bütünlüğü Amid II/ 1343 cm ⁻¹	6,54 \pm 1,10	5,40 \pm 0,56	5,21 \pm 0,83	6,50 \pm 0,63	4,96 \pm 0,49

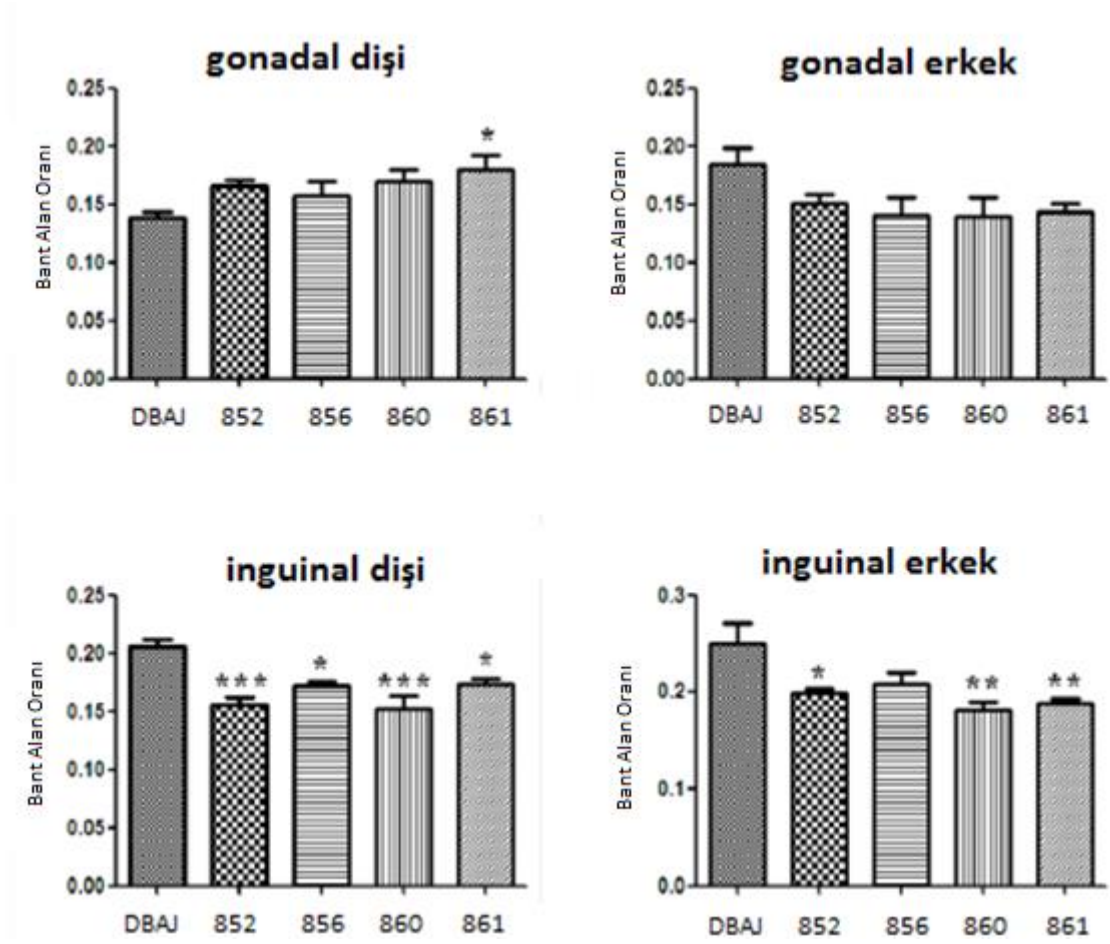
Tablo 18. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu IF adi poz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

IF Dişi Bant Alan Oranları	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
Doymuş Yağ CH ₂ asim. +CH ₂ sim.	3,68 \pm 0,22	4,23 \pm 0,18	3,80 \pm 0,1	4,18 \pm 0,3	3,73 \pm 0,08
Doymamış/Doymuş Lipit Olefinik HC=CH / Total CH ₂	0,51 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01*** \downarrow	0,40 \pm 0,01** \downarrow	0,36 \pm 0,04*** \downarrow	0,40 \pm 0,01** \downarrow
Lipit/Protein CH ₂ sim./CH ₃ sim.	2,59 \pm 0,07	2,92 \pm 0,06* \uparrow	3,12 \pm 0,09** \uparrow	2,87 \pm 0,15* \uparrow	3,26 \pm 0,11*** \uparrow
Açıl Zincir Uzunluğu CH ₂ asim./CH ₃ Asim.	1,83 \pm 0,07	1,97 \pm 0,06	2,12 \pm 0,07* \uparrow	2,25 \pm 0,15** \uparrow	2,04 \pm 0,06
Karbonhidrat/ Protein 1030 cm ⁻¹ /Amid I	0,016 \pm 0,002	0,012 \pm 0,002	0,010 \pm 0,001	0,013 \pm 0,003	0,012 \pm 0,002
Nükleik Asit/ Protein 971 cm ⁻¹ / Amid I	0,004 \pm 0,000	0,003 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000**	0,003 \pm 0,001	0,003 \pm 0,000*
Kolajen Bütünlüğü Amid II/ 1343 cm ⁻¹	7,55 \pm 0,22	7,46 \pm 0,22	5,01 \pm 0,70** \downarrow	6,73 \pm 0,48	7,22 \pm 0,67

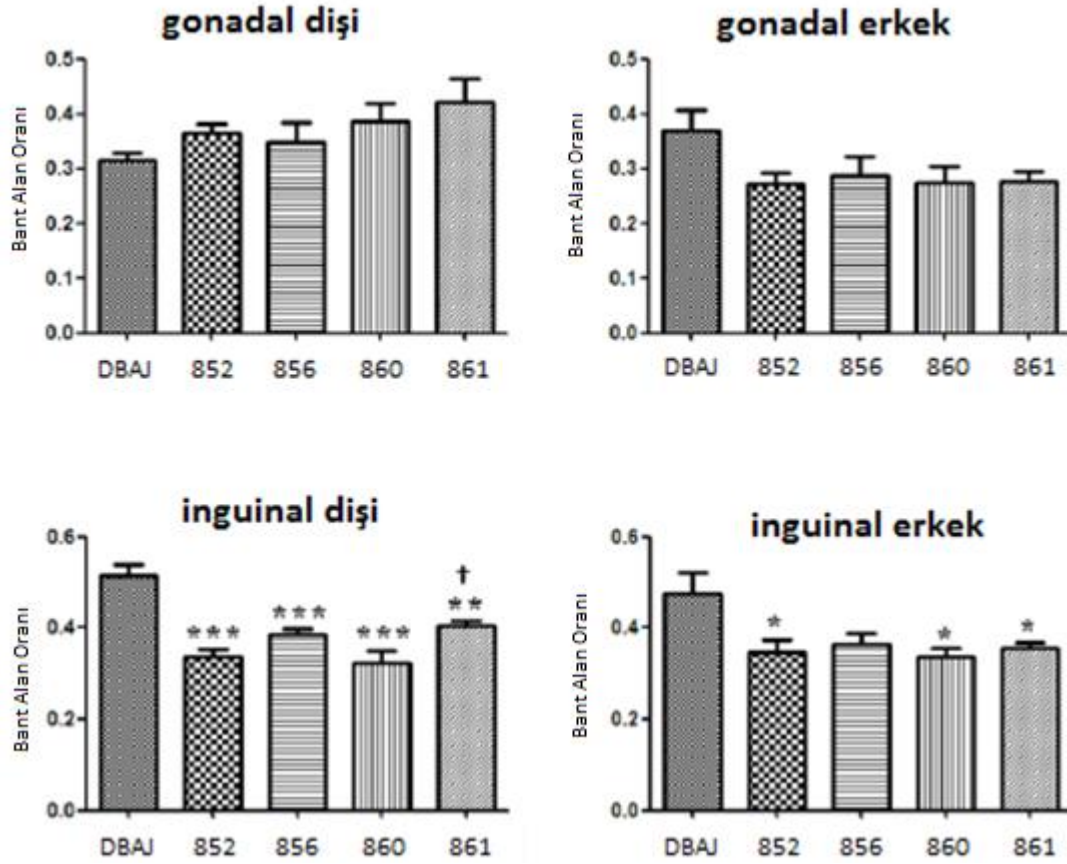
Tablo 19. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı oran değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

IF Erkek Bant Alan Oranları	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
Doymuş Yağ CH ₂ asim. + CH ₂ sim.	3,94 \pm 0,32	4,22 \pm 0,25	4,84 \pm 0,2	4,26 \pm 0,16* \uparrow	3,69 \pm 0,13
Doymamış/Doymuş Lipit Olefinik HC=CH / Total CH ₂	0,48 \pm 0,04	0,35 \pm 0,03* \downarrow	0,36 \pm 0,03* \downarrow	0,34 \pm 0,02** \downarrow	0,36 \pm 0,01* \downarrow
Lipit/Protein CH ₂ sim./CH ₃ sim.	3,09 \pm 0,12	3,37 \pm 0,1	2,6 \pm 0,12* \downarrow	3,9 \pm 0,1*** \uparrow	3,09 \pm 0,1
Açıl Zincir Uzunluğu CH ₂ asim./CH ₃ Asim.	2,12 \pm 0,12	1,94 \pm 0,10	1,96 \pm 0,10	2,27 \pm 0,08	2,21 \pm 0,08
Karbonhidrat/ Protein 1030 cm ⁻¹ /Amid I	0,012 \pm 0,002	0,015 \pm 0,001	0,011 \pm 0,001	0,013 \pm 0,001	0,009 \pm 0,001
Nükleik Asit/ Protein 971 cm ⁻¹ / Amid I	0,003 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000	0,003 \pm 0,000	0,001 \pm 0,000*** \downarrow	0,002 \pm 0,000* \downarrow
Kolajen Bütünlüğü Amid II/ 1343 cm ⁻¹	6,87 \pm 0,24	6,79 \pm 0,36	7,40 \pm 1,34	6,74 \pm 0,29	6,35 \pm 0,20

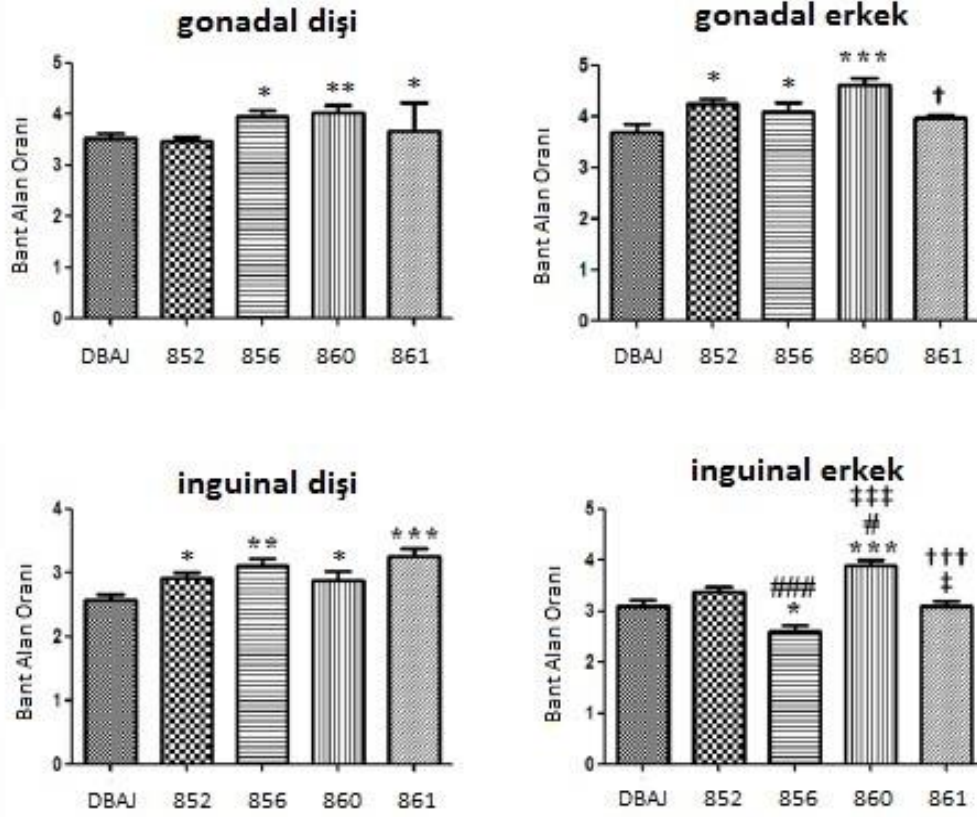
Bazı önemli oranların tüm ırklara ait oran değişimlerinin GF ve IF erkek ve dişi dokularda değişimlerini görsel olarak izlemek için fonksiyonel gruplara ait alan oranı değişimlerine ait bar diyagramları Şekil 17-23'de verilmiştir.



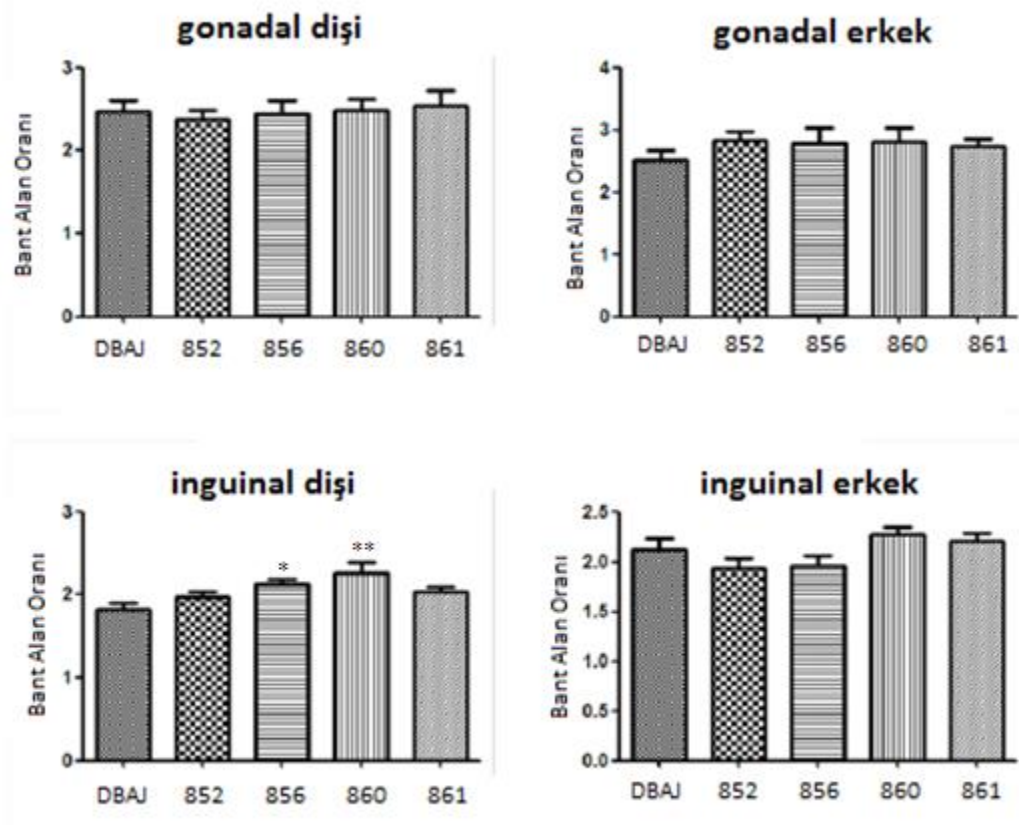
Şekil 17. Olefinik gerilim/toplam lipit bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.



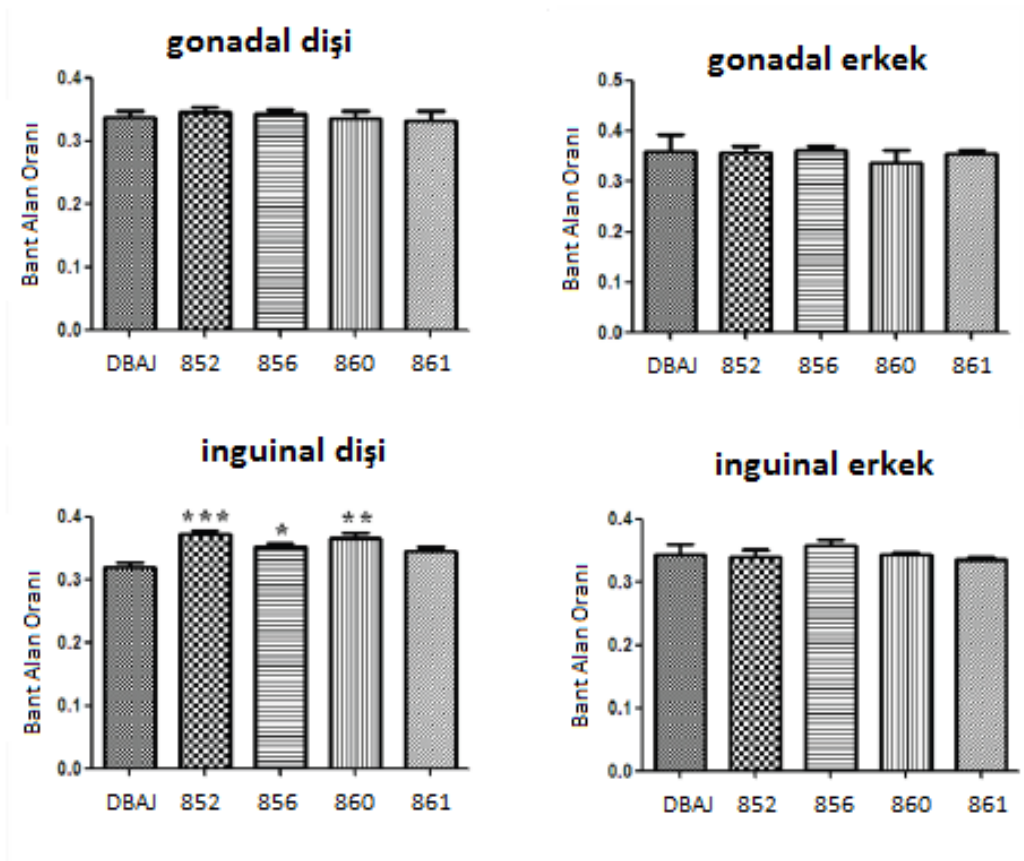
Şekil 18. Doymamış/doymuş lipid bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.



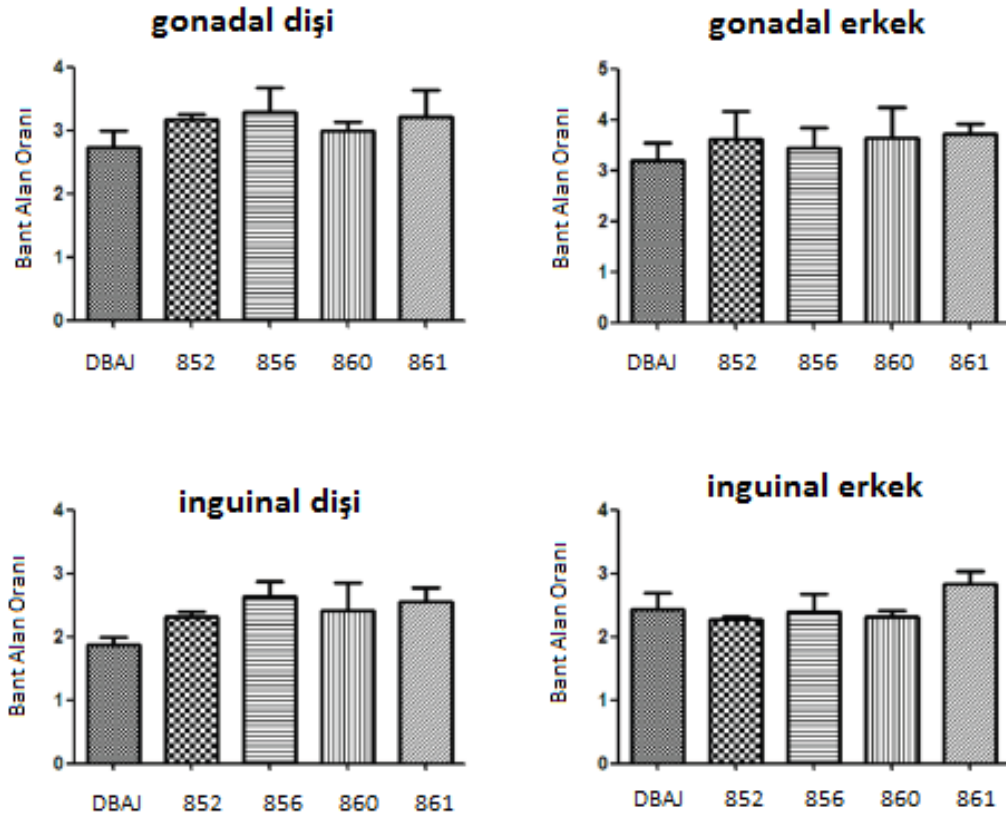
Şekil 19. Lipit /protein bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.



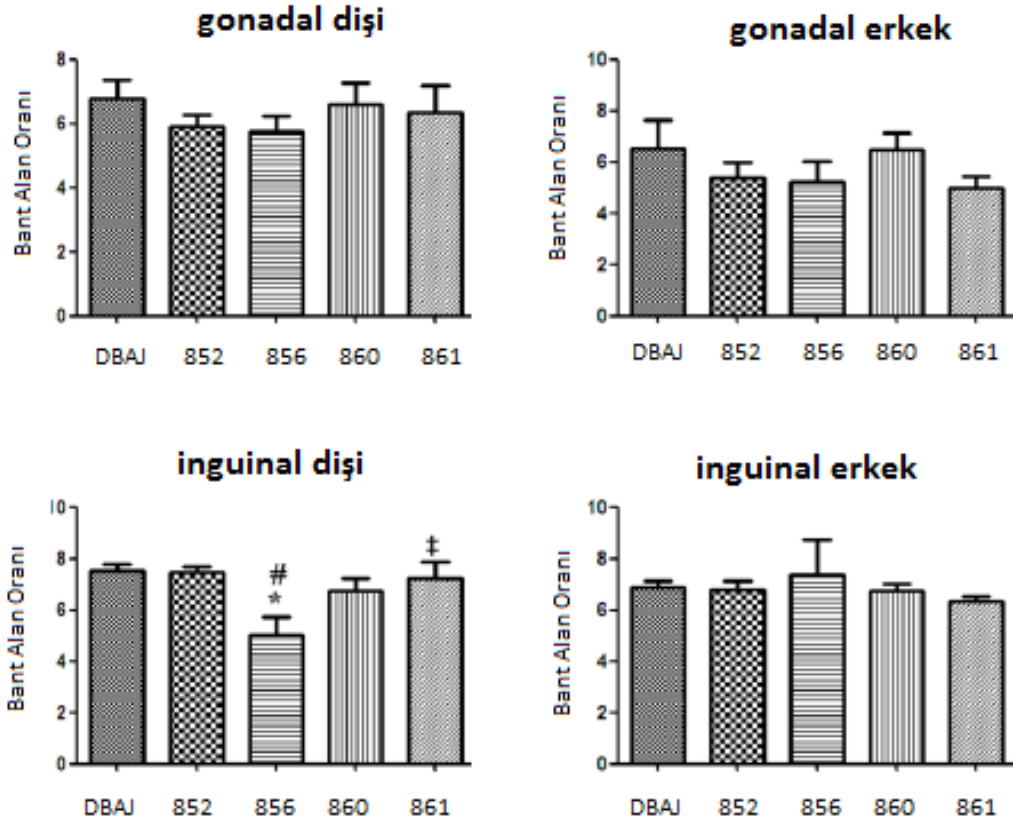
Şekil 20. CH2 antisimetrik gerilim /CH3 antisimetrik gerilim bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.



Şekil 21. CH2 antisimetrik gerilim / toplam lipid bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFMI852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFMI856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFMI860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



Şekil 22. Amid I / Amid II bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFM1852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFM1856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFM1860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



Şekil 23. Amid II / 1345 cm⁻¹ bant alan oranı. Anlamlılık derecesi, kontrol (DBAJ) diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında * ile, BFM1852 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında # ile, BFM1856 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında ‡ ile, BFM1860 diğer BFM ırklarıyla karşılaştırıldığında † ile simgelenmiştir. Anlamlılık derecesi 0.05'e eşit ve 0.05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

CH₂ antisimetrik/CH₃antisimetrik bant alan oranları değerinin düşük olması lipidlerin açıl zincirlerinin daha kısa olduğunun bir işaretidir (**Bozkurt v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Kontrol ile kıyaslandığında erkek ve dişi GF'de bu oranda, bütün ırklarda anlamlı bir artış ya da azalış görülmemiştir. IF'de ise erkeklerde kayda değer bir değişim olmamasına rağmen dişilerde BFM1856 ve BFM1860 ırklarında anlamlı bir artış söz konusudur. Bu artış, lipidlerin açıl zincirlerinin bu ırklarda daha uzun olduğunu göstermiştir (Tablo 18, Şekil 20). Bunun yanı sıra, CH₂ simetrik ve CH₂ antisimetrik bant alanları toplamı sistemdeki doymuş yağ miktarı ile ilgili bilgi vermektedir (**Severcan v.d., 2010; Bozkurt v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Tablo 14-17'de görüldüğü gibi dişi farelerde IF ve GF'de anlamlı bir değişim yoktur ancak erkek farelerde GF'de BFM1860 ırkında anlamlı olmak üzere bütün ırklarda kontrole nazan bu bantların alanlarının toplam değerinde artış görülmektedir. Aynı şekilde Erkek IF'de de BFM1860 ırkında

doymuş yağ oranında kayda değer bir artış görülmektedir. Bu artış, doymuş yağ miktarında yükselme olarak yorumlanmıştır. Olefinik/CH₂ simetrik+CH₂ antisimetrik gerilim oranı ise doymamış/doymuş yağ oranı hakkında bilgi vermektedir. Bu oran, dişi ve erkek farelerin ikisinde de IF dokusunda bütün obez ırklarda anlamlı bir şekilde azalmıştır (Tablo 14-17). Doymuş ve doymamış yağ miktarlarında meydana gelen bu değişimler, doymamış açıl zincirlerin çift bağlarının bozulmasından kaynaklanmakta olup lipit peroksidasyonundaki artışı göstermektedir (**Severcan v.d., 2010; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). CH₂ simetrik/CH₃ simetrik gerilim bant alan oranları lipit/protein oranı hakkında bilgi vermektedir ve bu oran dişi IF'de kontrole göre BFMI856 ve BFMI861'de, erkek IF'de BFMI856 ve BFMI860'da, erkek GF'de ise BFMI856 ve BFMI861'de anlamlı artış görülmüştür.

Kontrol ve obez ırklar arasında total lipit içeriğinde oluşan farklılıkları görebilmek için CH₂ antisimetrik, CH₂ simetrik, CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinin bant alanları toplamı Tablo 14-17'de verilmiştir. Buna göre, erkek GF'de BFMI852, BFMI856 ve BFMI860 ırklarında ayrıca erkek IF'de BFMI856 ırkında kontrole göre total lipit içeriğinde anlamlı artış görülmektedir.

GF'de 1027 cm⁻¹ ve IF'de 1030 cm⁻¹'de görülen karbonhidrat bandının amid I protein bandına oranı ve kontrole göre BFMI ırklarındaki değişim Tablo 14-17'de verilmiştir. Buna göre, dişi GF'de bütün ırklarda bu oran kontrole göre anlamlı olarak azalmış görülmekte olup karbonhidrat miktarındaki azalmanın proteindeki azalmaya göre daha fazla olduğunu ve dişi GF'de metabolizma hızının daha fazla olduğunu işaret etmektedir.

GF'de 970 cm⁻¹ ve IF'de 971 cm⁻¹ frekans değerlerinde görülen bant alanının amid I bant alanına oranlanması ile elde edilen RNA/protein oranındaki BFMI ırkları ve kontrol grubu arasındaki değişimler Tablo 14-17'de gösterilmiştir. Bu oranın, dişi IF'de BFMI856 ve BFMI861 ırkında, erkek IF'de BFMI860 ve BFMI861 ırkında kontrole göre anlamlı bir biçimde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, dişi IF adipoz dokusunda RNA ve amid I protein bandında görülen düşük RNA ve protein içeriğini ve erkek IF RNA bant alanında görülen azalmayı doğrulamakta olup bu doku ve ırklardaki RNA miktarında ve protein sentezinde bir azalma olduğunu desteklemektedir.

Amid I bant alanının GF'de 1345 cm⁻¹, IF'de 1343 cm⁻¹ aralığında görülen bandın alanına oranlanması ile elde edilen oran kolajen moleküllerinin yapı bütünlüğü hakkında bilgi vermektedir (**West v.d., 2004**) ve bu oranla ilgili elde edilen sonuçlar Tablo 14-17'de gösterilmiştir. Bu oran değerlerine göre, BFMI ırkları arasında en düşük Amid II/1343 cm⁻¹ oranına sahip olan ırk dişi IF'de BFMI856'dır. Bu oranın düşük olarak tespit edilmesi, kolajen

yapı bütünlüğünün değiştiği ve kolajen kalitesinin azaldığını göstermektedir (**West v.d., 2004; Bi v.d., 2006**).

Elde ettiğimiz verilere göre CH bölgesindeki lipit bantları göz önüne alındığında erkek ve dişi farelerde GF dokusunda, IF dokusuna göre, obeziteden kaynaklanan etkilerin lipitler üzerinde daha az olduğunu görmekteyiz. Özellikle olefinik bant alanındaki ve doymamış/doymuş yağ oranları göz önüne alındığında obeziteye bağlı değişimlerin en az görüldüğü cinsiyet ve yağ dokusu, dişi fare GF dokusudur. Doymuş yağ oranındaki artış, doymamış yağ oranındaki azalma ve lipit/protein oranındaki değişim göz önüne alındığında ise kontrole göre GF dokularında CH bölgesinde en fazla farklılık gösteren cinsiyet ve ırk, erkek BFMI856 olarak belirlenebilir.

Parmak izi bölgesini göz önüne aldığımızda, kontrole göre BFMI ırklarının bant alanı ve bant alanı oranlarında değişimler daha farklıdır. Amid I ve amid II bantlarında, dişi IF'de bütün ırklarda kontrole göre anlamlı bir azalma vardır. RNA bandının alanında yine dişi IF'de, bütün ırklarda, kontrole göre anlamlı bir azalma ve RNA/Amid I bant oranına bakıldığında ise dişi IF'de kontrole göre düşüş gözlenmektedir. Yine dişi IF'de kolajen içeriğinin kontrole göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, RNA ve protein sentezinin dişi IF'de kontrole göre daha az gerçekleştiği ve obezitenin, RNA, protein ve kolajenler üzerindeki etkisinin en çok dişi IF'de görüldüğü yorumu yapılabilir.

Obeziteye bağlı karbonhidrat içeriğindeki değişimi göz önüne aldığımızda ise, dişi GF'de bütün ırklarda, dişi IF'de BFMI852 ve BFMI856'da, erkek GF'de de BFMI852 ve BFMI856 ırklarında kontrole göre karbonhidrat (özellikle glikojen) miktarının azaldığını görmekteyiz. Karbonhidrat/protein alan oranlarına göre de, dişi GF'de bütün ırklarda kontrole göre anlamlı olarak azalma görmekte olup karbonhidrat miktarının proteine göre daha fazla azalmış olduğunu ve dişi GF'de metabolizma hızının daha fazla olabileceğini düşünmekteyiz.

Bütün sonuçları biraraya getirdiğimizde, yapılan ATR-FTIR spektroskopisi çalışmaları sonucunda karmaşık genetik yapıya sahip BFMI fare ırkları makromoleküler yapılarında, kontrole göre en çok IF adipoz dokusunda farklılık bulunmuştur. İncelenen ırklar göz önünde bulundurulduğu zaman ise BFMI861 ve BFMI852 ırklarının spektral parametrelerde en belirgin farklılıkları gösterdikleri belirlenmiştir. Özellikle dişi IF adipoz dokusunda protein sentezi miktarı, glikojen, lipit ve protein gibi makromoleküllerin içerikleri gibi parametrelerde kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. İncelenen tüm spektral parametrelerde dişi IF dokusunda daha anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Tüm bu değişimler, obezitenin bu dokuda etkisinin daha çok olduğunu göstermektedir.

4.1.2. Protein İkincil Yapı Kestirimi

Bu proje çalışmasında çalışılan ırklarda obeziteye bağlı dişi ve erkek fare inguinal ve gonadal adipoz doku protein ikincil yapılarında meydana gelen değişimleri saptamak amacıyla FTIR spektrumunda sadece proteinlerden kaynaklanan ve $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında yer alan amid I bandına, yapay sinir ağları ile ikincil türev-vektör normalizasyon metodu uygulandı. Gereç ve Yöntem kısmında Şekil 10 da bir adipoz doku örneğinde amide I soğurma bandı ve ikincil türev spektrumu verilmiştir.

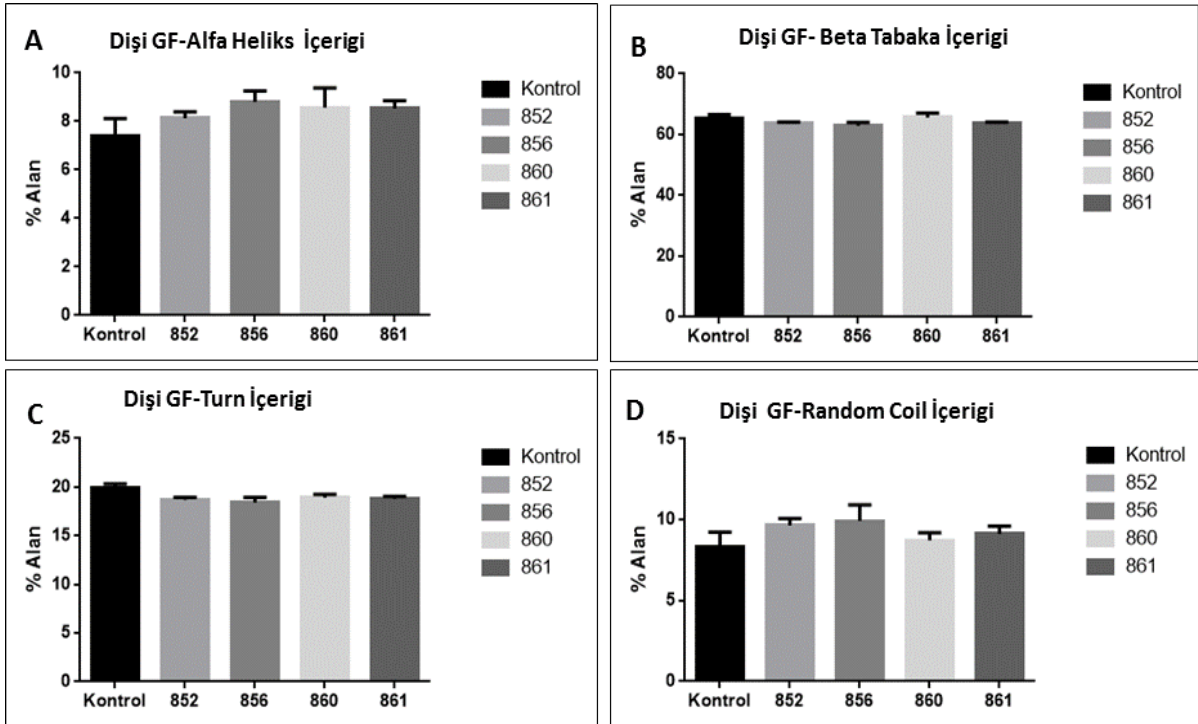
4.1.2.1. Yapay Sinir Ağları Metodu ile protein ikincil yapı tayini sonuçları

Yapay sinir ağları ile elde edilen erkek ve dişi fare gonadal ve inguinal adipoz dokularında meydana gelen protein ikincil yapılarında meydana gelen değişimler Şekil 24, 25, 26, ve 27 ve Tablo 20, 21, 22, ve 23 de verilmektedir. Şekilllerden ve tablolardan da görüleceği üzere, çalışılan ırklarda hem erkek hem de dişi farelerin gonadal ve inguinal adipoz doku proteinlerinde ikincil yapı miktarlarında değişimler bulunmaktadır. Genel olarak total beta tabaka miktarında ve turn içeriğinde azalma, alfa heliks ve random coil (gelişi güzel sarım) miktarında ise artım bulunmuştur. Dişi fare gonadal adipoz dokularında bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değil iken, erkek farelerde özellikle alfa heliks, turn ve random coil içeriğindeki değişimler anlamlı bulunmuştur (Şekil 24 ve 25). Erkek gonadal adipoz dokularında çalışılan fare ırklarından 852,856, 860 ve 861 dokularında kontrole göre turn içeriğinde anlamlı derecede azalma, 860 da ise kontrol grubuna göre alfa heliks ve random coil miktarında anlamlı miktarda artım bulunmuştur.

Çalışılan fare ırklarında, erkek ve dişi farelerde Inguinal adipoz dokularındaki değişimler Şekil 26, 27 ile Tablo 22 ve 23'de gösterilmektedir. Dişi farelerde çalışılan ırklara göre değişimlere bakıldığında sadece 860 ırkında anlamlı derece beta tabaka miktarında azalma ile alfa heliks ve random coil miktarında artım bulunmuştur. 856 ırkında ise anlamlı derecede turn miktarında azalma ve I random coil miktarında artış gözlemlenmiştir. Erkek fare ırklarında ise, 852, 856, 860 ve 861 gruplarında turn miktarlarında anlamlı derecede azalma, sadece 860 ırkında ise random coil miktarında anlamlı derecede artış saptanmıştır.

Tablo 20. Dişi fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi

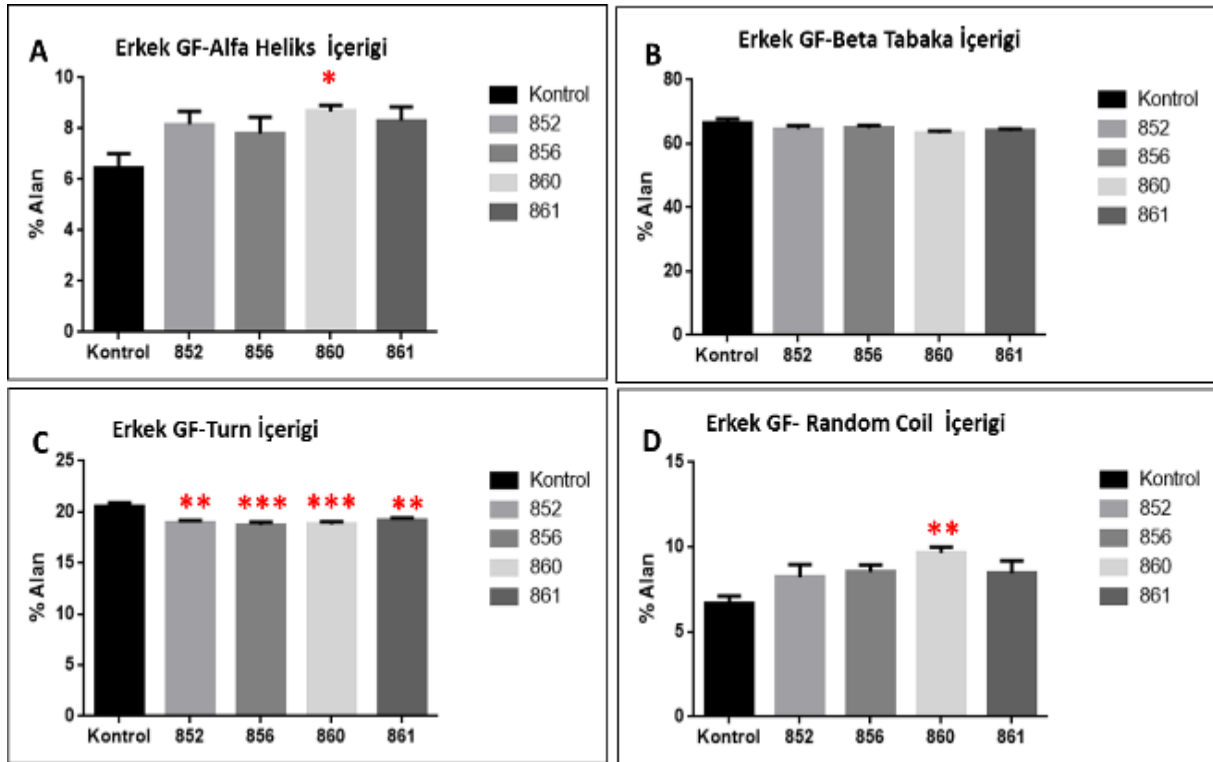
	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	7.42±0.70	8.13±0.26↑	8.80±0.45↑	8.56±0.82↑	8.53±0.32↑
Beta Tabaka	65.20±1.35	63.58±0.53↓	62.88±1.13↓	65.60±1.44↑	63.58±0.52↓
Turn	19.92±0.56	18.70±0.29↓	18.42±0.64↓	19.00±0.38↓	18.80±0.28↓
Random Coil	8.35±0.88	9.65±0.42↑	9.93±0.98↑	8.72±0.47↑	9.12±0.49↑



Şekil 24. Dişi GF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.

Tablo 21. Erkek fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi

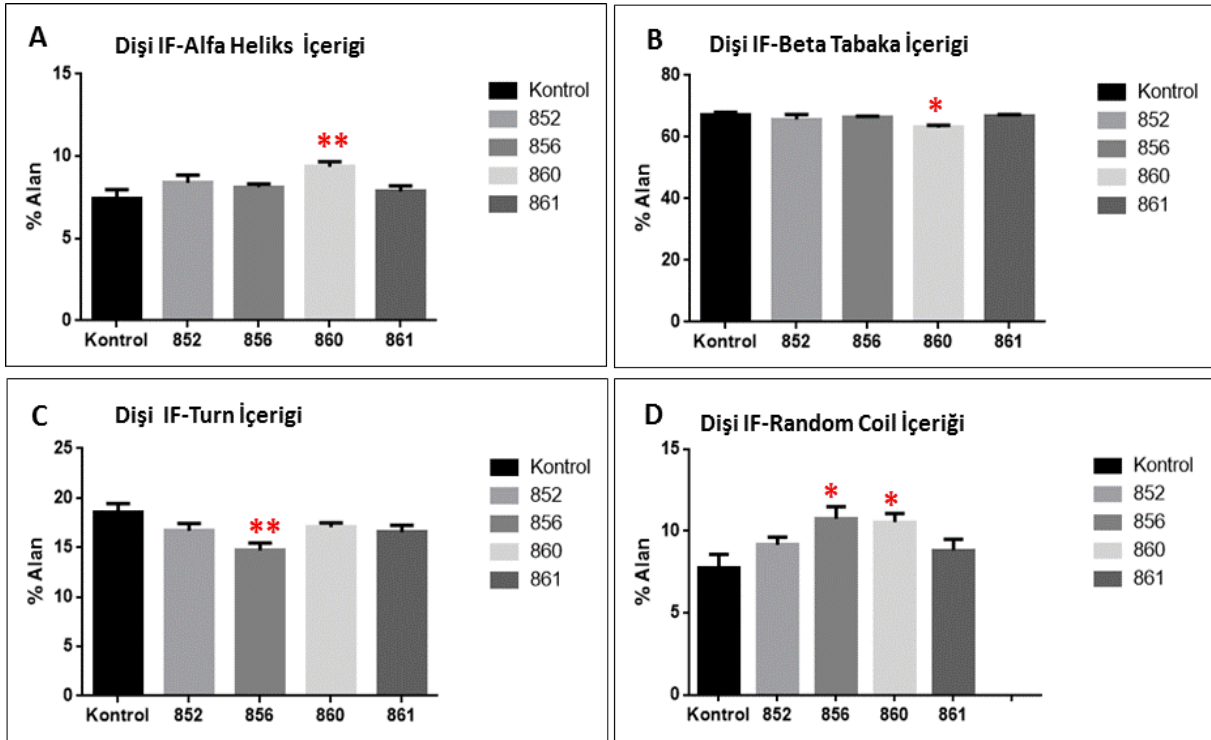
	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	6.64±0.47	8.21±0.75↑	8.53±0.42↑	9.66±0.33**↑	8.47±0.73↑
Beta Tabaka	66.66±1.14	64.93±1.05↓	64.95±0.81↓	63.24±0.76↓	64.00±0.69↓
Turn	20.60±0.35	18.97±0.21**↓	18.72±0.35***↓	18.80±0.26***↓	19.22±0.24**↓
Random Coil	6.64±0.47	8.22±0.75↑	8.53±0.42↑	9.66±0.33**↑	8.47±0.73↑



Şekil 25. Erkek GF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.

Tablo 22. Dişi fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi

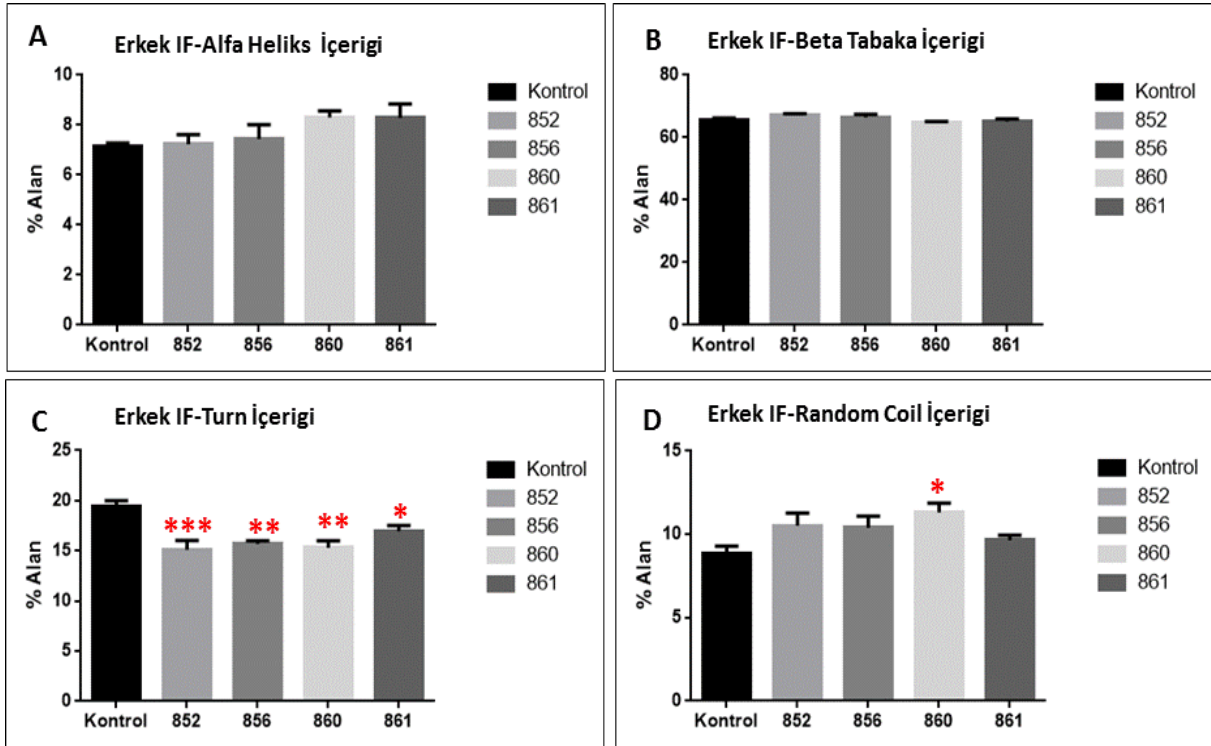
	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	7.44±0.53	8.4±0.46↑	8.13±0.17↑	9.36±0.30**↑	7.86±0.34↑
Beta Tabaka	67.08±0.98	65.78±1.53↓	66.42±0.32↓	63.04±0.78*↓	66.73±0.63↓
Turn	18.60±0.84	16.68±0.74↓	14.70±0.76**	17.06±0.44↓	16.55±0.70↓
Random Coil	7.78±0.72	9.15±0.44↑	10.75±0.68*↑	10.56±0.46*↑	8.83±0.62↑



Şekil 26. Dişi IF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.

Tablo 23. Erkek fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi

	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	7.14±0.14	7.23±0.38↑	7.45±0.57↑	8.61±0.42↑	8.54±0.56↑
Beta Tabaka	65.50±0.70	67.10±0.51↑	66.43±0.99↑	64.70±0.40↓	66.73±0.63↑
Turn	19.42±0.57	15.10±0.93***↓	14.70±0.28**↓	17.06±0.70**↓	16.55±0.55*↓
Random Coil	8.86±0.38	9.15±0.69↑	10.75±0.63 ↑	10.56±0.50*↑	8.83±0.27↑



Şekil 27. Erkek IF dokusunda a) alfa heliks b) beta tabaka c) turn d) random coil içeriğindeki değişim.

4.1.2.2. İkincil Türev Vektör Normalizasyonu Metodu ile Protein İkincil Yapı Tayini Sonuçları

Bu metod ile elde edilen erkek ve dişi farelerde gonadal ve inguinal adipoz dokularda protein ikincil yapılarıdaki değişimler Tablo 24, 25, 26, ve 27 de gösterilmektedir. Dişi fare gonadal adipoz dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmazken erkek olanlarda ise özellikle 860 ırkında anlamlı derecede turn miktarında azalma, random coil miktarında ise artım gözlemlenmiştir. Ancak beta miktarlarında ise azalma saptanmıştır. Inguinal adipoz dokularında ise dişi farelerde 860 ırkında anlamlı miktarda alfa heliks ile random coil miktrında artış ile turn ve beta tabaka miktarında azalma bulunmuştur. Erkek fare dokularında ise yine aynı ırkta anlamlı derecede alfa heliks ile random coil miktrında artış ile turn, beta tabaka miktarında azalma bulunmuştur. Bu metodla bulunan protein ikincil yapıdaki değişimlerin yapay sinir ağıları metodu ile elde edilen sonuçlarla genel olarak örtüştüğü gözlemlenmiştir.

Tablo 24. Dişi fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi

	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	-0.16±0.01	-0.24±0.02↑	-0.23±0.02↑	-0.22±0.02↑	-0.20±0.02↑
Beta Tabaka	-0.20±0.01	-0.17±0.01↓	-0.18±0.01↓	-0.17±0.01↓	-0.16±0.01↓
Turn	-0.07±0.02	-0.06±0.01↓	-0.05±0.01↓	-0.05±0.01↓	-0.04±0.01↓
Random Coil	-0.07±0.01	-0.10±0.01↑	-0.08±0.01↑	-0.09±0.01↑	-0.09±0.01↑
Agrege Beta Tabaka	-0.13±0.01	-0.12±0.01↓	-0.11±0.01↓	-0.12±0.01↓	-0.12±0.01↓

Tablo 25. Erkek fare GF dokusu protein ikincil yapı değişimi

	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	-0.17±0.02	-0.24±0.02↑	-0.23±0.01↑	-0.22±0.02↑	-0.19±0.02↑
Beta Tabaka	-0.20±0.02	-0.17±0.01↓	-0.18±0.01↓	-0.17±0.02↓	-0.16±0.02↓
Turn	-0.09±0.02	-0.06±0.01↓	-0.05±0.01↓	-0.05±0.00*↓	-0.03±0.00*↓
Random Coil	-0.08±0.01	-0.09±0.02↑	-0.09±0.01↑	-0.11±0.01*↑	-0.09±0.02↑
Agrege Beta Tabaka	-0.15±0.02	-0.13±0.02↓	-0.13±0.01↓	-0.10±0.01↓	-0.14±0.01↓

Tablo 26. Dişi fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi

	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	-0.18±0.01	-0.22±0.04↑	-0.20±0.03↑	-0.24±0.01*↑	-0.19±0.01↑
Beta Tabaka	-0.17±0.01	-0.13±0.02↓	-0.12±0.01↓	-0.10±0.01*↓	-0.12±0.02↓
Turn	-0.09±0.00	-0.02±0.01*↓	-0.02±0.01*↓	-0.02±0.01*↓	-0.04±0.01↓
Random Coil	-0.06±0.00	-0.08±0.01↑	-0.07±0.01↑	-0.09±0.00*↑	-0.07±0.01↑
Agrege Beta Tabaka	-0.12±0.01	-0.10±0.007↓	-0.09±0.01↓	-0.11±0.01↓	-0.10±0.01↓

Tablo 27. Erkek fare IF dokusu protein ikincil yapı değişimi

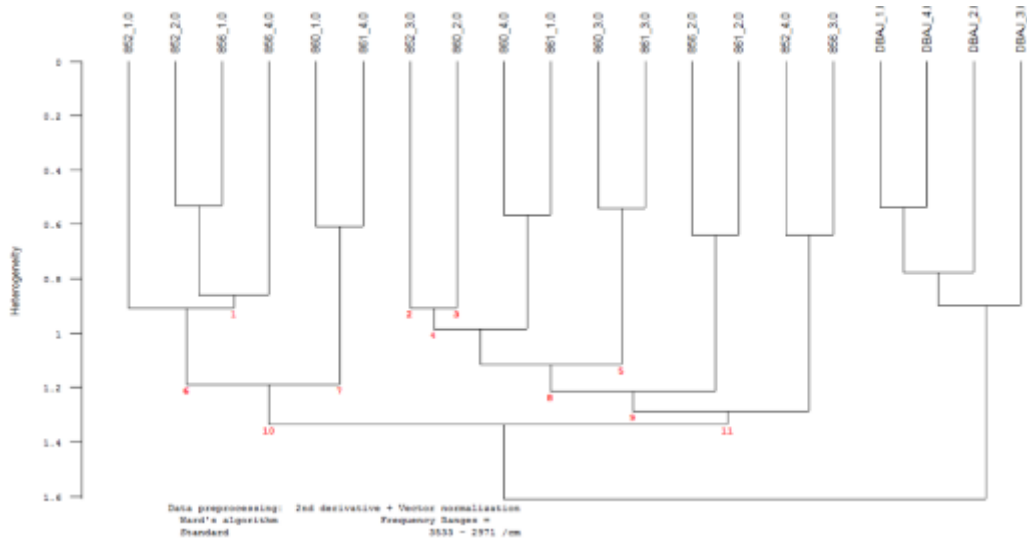
	Kontrol	852	856	860	861
Alfa Heliks	-0.16±0.01	-0.19±0.01↑	-0.18±0.01↑	-0.17±0.02↑	-0.20±0.02↑
Beta Tabaka	-0.17±0.02	-0.13±0.01↓	-0.12±0.01↓	-0.10±0.01*↓	-0.13±0.02↓
Turn	-0.10±0.00	-0.04±0.01↓	-0.01±0.00*↓	-0.02±0.01*↓	-0.02±0.01*↓
Random Coil	-0.05±0.01	-0.06±0.01↑	-0.08±0.01↑	-0.09±0.00*↑	-0.09±0.02↑
Agrege Beta Tabaka	-0.13±0.01	-0.10±0.01↓	-0.11±0.01↓	-0.08±0.01**↓	-0.10±0.01↓

Her iki metodla elde edilen protein ikincil yapılarındaki değişimler hem erkek hem de dişi bireylerde gonadal ve inguinal dokularda random coil miktarında artışın olduğunu göstermiştir ki buda özellikle inguinal dokularda obeziteye bağlı proteinlerde denatürasyonun olduğunu göstermektedir (Cakmak v.d. 2011, Bozkurt v.d. 2012).

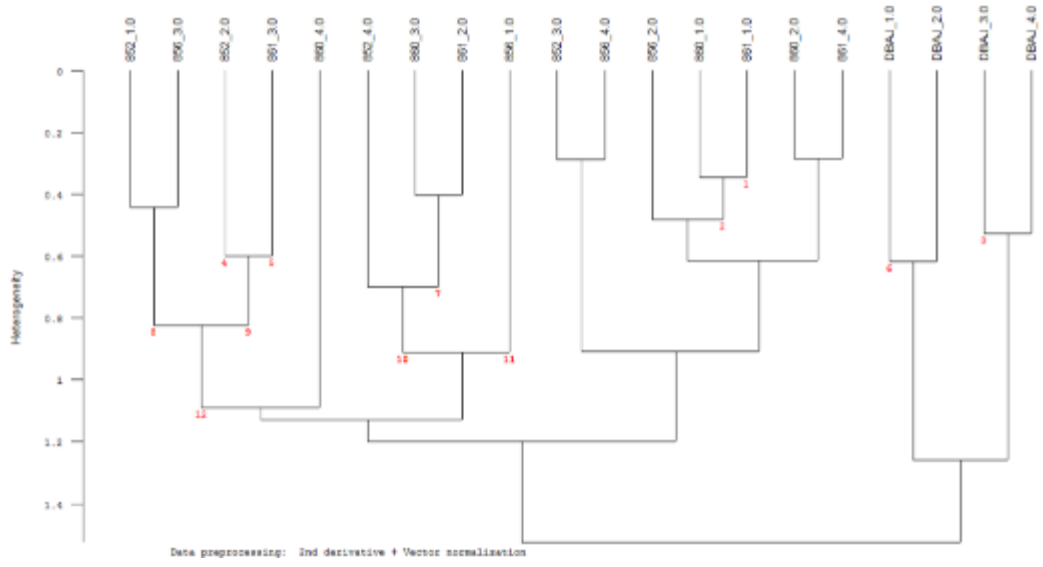
4.1.3. Kemometrik analizler

4.1.3.1. Hiyerarşik Kümeleme analizi uygulama sonuçları

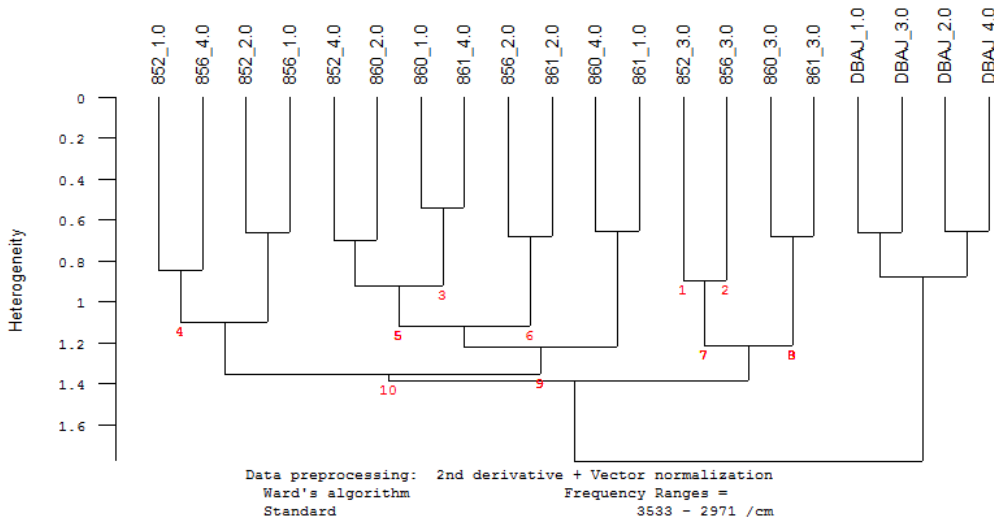
ATR-FTIR spektrumlarına değişik spektral bölgelerde hiyerarşik kümeleme analizi metodu uygulandı. Önce kontrol DBAJ örnekleri ile birlikte BMFI ırkları birlikte değerlendirildi ve Şekil 28-31'den görüleceği üzere her iki cinsiyette ve her iki adipoz dokuda obez ırklar kontrol DBAJ ırkından başarılı ile ayrıldı. Fakat BMFI ırkları arasında ayrım elde edilemedi. BMFI ırklarını ayırabilmek için analiz metodu sadece BMFI ırklarına uygulandı. Şekil 32-35'de bu ayrım sonuçları görülmektedir.



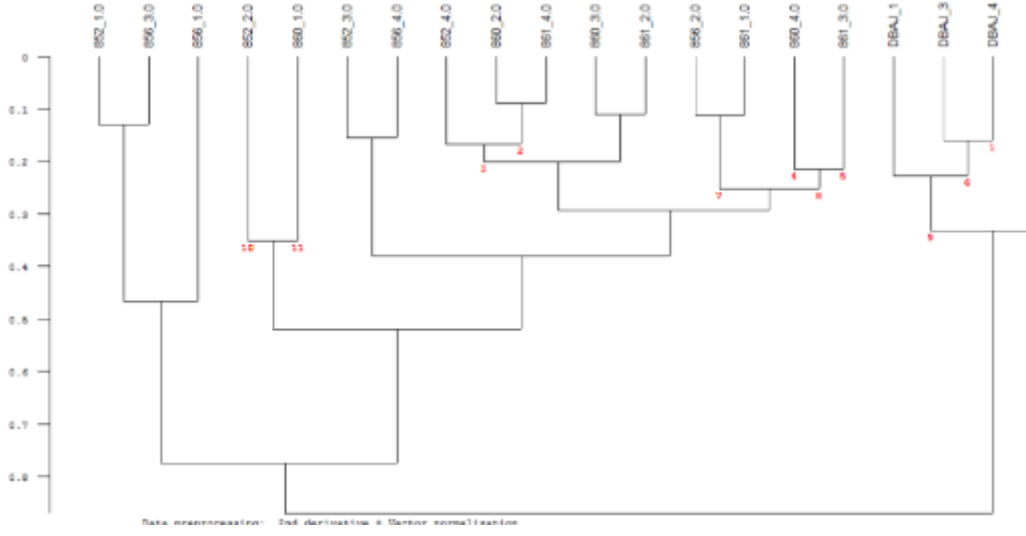
Şekil 28. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) dişi bireylere ait gonadal adipoz doku kümeleme analizi sonucu



Şekil 29. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) erkek bireylere ait gonadal adipöz doku kümeleme analizi sonucu

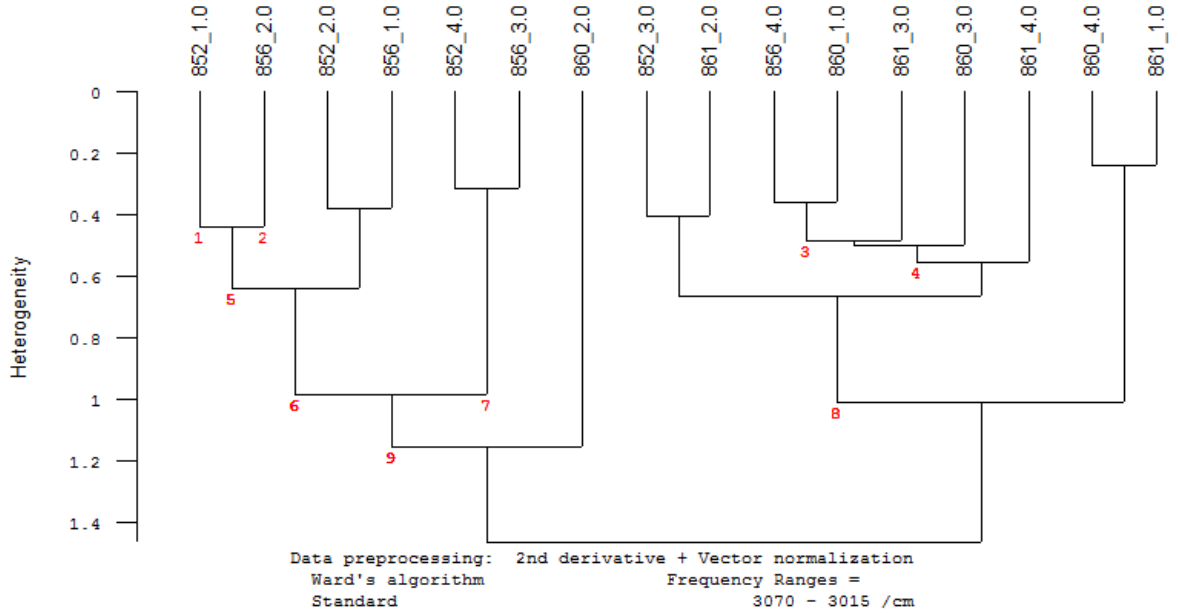


Şekil 30. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) dişi bireylere ait inguinal adipöz doku kümeleme analizi sonucu

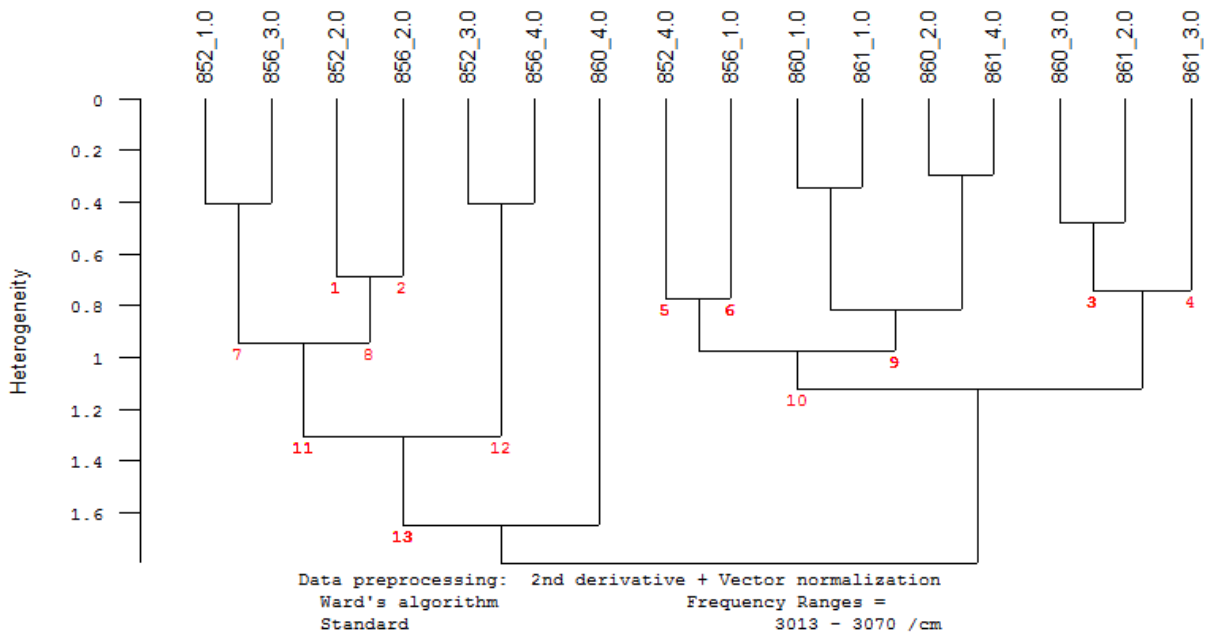


Şekil 31. Obez (BFMI) ve kontrol (DBAJ) erkek bireylere ait inguinal adipoz doku kümeleme analizi sonucu

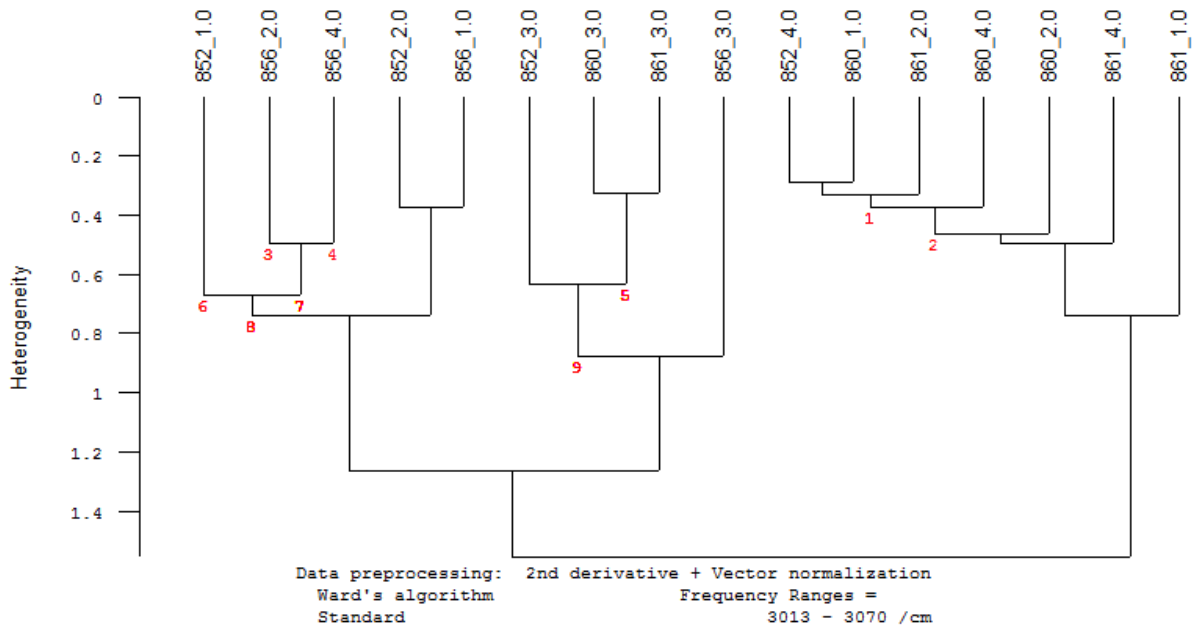
Şekil 32-35'te BMFI ırklarına uygulanmış kümeleme analizi sonucu görülmektedir. Şekillerden görüleceği üzere BMFI 860 ve 8861 aynı kümelemede, BMFI 852 ile 856 da birarda baska bir kümelemede yer almışlardır. Bu sonuçlara göre obeziteye en yatkın tip oldukları düşünülen BMFI 860 ve 861 ırkları, diğer ırklardan (BMFI 852 ve 856) başarı ile (8 örnekte 7 si olmak üzere) ayrılmışlardır.



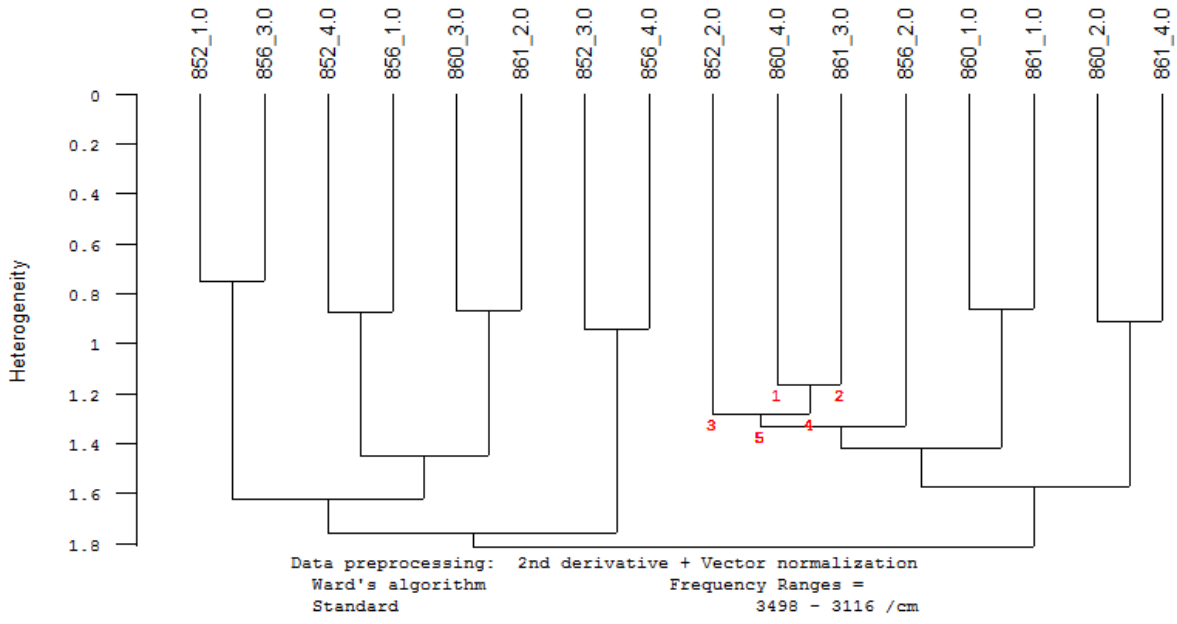
Şekil 32. Obez (BFMI) dişi bireylere ait gonadal adipoz doku kümeleme analizi sonucu



Şekil 33. Obez (BFMI) erkek bireylere ait gonadal adipoz doku kümeleme analiz sonucu



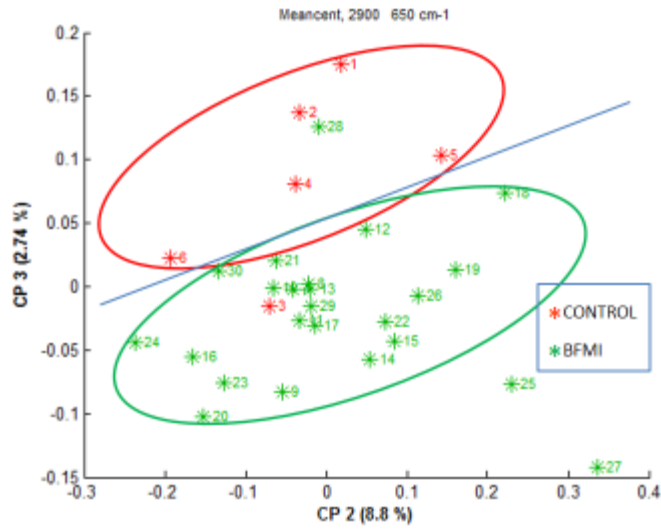
Şekil 34. Obez (BFMI) dişi bireylere ait inguinal adipoz doku kümeleme analiz sonucu



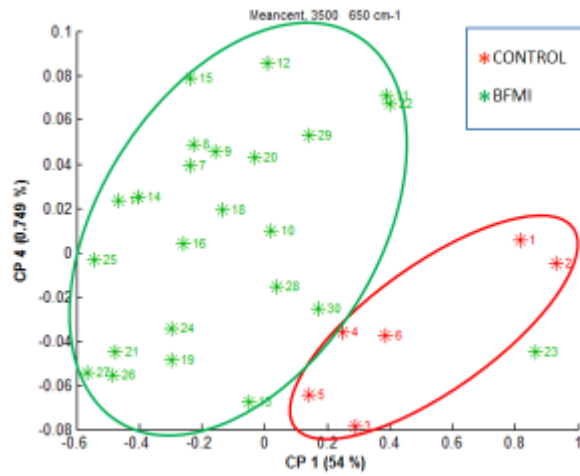
Şekil 35. Obez (BFMI) erkek bireylere ait inguinal adipoz doku kümeleme analiz sonucu

4.1.3.2. PCA analizi sonuçları

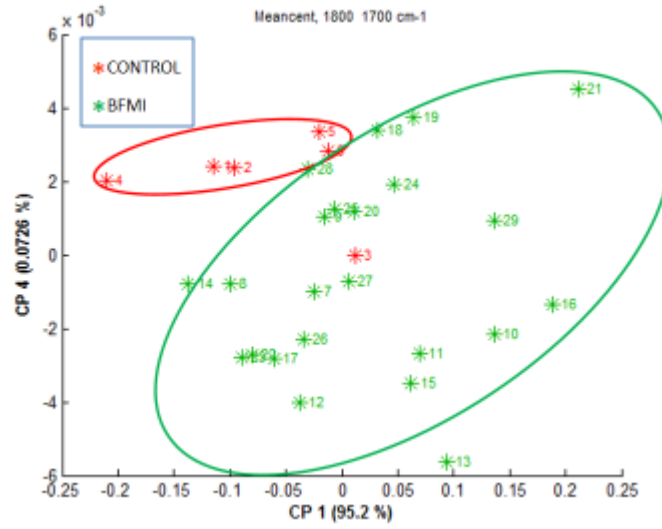
Tüm BFMI ırkları birlikte tek BFMI grubu olarak değerlendirildiğinde ve kontrol DBAJ ırkı ile birlikte PCA analizi uygulandığında kontrol grubunun BFMI ırklarından başarı ile ayrıldığı Şekil 36, 37, 38 ve 39 da görülmektedir.



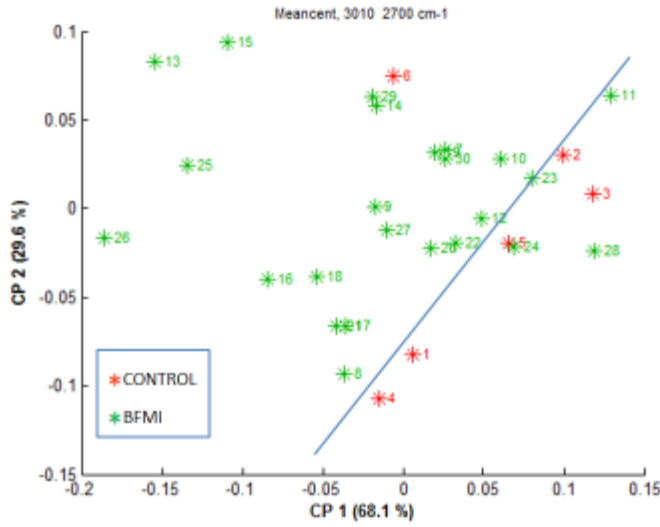
Şekil 36. Dişi GF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.



Şekil 37. Dişi IF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.

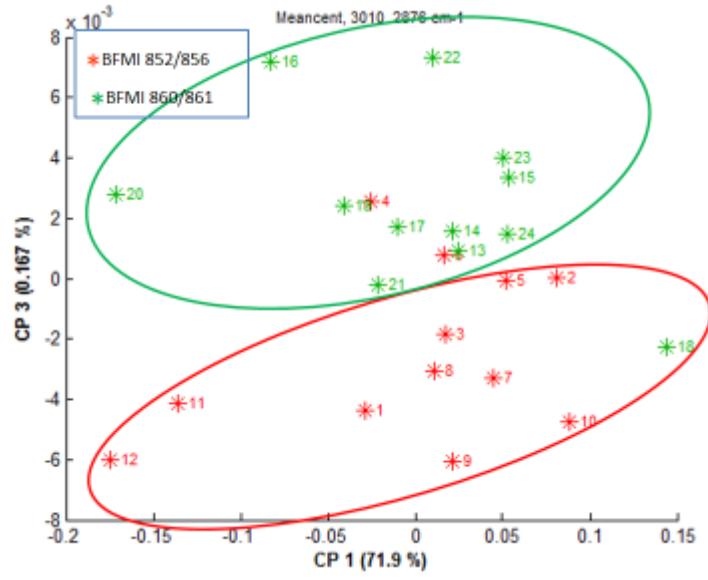


Şekil 38. Erkek GF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.

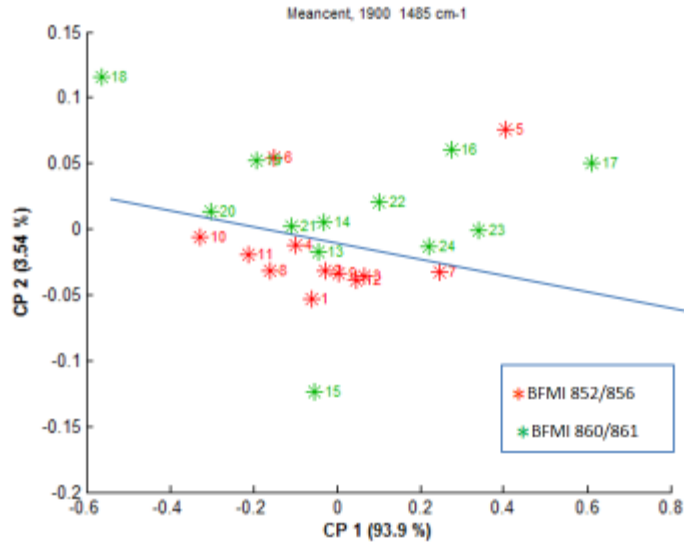


Şekil 39. Erkek IF BFMI ırklarının kontrol DBAJ ırkından PCA analizi ile ayrışması.

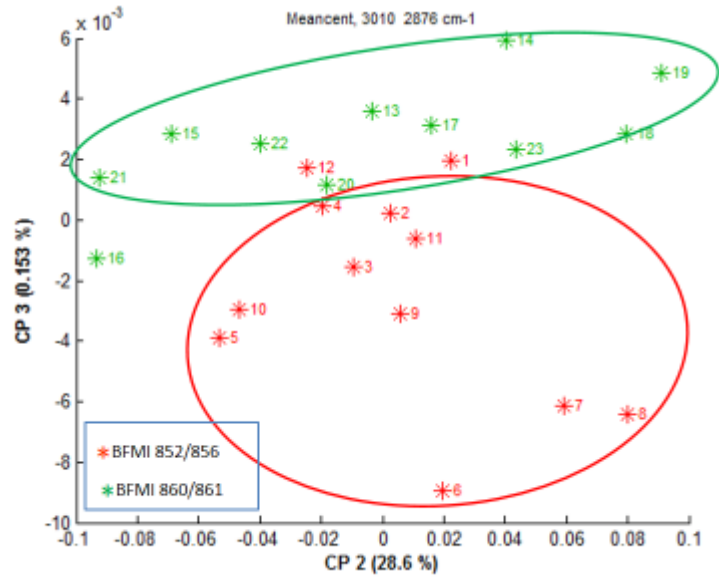
Bundan sonraki aşamada proje kapsamında yapılan FTIR spektroskopisi ve mikroskopisi sonuçları göz önüne alınarak genelde benzer özellik gösteren BFMI 860 ve 861 ırkları bir arada ve BFMI852 ve 856 ırkları birarada 2 gruba ayrılarak PCA analizi uygulandığında iki grup arasında başarılı bir ayrışma elde edilmiştir (Şekil 40, 41, 42 ve 43).



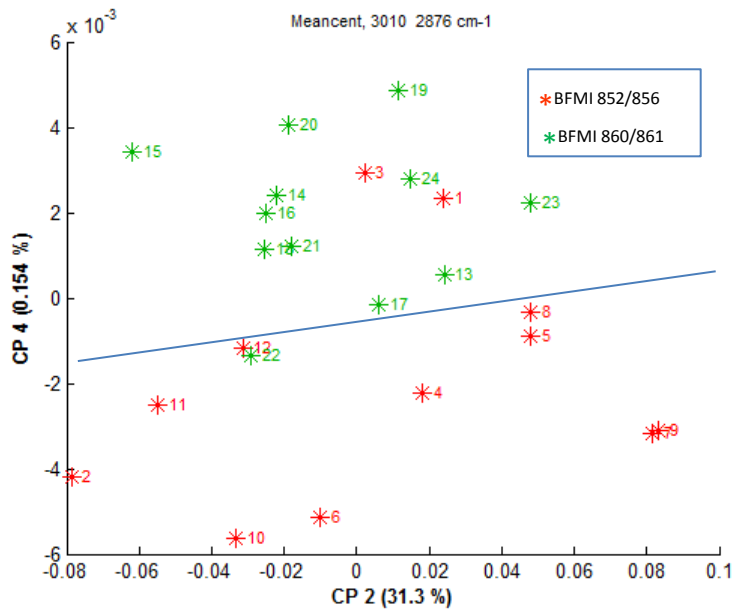
Şekil 40. Diş GF BFMI 852/856 irkları ile BFMI 860/861 irklarının PCA metodu ile ayrışması.



Şekil 41. Diş IF BFMI 852/856 irkları ile BFMI 860/861 irklarının PCA metodu ile ayrışması



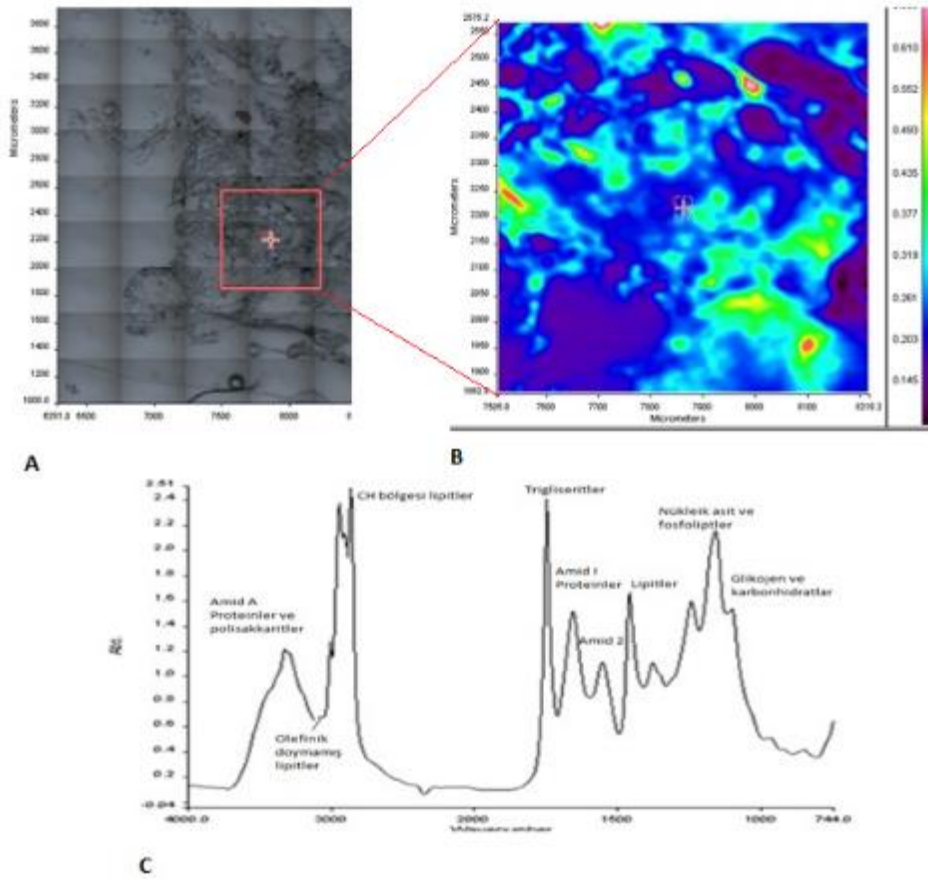
Şekil 42. Erkek GF BFMI 852/856 ırkları ile BFMI 860/861 ırklarının PCA metodu ile ayrışması.



Şekil 43. Erkek IF BFMI 852/856 ırkları ile BFMI 860/861 ırklarının PCA metodu ile ayrışması.

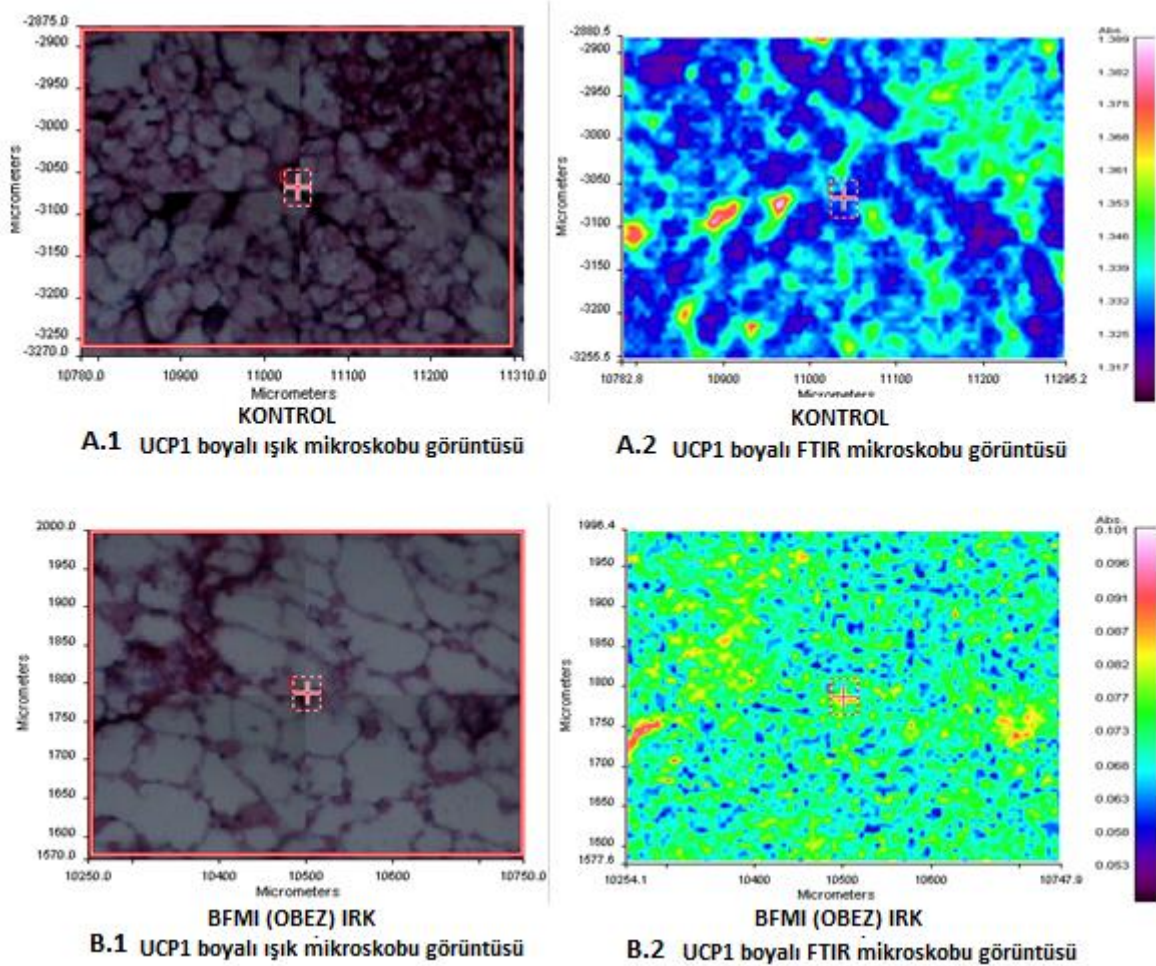
4.2. FTIR mikrospektroskopisi çalışmaları

Çalışmamızda kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları gonadal ve inguinal adipoz doku içeriğindeki makromoleküllerin, özellikle lipitlerin dağılımının ve farklı özellikte lipitlerin buldukları yerleri tespit etmek için FTIR mikrospektroskopisi tekniği kullanılmıştır. Şekil 44'de FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş kesit görüntüsü (A), seçilen bir bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B), ve elde edilen spektral haritadan çıkarılan örnek bir adipoz doku spektrumu (C) görülmektedir. Bandların etiketlenmesi ve tanımları gereç ve yöntemler kısmında Şekil 13 ve Tablo 11 de yer belirtilmiştir.



Şekil 44. Örnek bir kontrol (DBAJ) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş kesit görüntüsü (A), kırmızı ile işaretlenmiş bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B), ve elde edilen spektral haritadan çıkarılan örnek bir adipoz doku spektrumu (C) görülmektedir.

Çalışmamızda ilk olarak, inguinal ve gonadal adipoz dokularında transdiferansiyasyondan kaynaklanan kahverengi adipoz doku (BAT) ve beyaz adipoz doku (WAT) oranlarındaki değişimi (transdiferansiyasyon) gözlemlemek adına UCP1 immunohistolojik boyama tekniğiyle kontrol ve obez ırklar boyanmış ve belli alanlar ışık mikroskobunda incelenmiştir. Yine aynı alanların FTIR mikrospektroskopisi ile toplam soğurma spektral haritaları çıkartılmış ve incelenmiştir. Örnek sonuçlar Şekil 45 A ve B'de verilmiştir. Çalışmalar sonucu kontrol (DBAJ) ve obez (BFMI) gruplar karşılaştırıldığında, WAT ve BAT dokularında anlamlı farklar tespit edilmiş ve bunun sonucunda, SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitleri FTIR görüntüleme yöntemi ile incelenmiştir.



Şekil 45. Örnek bir kontrol (DBAJ) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (A.1), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (A.2), Örnek bir obez (BFMI) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (B.1), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B.2) görülmektedir.

Toplanan spektral haritalar üzerinde özel analiz programı yardımı ile yapılan yapısal farklılıkları görmeye yönelik ön çalışmalar sonucunda incelenen adipoz doku kesitleri içerisinde farklı özellikte spektrumlara sahip değişik bölgeler bulunduğu gözlenmiştir. Haritalarda temel olarak iki farklı spektrum gözlenmiştir. CH gerilim bölgesi, trigliserit bandı ve amid bantlarında anlamlı farklılıklar görülmüştür (Şekil 45). Adipoz dokunun sahip olduğu bu yapısal farklılıklar dokuların hem kontrol (DBAJ) ve hem de BFMI grupları arasında karakterizasyonu sağlamıştır.

Gözlenen bu farklılıkların daha detaylı olarak incelenmesi için haritalar üzerinde daha önce ATR çalışmalarında kullanılan bazı bant alan oranları hesaplanmıştır. Buna göre, kesitlerdeki lipit/protein dağılımı (C-H gerilme /amid 1), lipitlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim), doymamış/doymuş lipitlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim) ve karbonhidrat/protein dağılımı (1030 cm⁻¹/amid 1) hesaplandı.

Şekil 46'te SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerinde C-H gerilme bandları toplam alanının amid I bant alanına oranlanması ile elde edilen lipit/protein spektral parametresinin dağılımı görülmektedir. Şekilden görülebileceği üzere, bu oran genel olarak BFMI852 ırkında daha düşük, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında ise gonadal dişi bireyler dışındaki bireylerde nispeten yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar FTIR-ATR sonuçlarımızla uyum içindedir. Daha önce belirtildiği gibi BFMI860 ve BFMI861 ırklarında hem lipit hem de protein içeriği en yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu ırklarda lipit/protein oranında gözlenen artış protein artımının lipit miktarındaki artıma nazaran daha az olduğundan kaynaklanabilir.

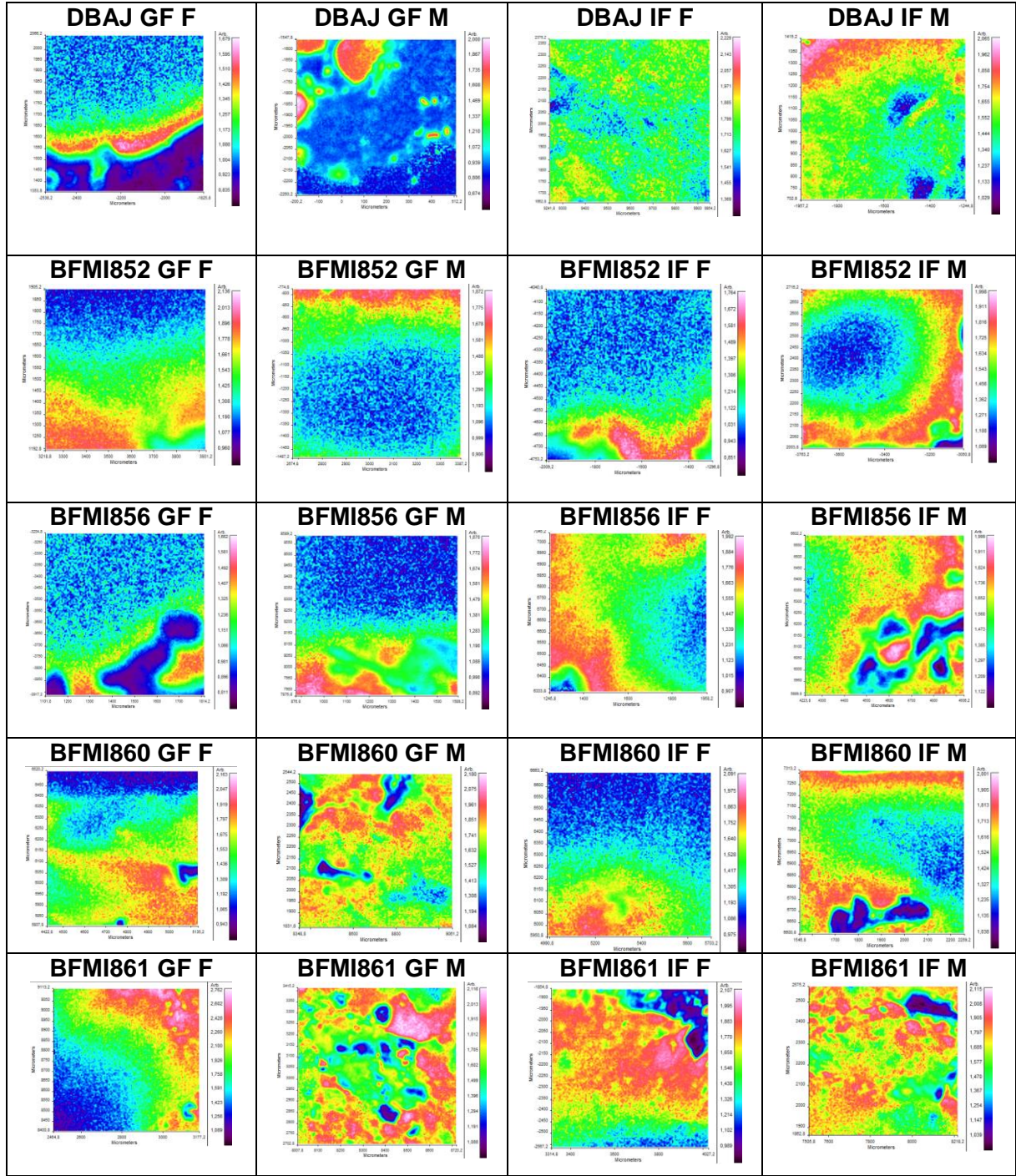
Şekil 47'de SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerinde lipit yapılarındaki hidrokarbon zincir uzunluğunun dağılımı hakkında bilgi veren CH₂ antisimetrik bant alanının CH₃ antisimetrik bant alanına oranının dağılımı görülmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere bu oran inguinal adipoz dokusunda BFMI860 ve BFMI861 ırklarında, diğer ırklara nazaran daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu oranın yüksek olması bu ırklarda daha uzun hidrokarbon zincirli lipitlerin yer aldığını göstermektedir.

Şekil 48 'de SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerinde olefinik bant alanının CH₂ antisimetrik bant alanına oranlanması ile elde edilen ve doymamış lipit içeriği indeksi olarak kullanılacak parametrenin dağılımı görülmektedir. Şekilden de görülebileceği gibi, genel olarak inguinal adipoz doku dişi ve erkek bireylerde doymamış lipit indeksinin daha düşük olduğu görülmüştür.

Gonadal adipoz doku dişi ve erkek bireylerinde ise özellikle BFMI852 ve BFMI 856 ırklarında nispeten daha yüksek doymamışlık indeksi gözlenmiştir. Bu sonuçlar FTIR-ATR sonuçlarımızla uyum içindedir.

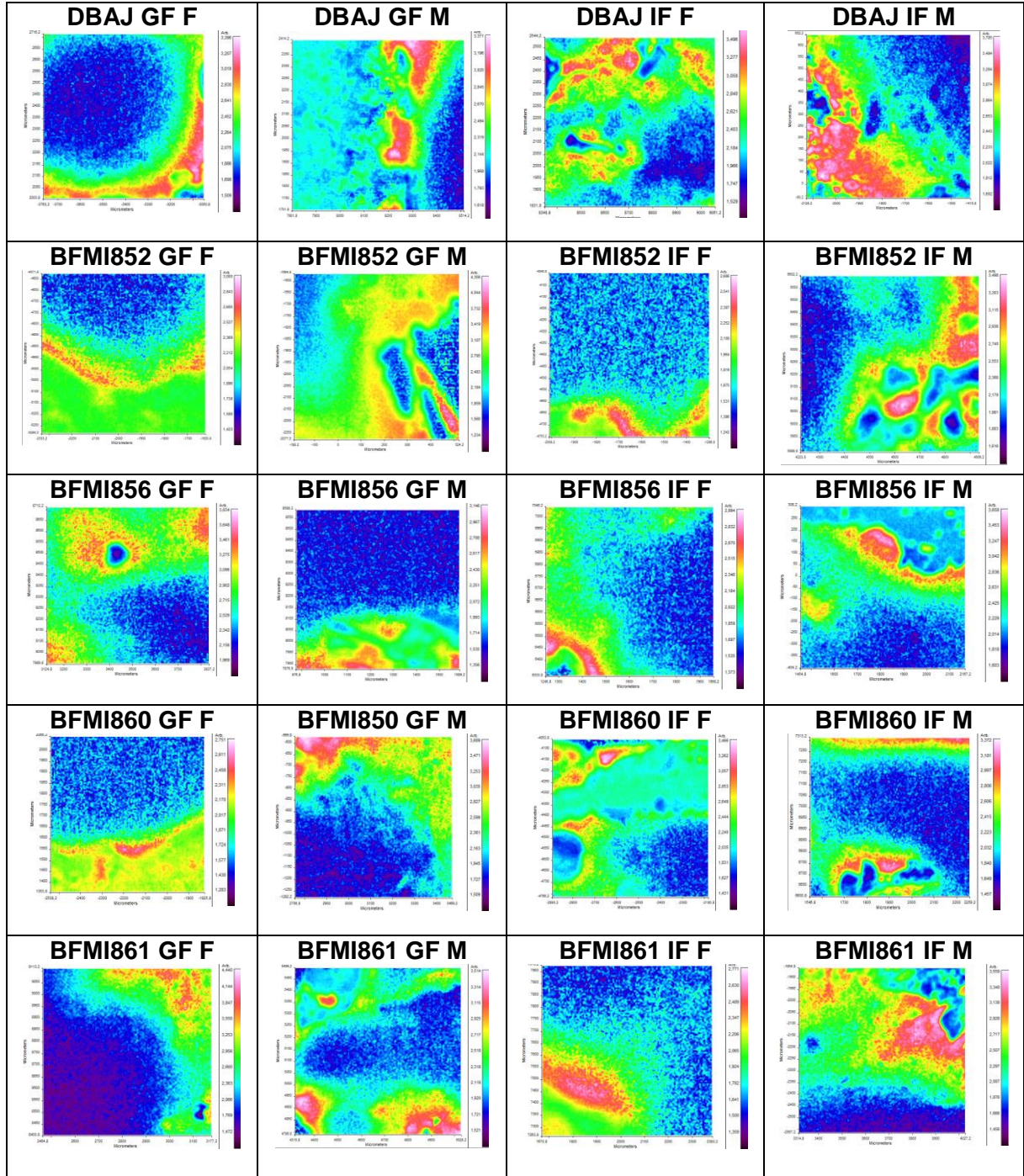
Şekil 49'da SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerinde 1027-1030 cm^{-1} toplam alanının amid I bant alanına oranlanması ile elde edilen karbonhidrat/protein spektral parametresinin dağılımı görülmektedir. Bu dağılım haritalarından da görüldüğü üzere tüm ırklarda dişi bireylere ait gonadal adipoz doku örneklerinde bu oranın diğer örneklere göre daha yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. Bunun sebebi bu bireylerde görülen yüksek metabolizma hızı olabilir.

Şekil 50'de SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerinde karbonil grubu alanının C-H gerilme bölgesi toplam alanına oranlanması ile elde edilen karbonil grubu/C-H toplam alanı spektral parametresinin dağılımı görülmektedir. Tüm BFMI ırklarındaki edilen karbonil grubu/C-H toplam alanı kontrol (DBAJ) grubuna göre fazladır. Irklar birbirleriyle karşılaştırıldığında, şekilden de görülebileceği üzere, bu oran genel olarak BFMI852 ve BFMI856 ırklarında daha düşük, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında ise nispeten yüksek olarak tespit edilmiştir. Irklar kendi içinde değerlendirildiğinde edilen karbonil grubu/C-H toplam alanı oranı inguinal adipoz dokuda daha yüksek gonadal adipoz dokuda ise daha düşüktür.



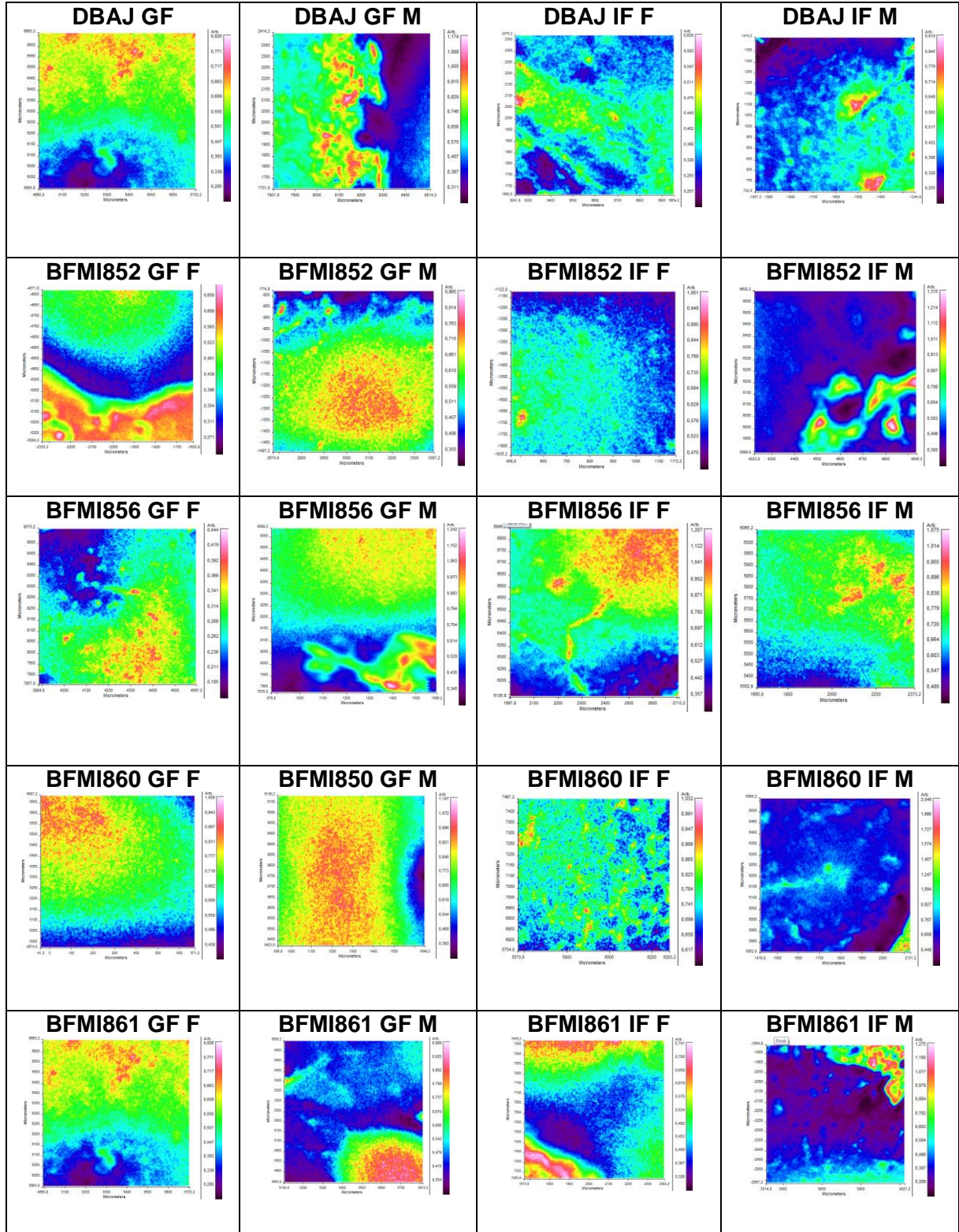
Şekil 46. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki lipid/protein bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar

(GF: Gonadal adipoz doku, IF: inguinal adipoz doku, F: dişi birey, M: erkek birey)



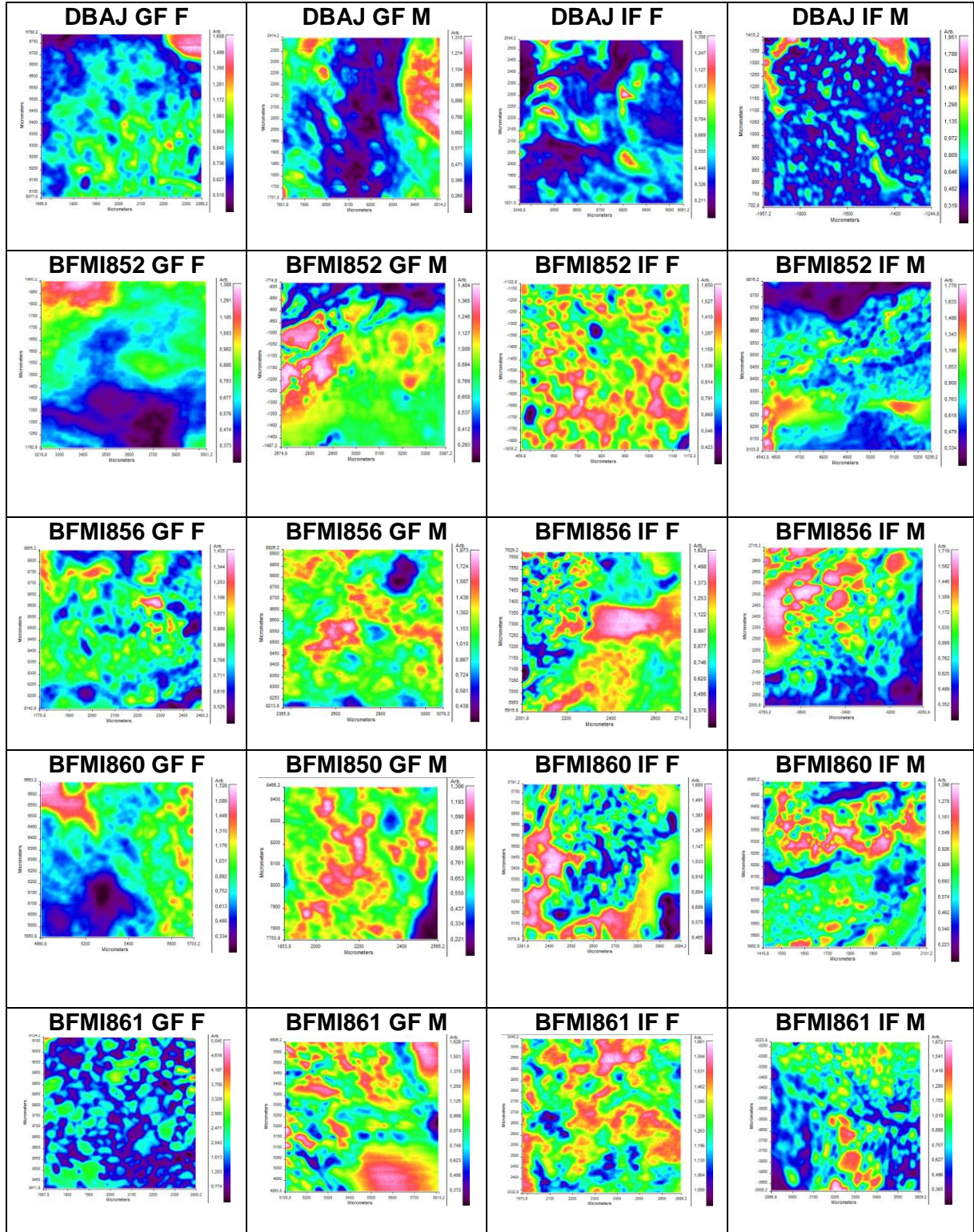
Şekil 47. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki CH_2 antisimetrik gerilim bant alanı/ CH_3 antisimetrik gerilim bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.

(**GF:** Gonadal adipoz doku, **IF:** inguinal adipoz doku, **F:** dişi birey, **M:** erkek birey)



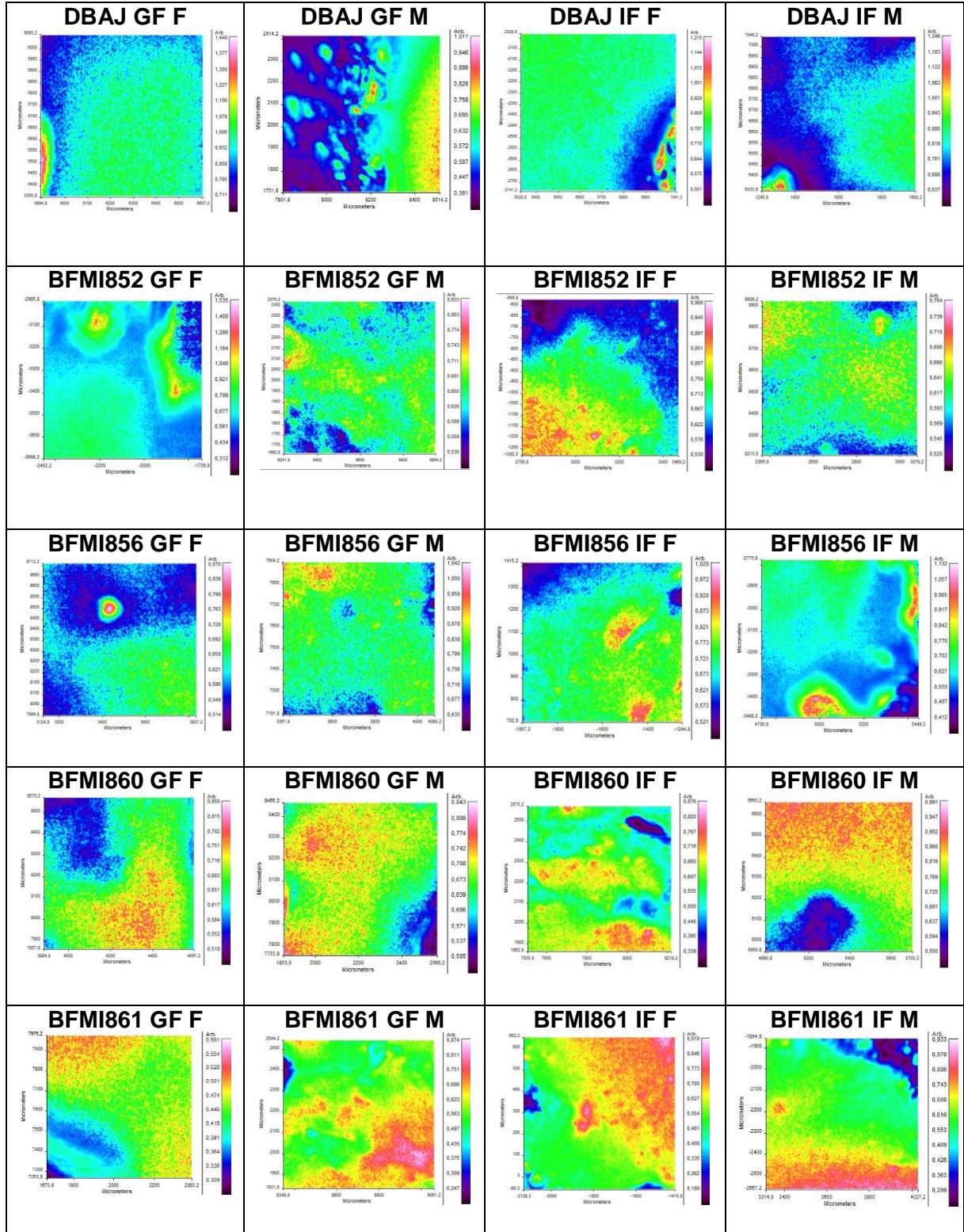
Şekil 48. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki olefinik bant alanı/ CH₂ antisimetrik bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.

(GF: Gonadal adipoz doku, IF: inguinal adipoz doku, F: dişi birey, M: erkek birey)



Şekil 49. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki karbohidrat/protein bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.

(GF: Gonadal adipoz doku, IF: inguinal adipoz doku, F: dişi birey, M: erkek birey)



Şekil 50. SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerindeki karbonil grubu /CH toplam alan bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar

(GF: Gonadal adipoz doku, IF: inguinal adipoz doku, F: dişi birey, M: erkek birey)

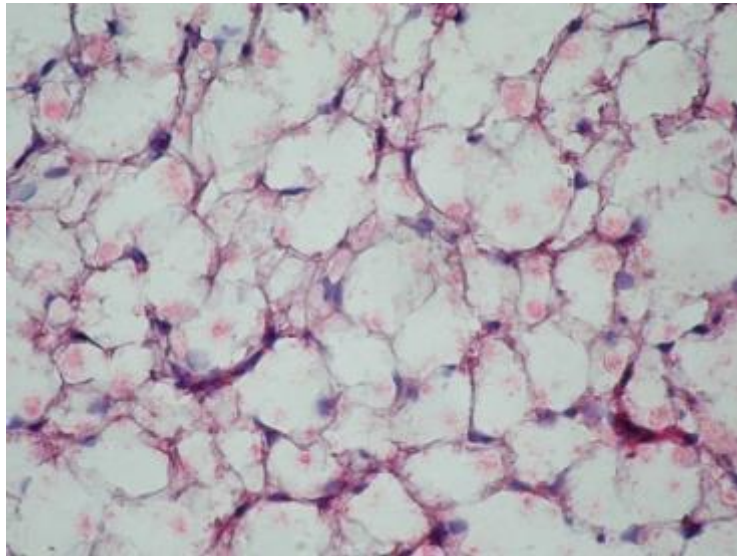
Görüldüğü gibi, kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerinde FTIR mikrospektroskopik görüntüleme çalışmaları ile elde edilen bu sonuçlar ATR-FTIR spektroskopik metodu ile elde edilen sonuçları desteklemektedir. ATR-FTIR spektroskopik metodu ile tespit edilen değişimlerde yine BFMI ırklarının kontrol (DBAJ) ırka oranla daha fazla lipit stoğuna sahip olduğu, inguinal adipoz dokuda gonadal adipoz dokuya oranla lipit açil zincir uzunluğunun daha fazla ve doymamış lipit indeksinin daha düşük olduğu gözlenmiştir.

4.3. WAT VE BAT DOKU çalışmaları

4.3.1. İmmünohistokimyasal boyama çalışmaları

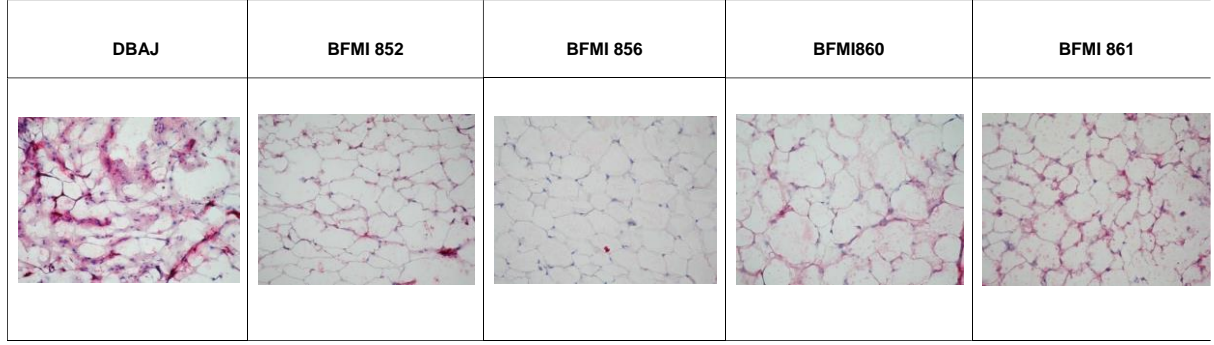
Adipoz dokularının fenotipik karakterizasyonları hakkında bilgi sahibi olabilmek ve obezite mekanizmasını anlamaya katkıda bulunmak amacıyla, kontrol ve obez erkek ve dişi inbred BFMI farelerinde deri altı yağ dokusu olan (inguinal) ve iç organlara ait yağ dokusu olan (gonadal) adipoz dokularında, beyaz adipoz doku (WAT) ve kahverengi adipoz dokuların (BAT) miktarlarındaki değişim UCP1 boyama tekniği ile incelenmiştir. Kullandığımız tekniğe ait prosedür gereği hematoksilin kullanılmış böylelikle eş zamanlı histolojik boyama da yapılmıştır.

Şekil 51'de kontrol (DBAJ) grubu fareden alınmış adipoz dokuya ait mikroskop görüntüsü verilmiştir. Mor renkli kısımlar nükleusları pembe görülen kısımlar ise UCP1 proteinini göstermektedir.

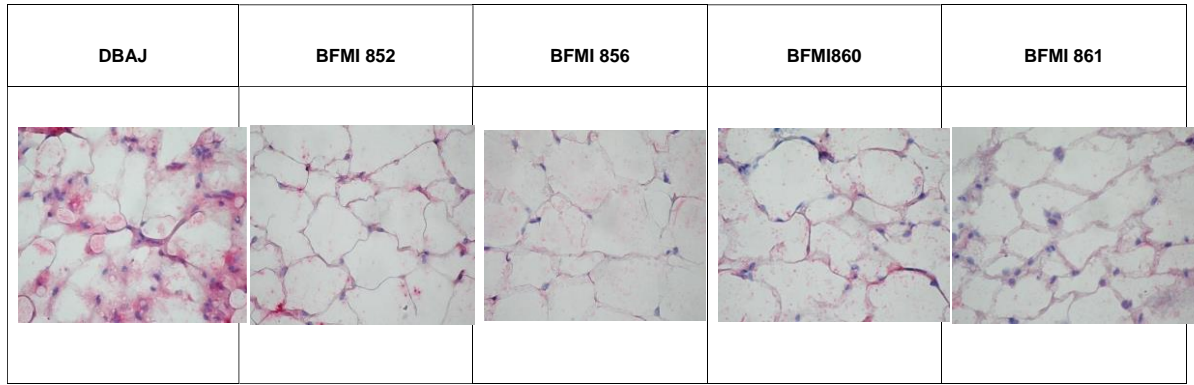


Şekil 51. Kontrol (DBAJ) grubu fareden alınmış adipoz dokuya ait mikroskop görüntüsü (40X)

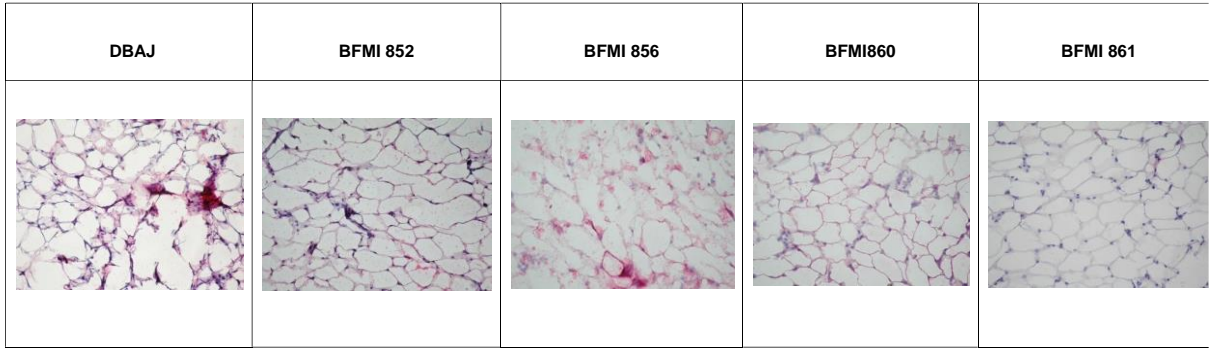
Şekil 52-59'da kontrol ve obez erkek ve dişi inbred BFMI farelerinde IF GF adipoz dokularında ışık mikroskobunda çekilmiş 20X ve 40X büyütme oranına sahip çekimler verilmiştir.



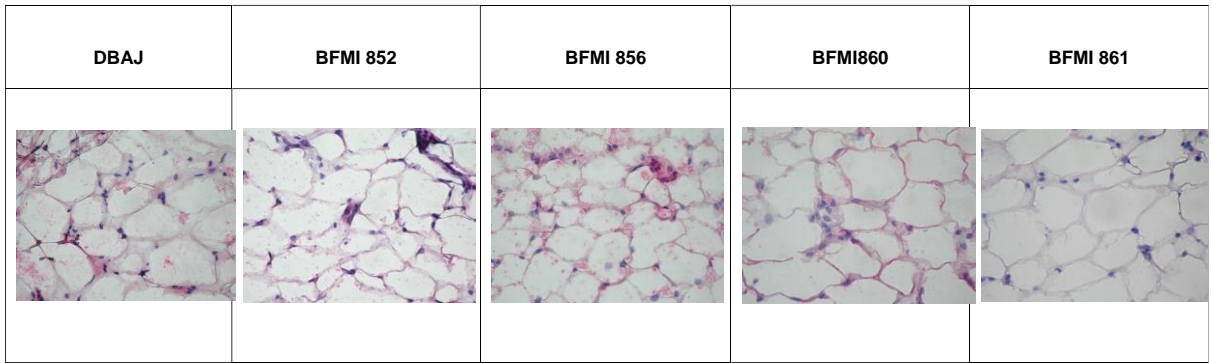
Şekil 52. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskobunda çekilmiş 20X'lik görüntüler



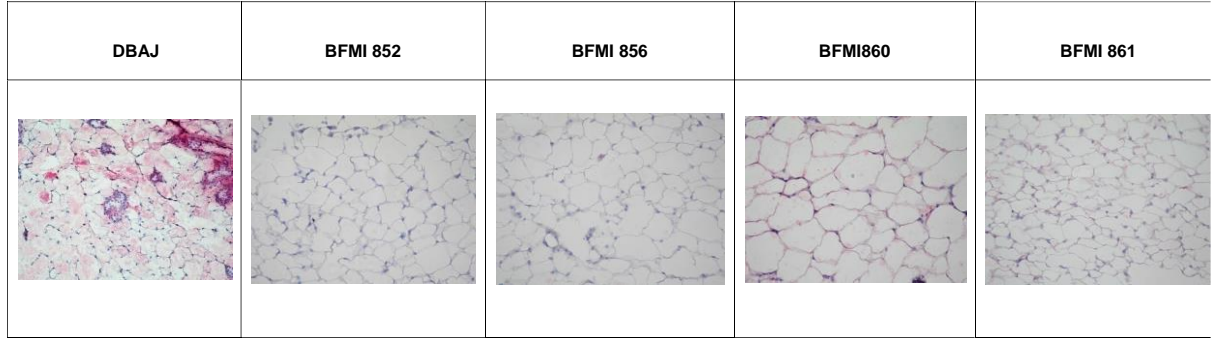
Şekil 53. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskobunda çekilmiş 40X'lik görüntüler



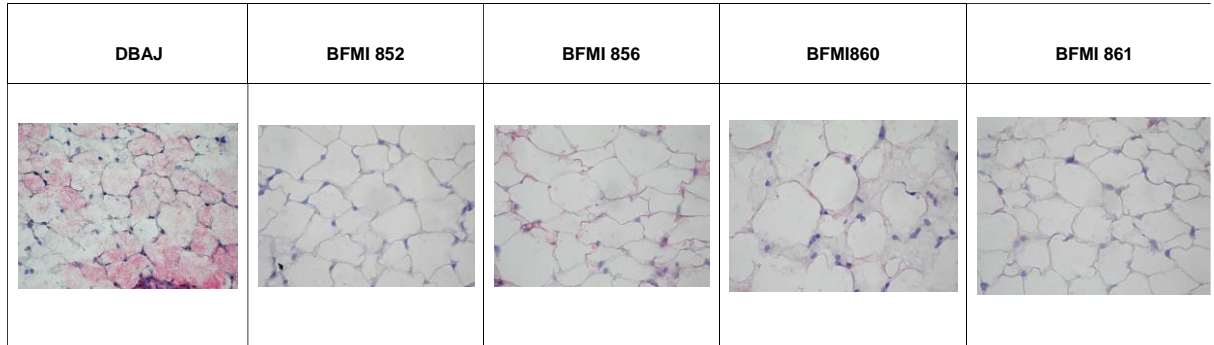
Şekil 54. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntüler



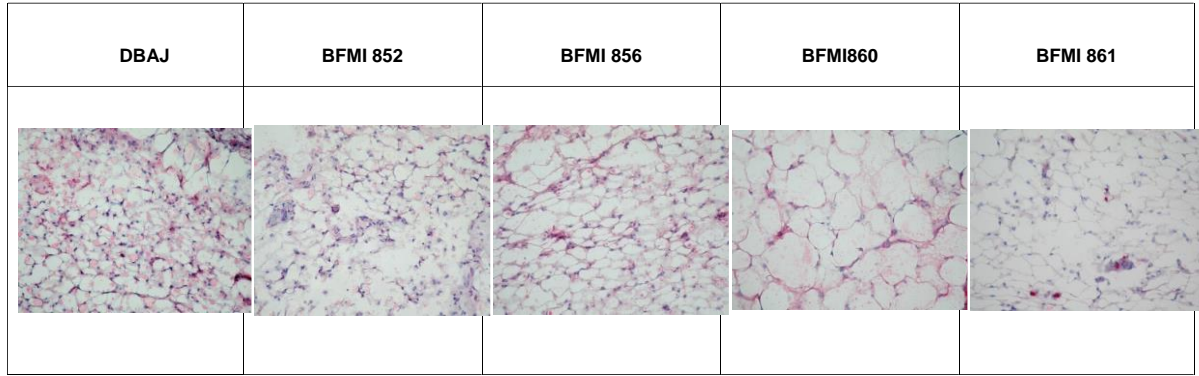
Şekil 55. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait gonadal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntüler



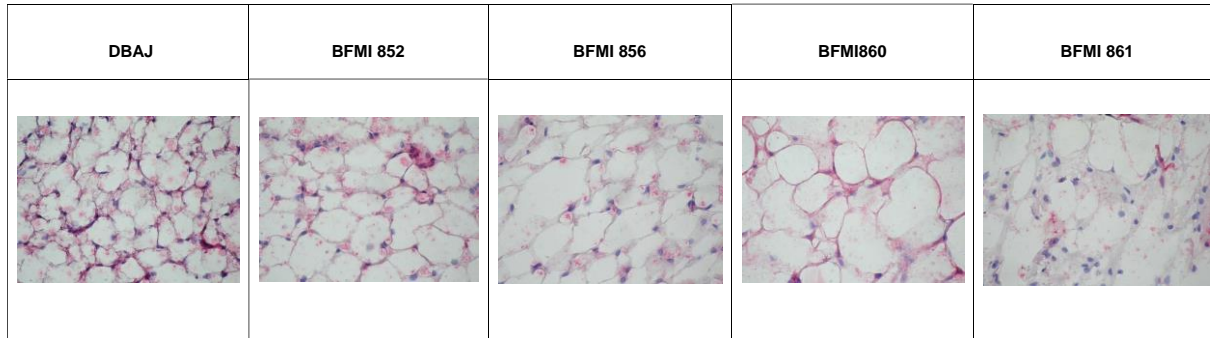
Şekil 56. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntüler



Şekil 57. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntüler



Şekil 58. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntüler



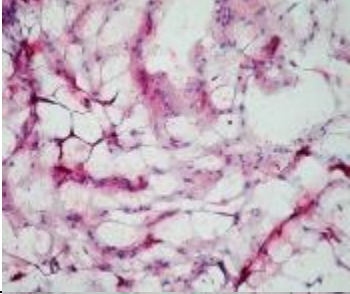
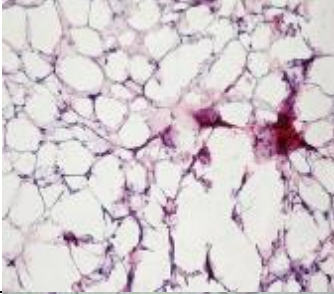
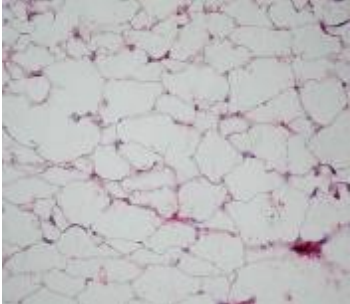
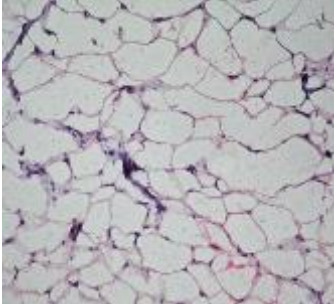
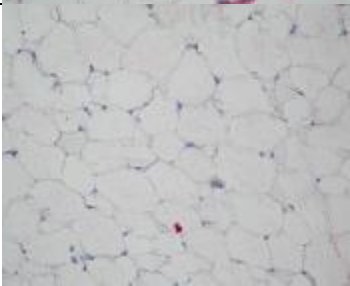
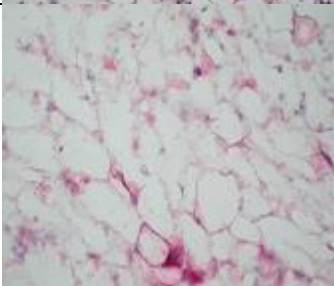
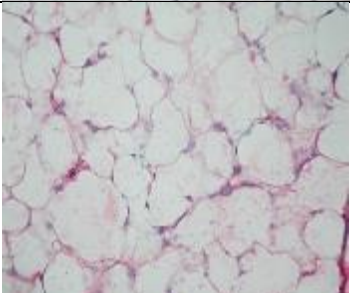
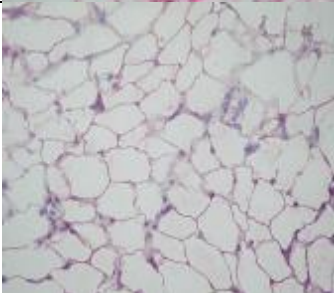
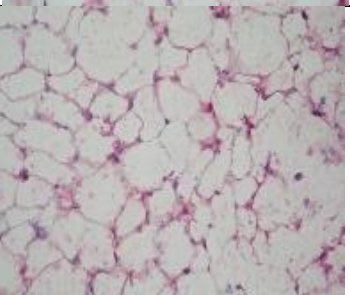
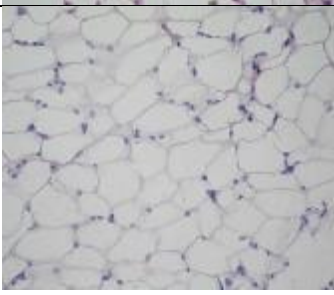
Şekil 59. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları erkek bireye ait inguinal adipoz dokularında ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntüler

Beyaz adipozitler, kahverengi adipozitlere göre daha büyüktür, fakat ikisi de farklı miktarlarda lipitlerden oluşmuştur. Bu lipitler WAT'da tek damlacık şeklinde, BAT'da ise birden çok damlacık şeklinde bulunmaktadır. Sonuçlarda görüldüğü gibi bütün BFMI ırklarında kontrole göre hücrelerin hacimce büyüdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca küçük ve bol nukleuslu kahverengi adipoz doku hücrelerinin kontrol örneklerinde daha çok görüldüğü fakat BFMI ırklarında yerini büyük ve daha az nukleuslu beyaz adipoz doku hücrelerine bıraktığı görülmektedir. Bu dokularda beyaz adipoz doku miktarının artmasına bağlı olarak UCP1 gen ekspresyonunun azalacağı dolayısıyla UCP1 proteinine BFMI ırklarında kontrole kıyasla daha az rastlanması beklenmiş ve elde ettiğimiz sonuçlar bu durumu doğrulamıştır.

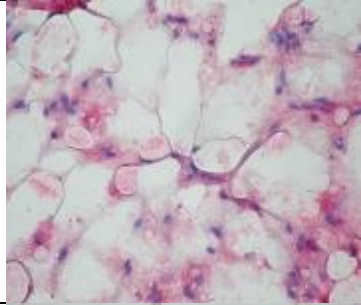
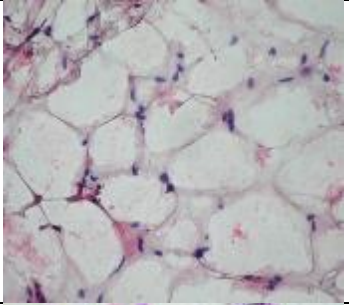
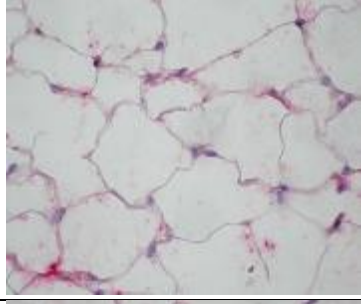
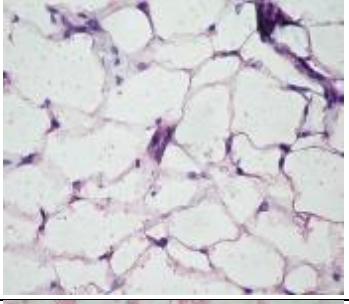
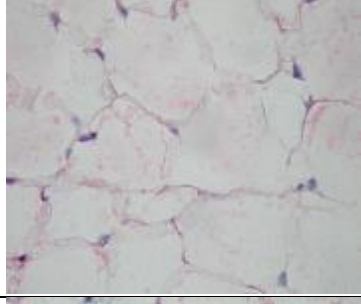
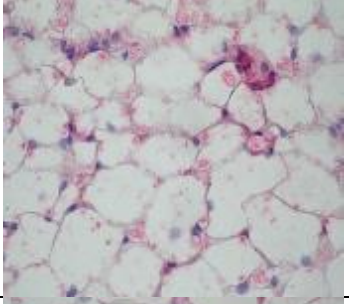
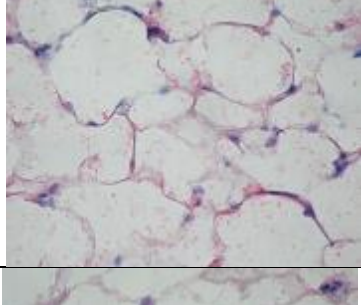
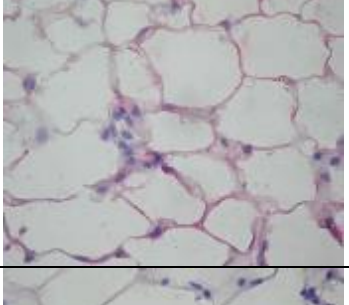
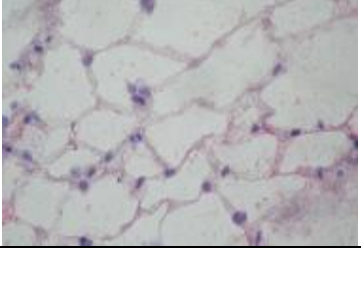
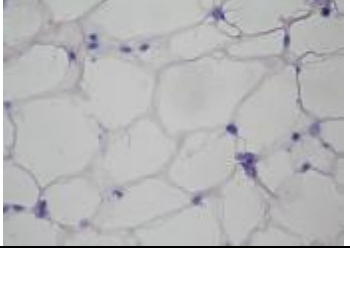
Yapılan gözlemler sonucu beyaz adipoz doku miktarının inguinal dokularda gonadal dokulara nazaran daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum inguinal adipoz dokunun ve gonadal adipoz dokusu hücrelerine göre daha fazla beyaz adipozit içerdiğini dolayısıyla

inguinal dokunun gonadal dokuya göre yağ depolamasına daha yatkın olduğunu göstermektedir. Inguinal adipoz dokusu deri altı yağ dokusu olduğundan daha fazla WAT içermesi ve gonadal adipoz dokusunun iç organlara ait yağ dokusu olması sebebiyle inguinal adipoz dokuya oranla daha az WAT içermesi beklenen bir durumdur ve sonuçlarla uyumludur.

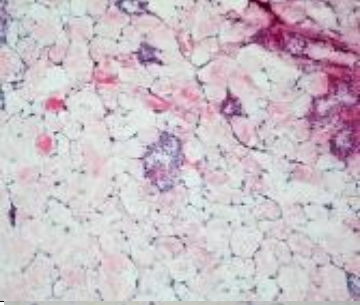
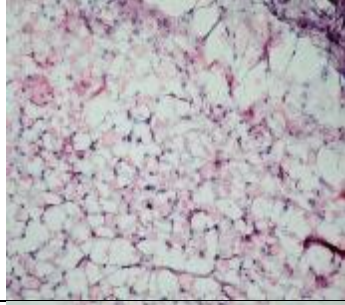
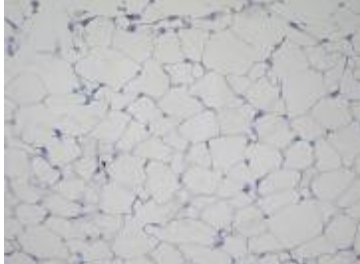
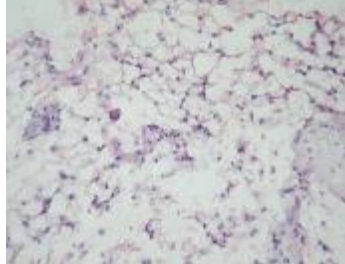
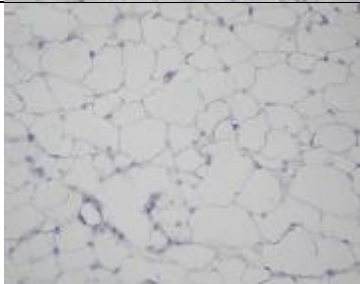
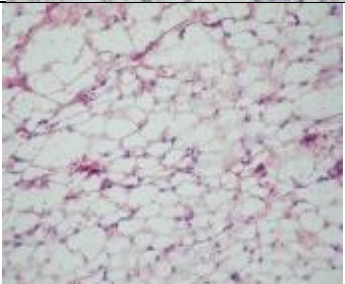
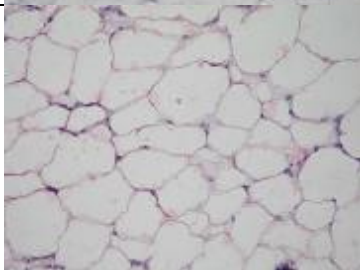
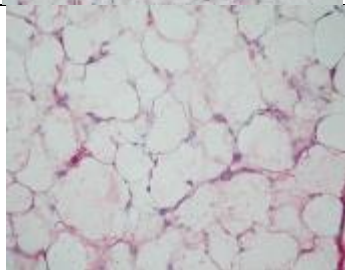
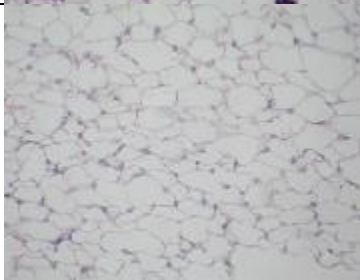
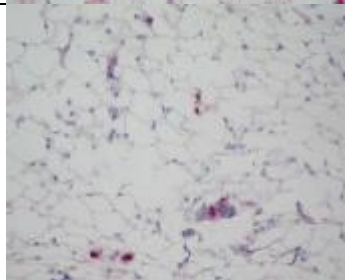
Alınan sonuçlar dişi ve erkek bireyler arasında WAT ve BAT transdiferansiyasyonunu anlamak üzere incelendiğinde genel olarak BFMI ırklarda kontrol(DBAJ) gruba göre UCP1 proteini miktarı dolayısıyla BAT oranının azaldığı ve yerini WAT'a bıraktığı görülmektedir. Inguinal dokular incelendiğinde, BFMI ırkı erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir, özellikle BFMI 852 ve 856 ırklarına ait erkek bireylerde bu fark diğer ırklara göre daha fazla gözlenmiştir. Dişi bireylerde ise yoğun olarak WAT gözlenmiştir. Gonadal dokular incelendiğinde, yine ırkı erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir fakat bu oran inguinal dokulara göre daha azdır. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklara ait dişi ve erkek bireylerin karşılaştırmalı mikroskop görüntüleri Şekil 60-63'de verilmiştir.

	GF DiŖi 20X	GF ERKEK 20X
DBAJ		
BMFI 852		
BMFI 856		
BMFI 860		
BMFI 861		

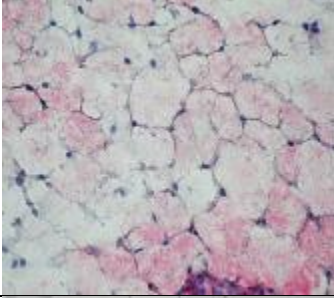
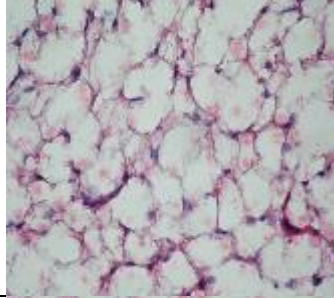
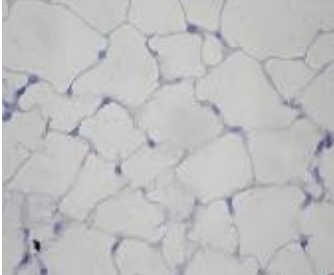
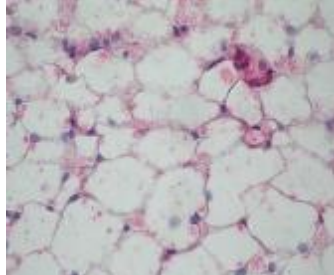
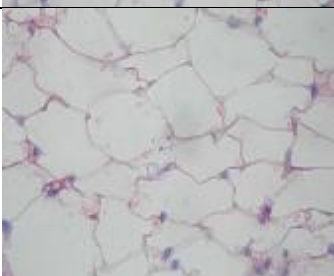
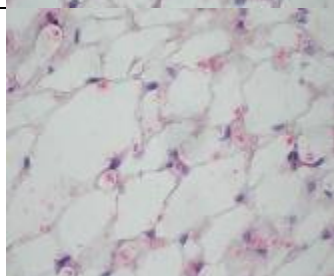
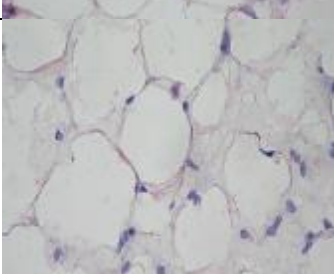
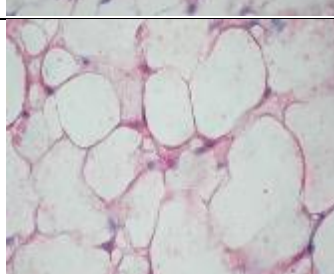
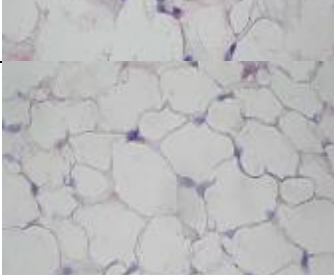
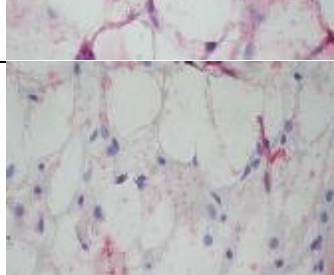
Ŗekil 60. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal adipoz dokuların ışık mikroskopunda çekilmiş 20X'lik görüntülerinde diŖi ve erkek bireylerin karşılaştırılması

	GF Dişİ 40X	GF ERKEK 40X
DBAJ		
BMFI 852		
BMFI 856		
BMFI 860		
BMFI 861		

Şekil 61. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait gonadal adipoz dokuların ışık mikroskopunda çekilmiş 40X'lik görüntülerinde dişİ ve erkek bireylerin karşılaştırılması

	IF Dişi 20X	IF ERKEK 20X
DBAJ		
BMFI 852		
BMFI 856		
BMFI 860		
BMFI 861		

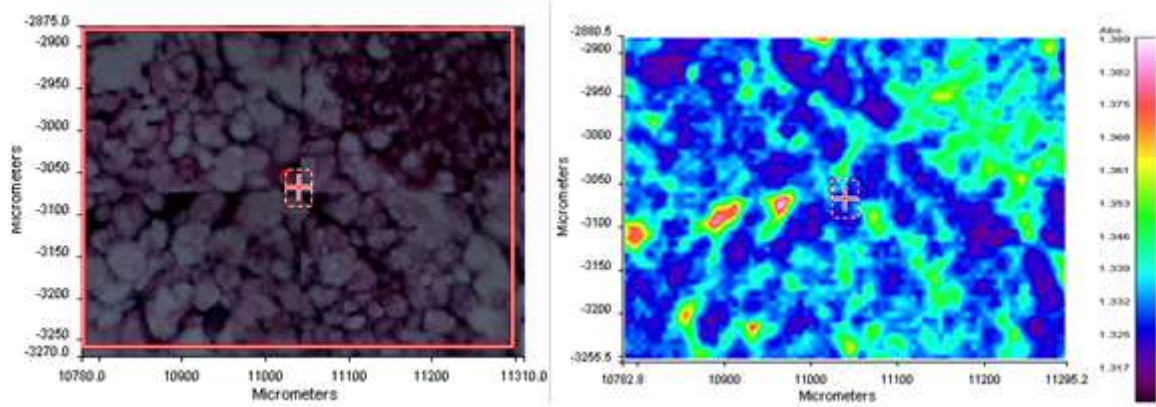
Şekil 62. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait inguinal adipoz dokuların ışık mikroskobunda çekilmiş 20X'lik görüntülerinde dişi ve erkek bireylerin karşılaştırılması

	IF Dişi 40X	IF ERKEK 40X
DBAJ		
BMFI 852		
BMFI 856		
BMFI 860		
BMFI 861		

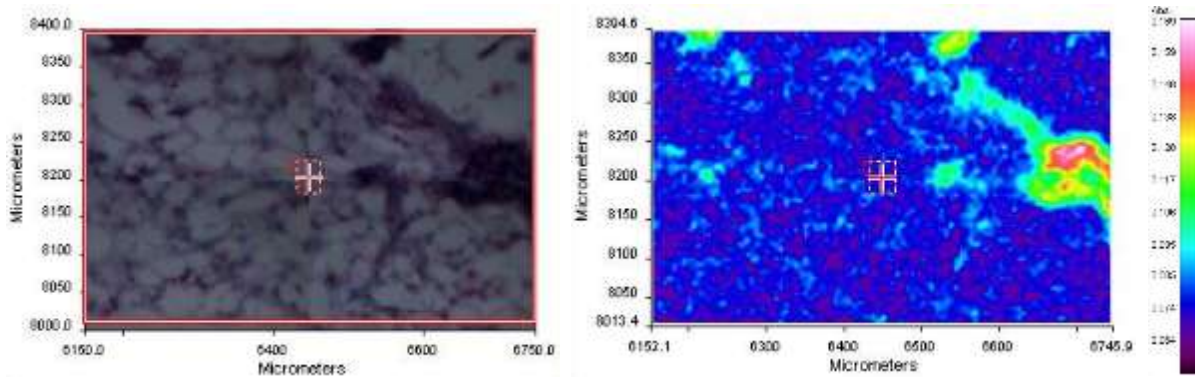
Şekil 63. Kontrol (DBAJ) ve BFMI ırklarına ait inguinal adipoz dokuların ışık mikroskobunda çekilmiş 40X'lik görüntülerinde dişi ve erkek bireylerin karşılaştırılması

4.3.2. FTIRM çalışmaları

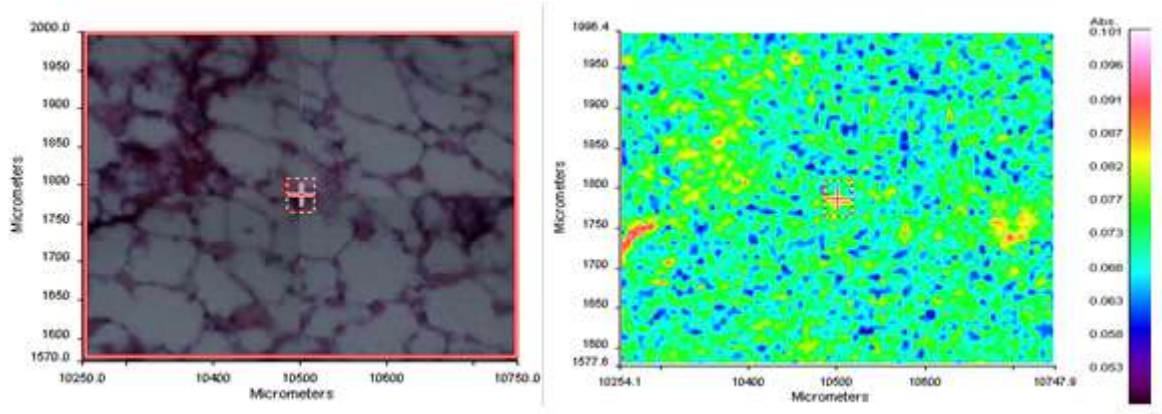
BAT ve WAT oranlarındaki değişimler tespit edilerek adipoz doku transdiferansiyasyonu incelemek adına ilk olarak bu dokulardan alınacak mikron mertebesindeki kesitler, UCP-1 antikolarıyla (Ab) boyanmış, ışık mikroskobu ile incelenen iki farklı adipoz dokusunda beyaz adipoz doku (WAT) ve kahverengi adipoz doku (BAT) dokularındaki farklar incelendikten sonra aynı kesitler spontan obeziteye bağlı oluşan makromoleküler farklılıkları görmek adına FTIR mikrospektroskopisi metodu ile incelenmiştir.



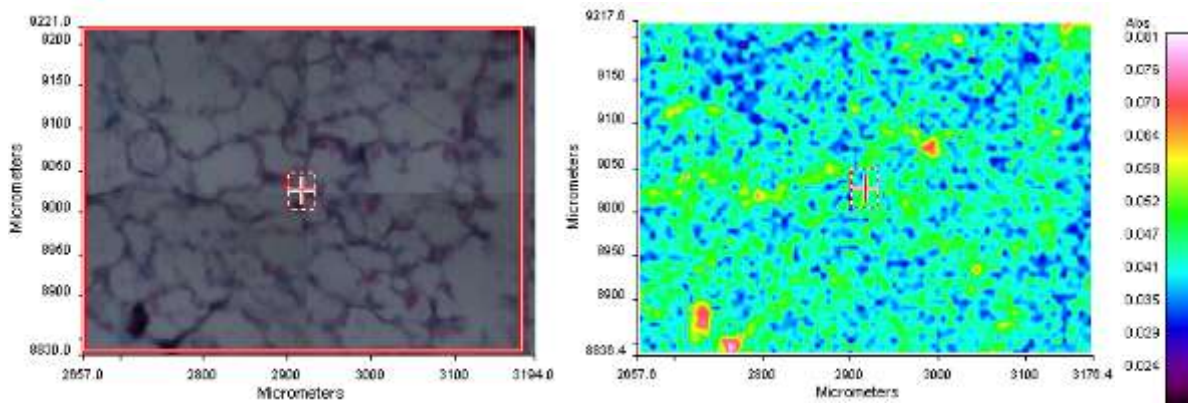
Şekil 64. Kontrol (DBAJ) Adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda)



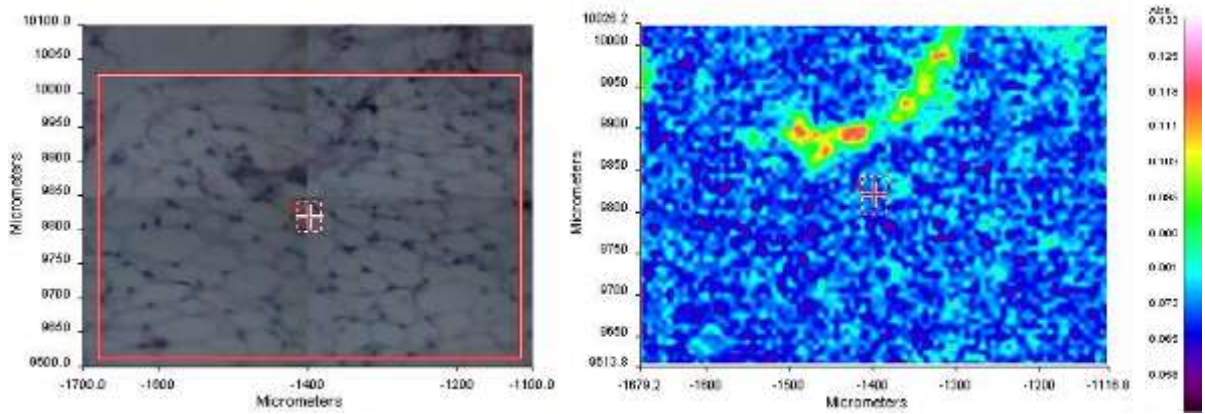
Şekil 65. Obez (BFMI) erkek bireyden alınan gonadal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.



Şekil 66. Obez (BFMI) dişi bireyden alınan gonadal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskopunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.



Şekil 67. Obez (BFMI) erkek bireyden alınan inguinal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskopunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.



Şekil 68. Obez (BFMI) dişi bireyden alınan inguinal adipoz doku kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş UCP1 boyaması yapılmış kesite ait görüntü (solda), aynı bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (sağda) görülmektedir.

Şekil 64-68'de ışık mikroskobu görüntülerinde de görüldüğü gibi kahverengi adipoz dokuya (BAT) zengin kısımlar morumsu koyu renkte görünmekte beyaz adipoz dokuya (WAT) zengin kısımlar ise açık renkte görünmektedir. BAT dokusunun koyu renkte görünmesi içerdiği çok sayıda kan damarları ve mitokondrilerindeki renkli sitokromlardan kaynaklanmaktadır. FTIR mikroskobisinde kahverengi adipoz dokuya zengin kısımlar konsantrasyonu yüksek dolayısıyla sarı turuncu kırmızı renklerle, beyaz adipoz dokuya zengin kısımlar ise nispeten düşük konsantrasyonu gösteren mavi mor tonlarla temsil edilmektedir. Bu şekilde dokunun içerdiği BAT ve WAT miktarı kolaylıkla ayırt edilmektedir.

Alınan sonuçlar dişi ve erkek bireyler arasında WAT ve BAT transdiferansiyasyonunu anlamak üzere incelendiğinde genel olarak BFMI ırklarda kontrol(DBAJ) gruba göre UCP1 proteini miktarı dolayısıyla BAT oranının azaldığı ve yerini WAT'a bıraktığı görülmektedir. İnguinal ve gonadal dokular karşılaştırıldığında gonadal dokularda BAT miktarının inguinal dokulara oranla daha fazla olduğu görülmüştür.inguinal dokularda yoğun olarak WAT'a rastlanmış BAT ise çok az miktarda görülmüştür. İnguinal adipoz dokusu deri altı yağ dokusu olduğundan daha fazla WAT içermesi ve gonadal adipoz dokusunun iç organlara ait yağ dokusu olması sebebiyle inguinal adipoz dokuya oranla daha az WAT içermesi beklenen bir durumdur. İnguinal dokular incelendiğinde, BFMI ırkı erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir, özellikle BFMI 852 ve 856 ırklarına ait erkek bireylerde bu fark diğer ırklara göre daha fazla gözlenmiştir. Dişi bireylerde ise yoğun olarak WAT gözlenmiştir. Gonadal dokular incelendiğinde, yine ırkı erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir fakat bu oran inguinal dokulara göre daha azdır. Genel olarak BFMI860 ve BFMI861 ırklarına ait hem gonadal hem inguinal dokularda daha fazla WAT olduğu nispeten

BFMI852 ve BFMI856 ırklarının daha çok BAT içerdiği görülmüştür fakat bu oran DBAJ (kontrol) ırkına oranla oldukça azdır. Tüm ırk ve cinsiyetlere ait ayrıntılı FTIR mikroskobisi ve UCP1 boyama sonuçları, ilgili kısımlarda verilmiştir.

4.4. HPLC Sonuçları

HPLC tekniği kullanılarak, obez ve kontrol fare gruplarında, detaylı lipit analizi yapılmıştır. GF ve IF adipoz dokulardaki lipitlerin çeşitlerine ve miktarlarına bakılarak obez ve obez olmayan ırklar ve ayrıca obez ırklar arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

DBAJ kontrol fare ırklarının ve BFMI obez inbred fare ırklarının dokularından elde edilen lipitlerin nitel ve nicel tayinleri için öncelikle gliseril trioleat (trigliserit), 1,2-diöleoil-sn-gliserol (digliserit), kolesterol, 1-oleil-rak-gliserol (monogliserit) ve 90 fosfatidilkolin (PC) standartları farklı konsantrasyonlarda, Waters Alliance HPLC e2695 Separations Module enstrümanı ve Waters 2424 ELS dedektörü kullanılarak yürütülmüştür. Böylece, her bir standart lipidin kendisine özgü tutulma süresi bulunmuştur. Standart lipitlerin tutulma süreleri kromatogramlarda görülme sırasına göre Tablo 28'de belirtilmiştir. Örneklerin kromatogramdaki piklerin tutulma zamanlarına göre hangi lipite ait olduğu tespit edilmiştir.

Bu deneylerde kullanılan standartların elde edilen kromatogramları Ek 3 Şekil 1-5'te görülmektedir.

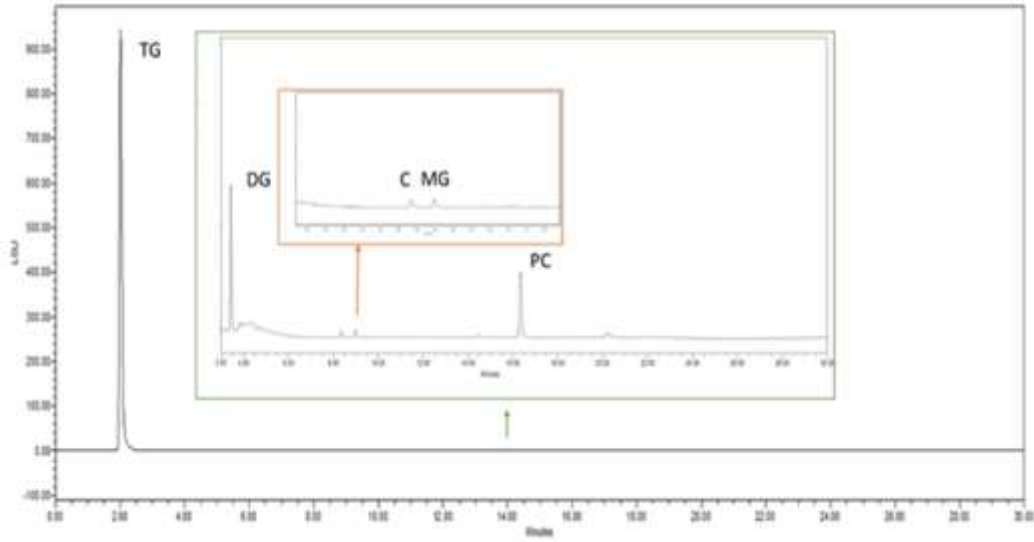
Tablo 28. Farklı lipit standartlarının tutulma zamanları

Lipit	Trigliserit	Digliserit	Kolesterol	Monogliserit	Fosfatidilkolin
Zaman	2,0786	3,1458	6,9653	8,9653	16,984

Kontrol ve BFMI inbred fare ırklarının dokularından elde edilen lipitlerin miktarını tayin edebilmek için, farklı konsantrasyonlarda yürütülen her bir standardın kalibrasyon eğrisi Waters Empower Pro adlı bilgisayar programı kullanılarak çizilmiştir ve Ek 3 Şekil 6-10'de verilmiştir.

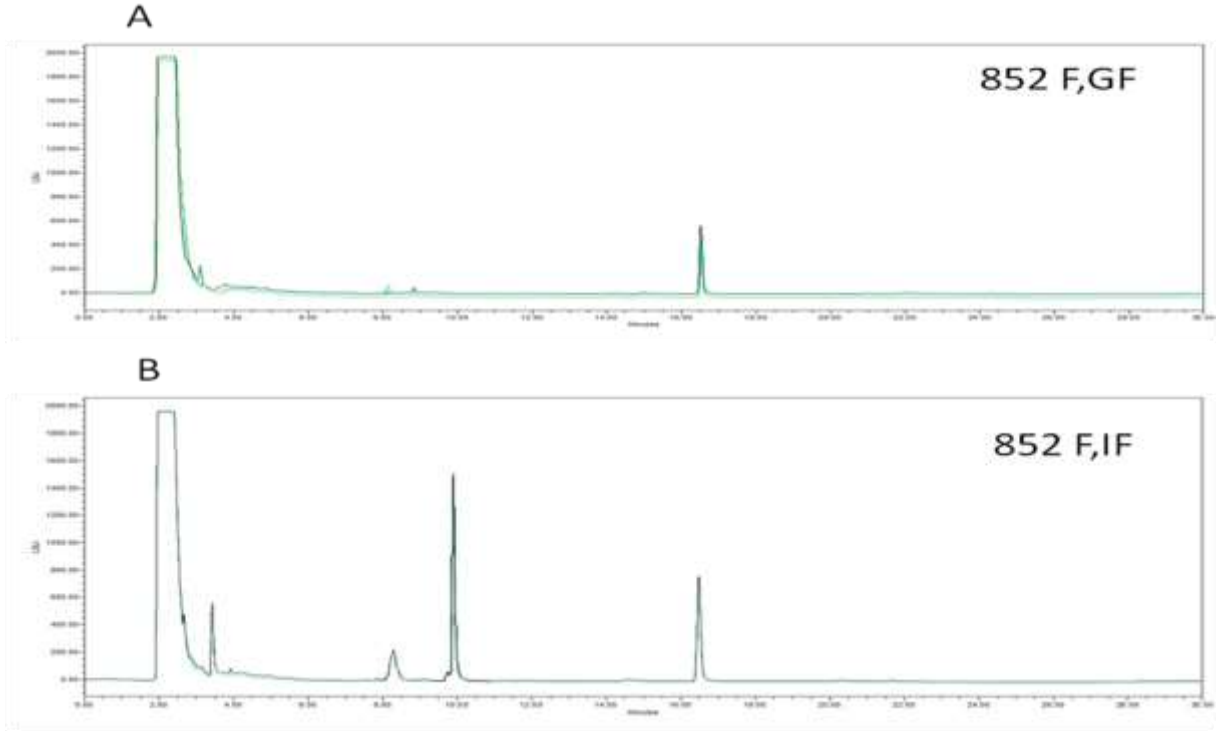
Deneylerde kullanılan bütün standartların belirleme katsayısı (R^2), uygun sınır değer olan 0.99'dan büyük çıkmıştır. Bu kalibrasyonun uyum iyiliğini göstermektedir.

Adipoz obez dokuların lipit profilleri HPLC-ELS tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. şekil 69'da temsilen bir doku örneğine ait hem düşük hem de yüksek enjeksiyon sonucu elde edilen kromatogramları birarada göstermektedir. şekil 70-85'de diğer lipitlere ait piklerin izlenmesi amacıyla sadece yüksek enjeksiyon ve yüksek hassasiyet de yapılan kromatogram sonuçları verilmiştir. Bu şekillerde hem doku ırkına göre (DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861), hem cinsiyete göre (erkek (M), dişi (F)), hem de doku çeşidine göre (inguinal (IF) ve gonadal(GF)) karşılaştırma yapılmıştır. TG konsantrasyonu yüksek olduğu için, incelenen tüm ırklara ait örnekler iki farklı enjeksiyonda yürütölmüştür. TG için düşük enjeksiyon hacmi ve düşük hassasiyet kullanılmıştır. Diğer lipitler için yüksek enjeksiyon hacmi ve yüksek hassasiyet kullanılmıştır.

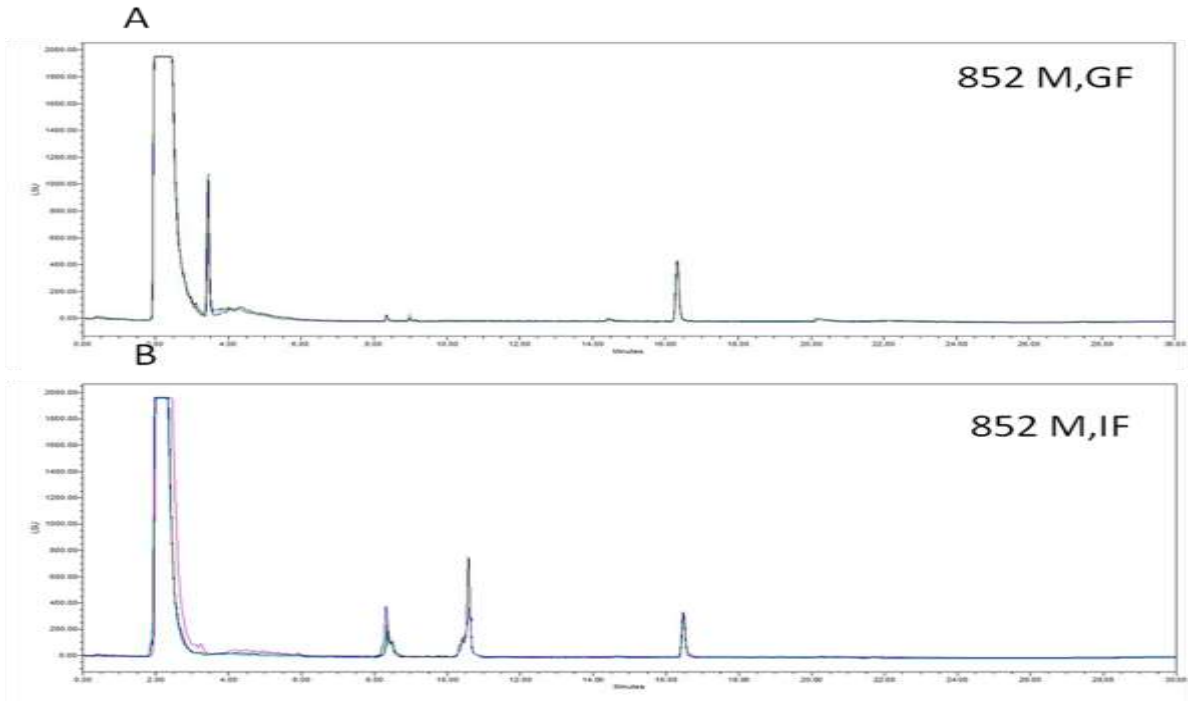


şekil 69. TG ve diğer lipitlerin temsili kromatogram sonucu.

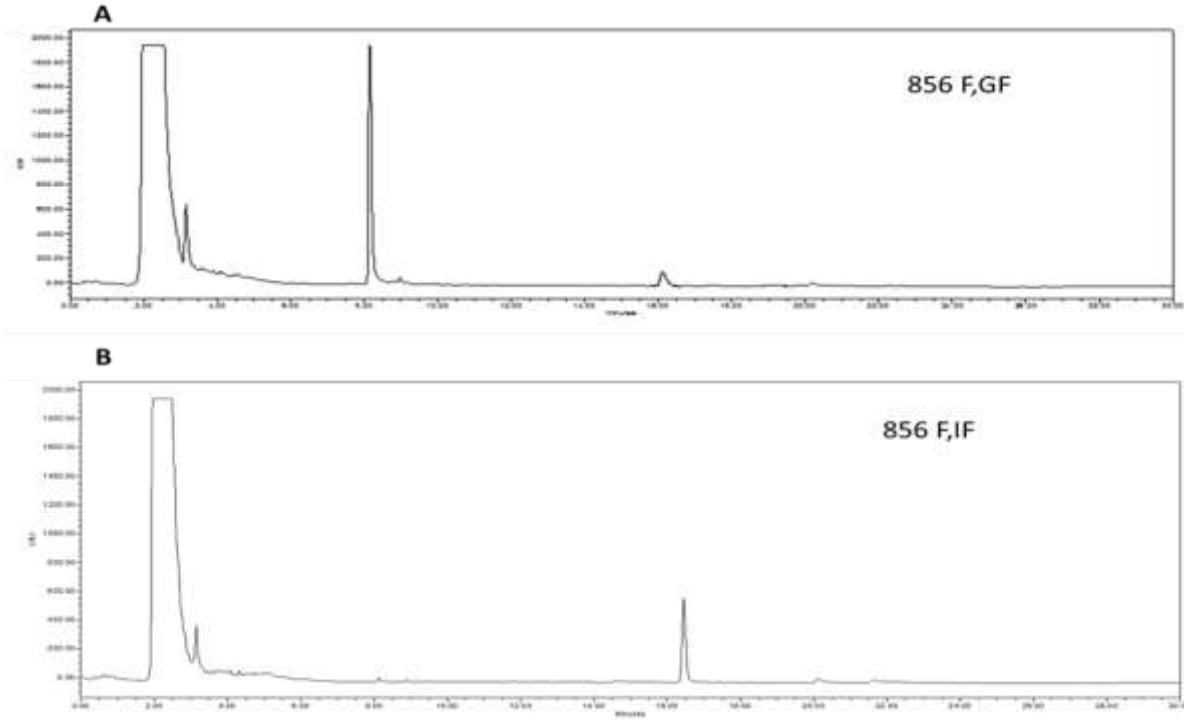
şekillerden göröldüğu üzere, gonadal dokuların lipit miktarları inguinal dokulara göre daha yüksek çıkmıştır. Genel olarak BFMI 860 ve 861 ırkları daha iyi lipit profilleri göstermiştir.



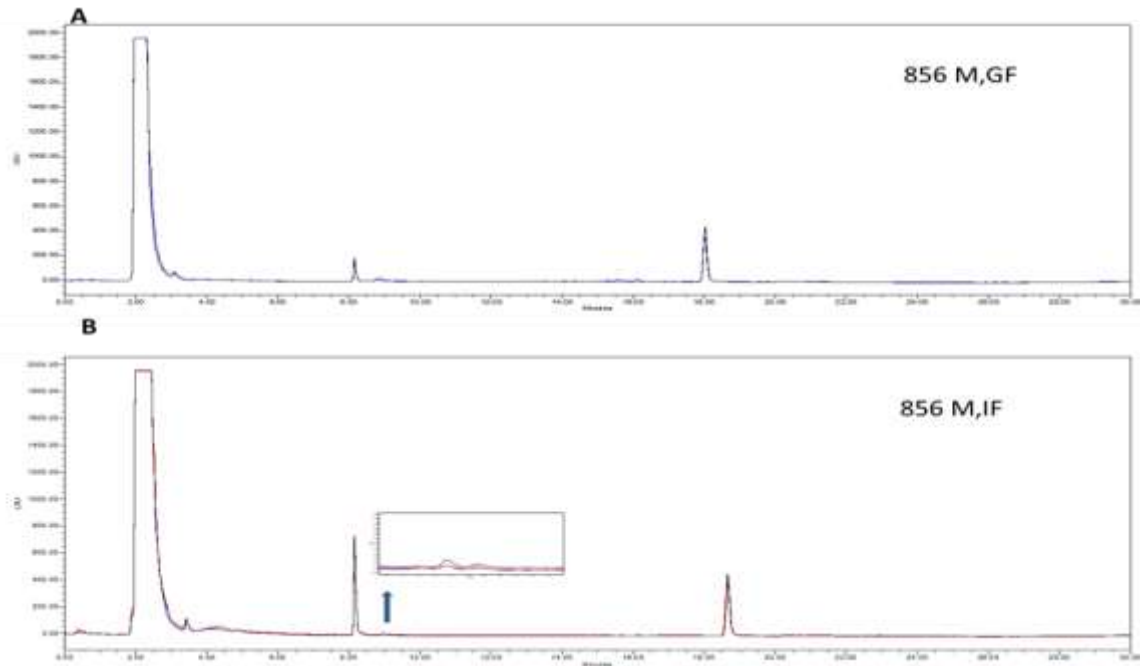
Şekil 70. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 852 Dişi, Inguinal



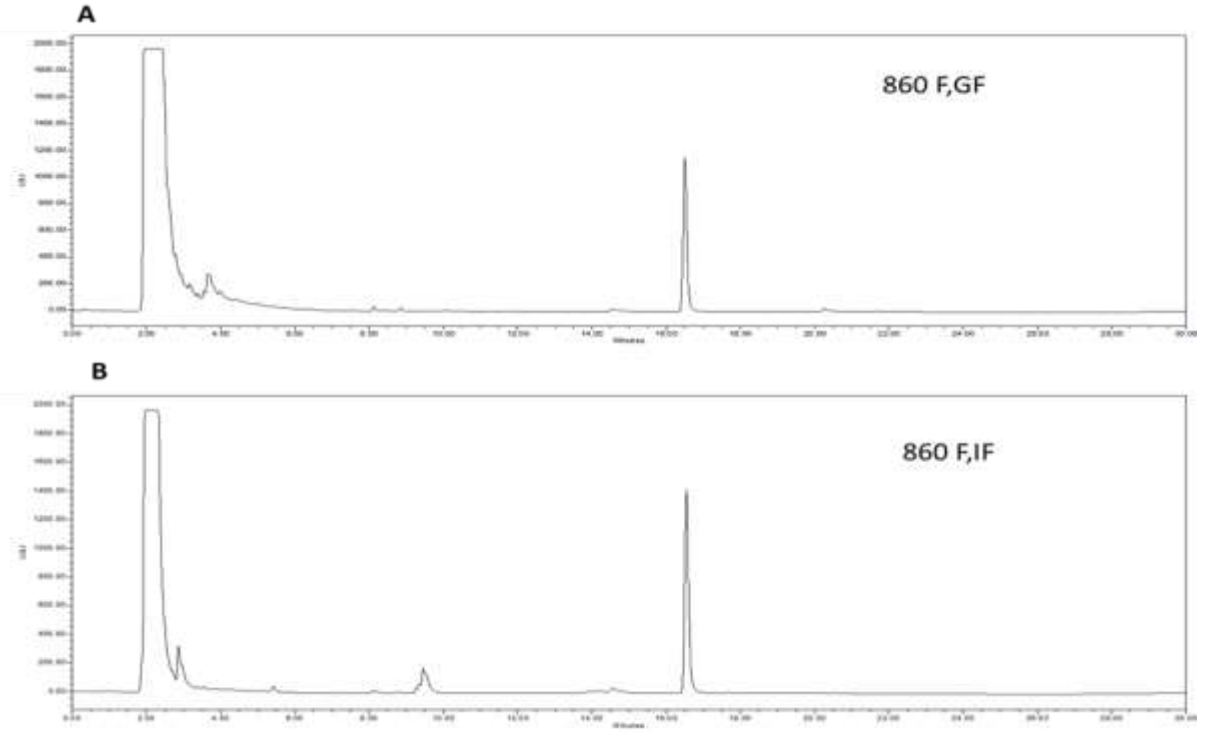
Şekil 71. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 852 Erkek, Inguinal



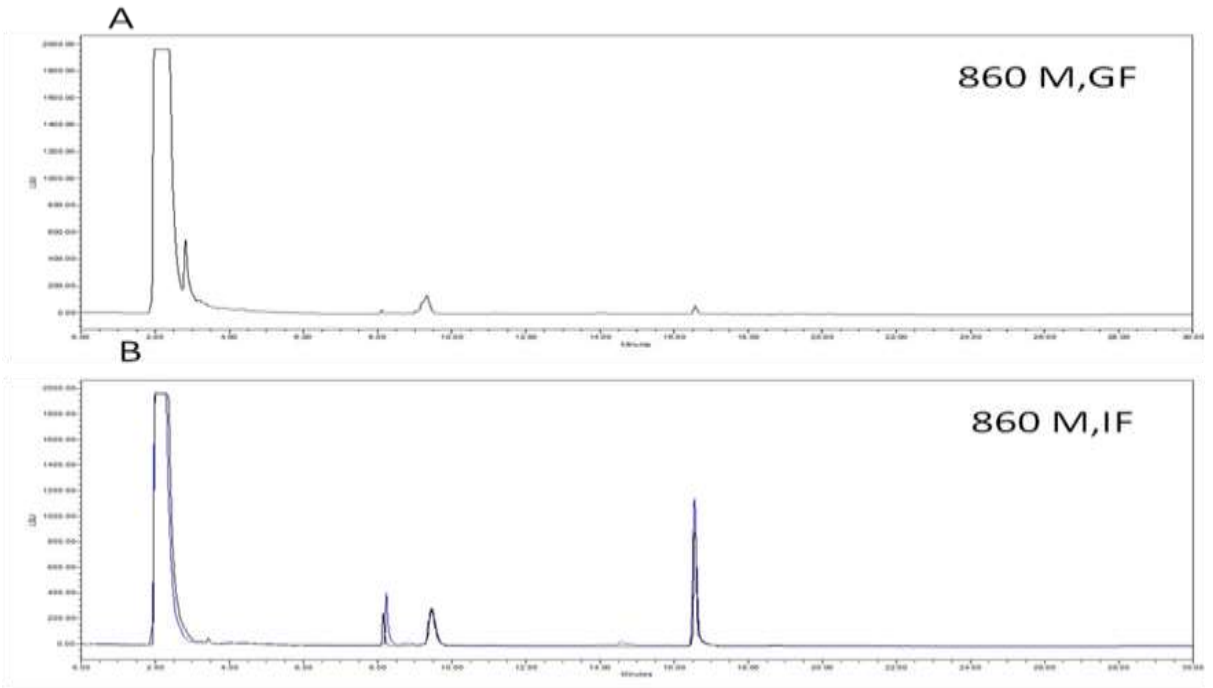
Şekil 72. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 856 Dişi, Inguinal



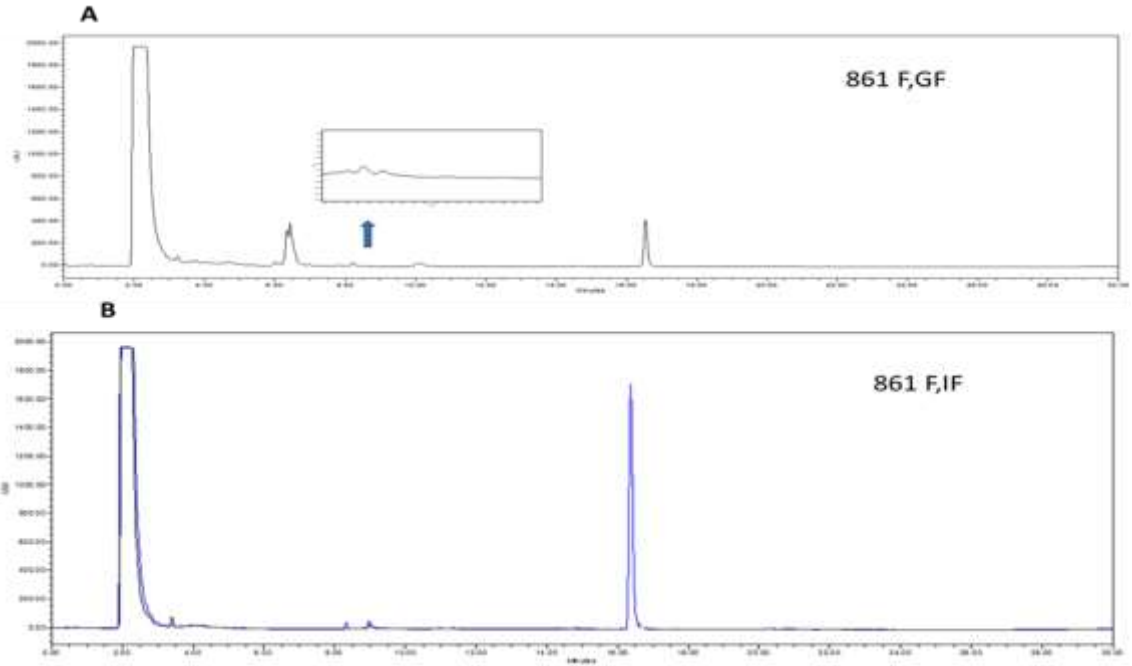
Şekil 73. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 856 Erkek, Inguinal



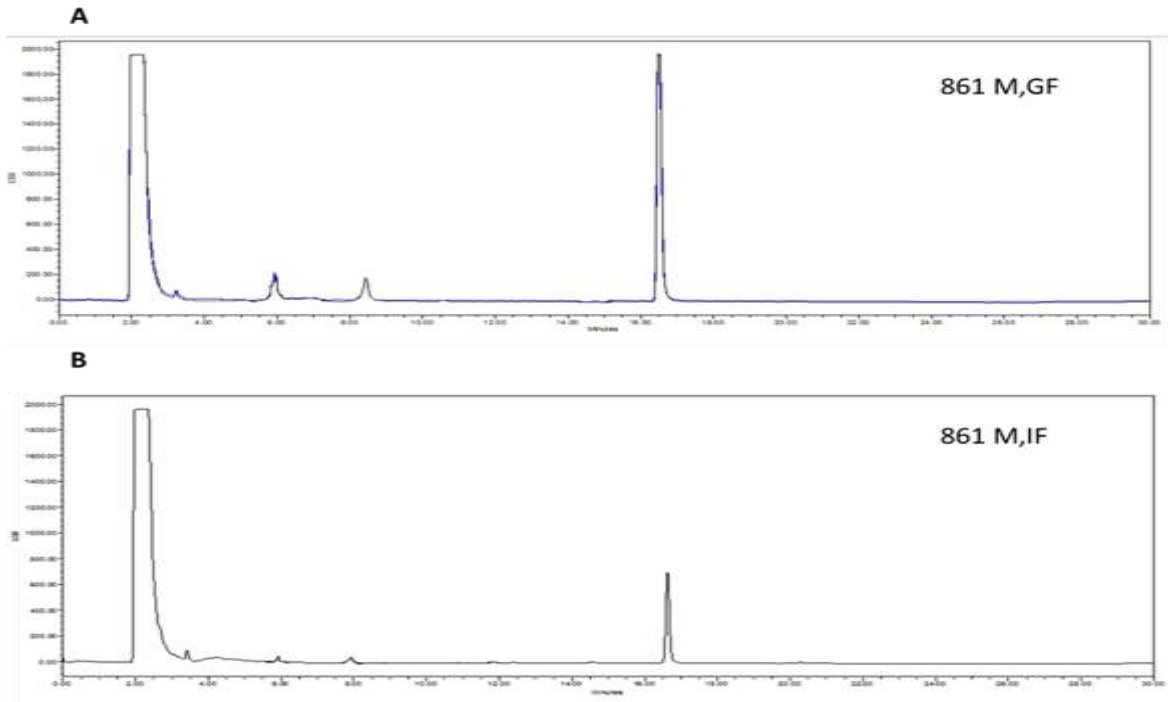
Şekil 74. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 860 Dişi, Inguinal



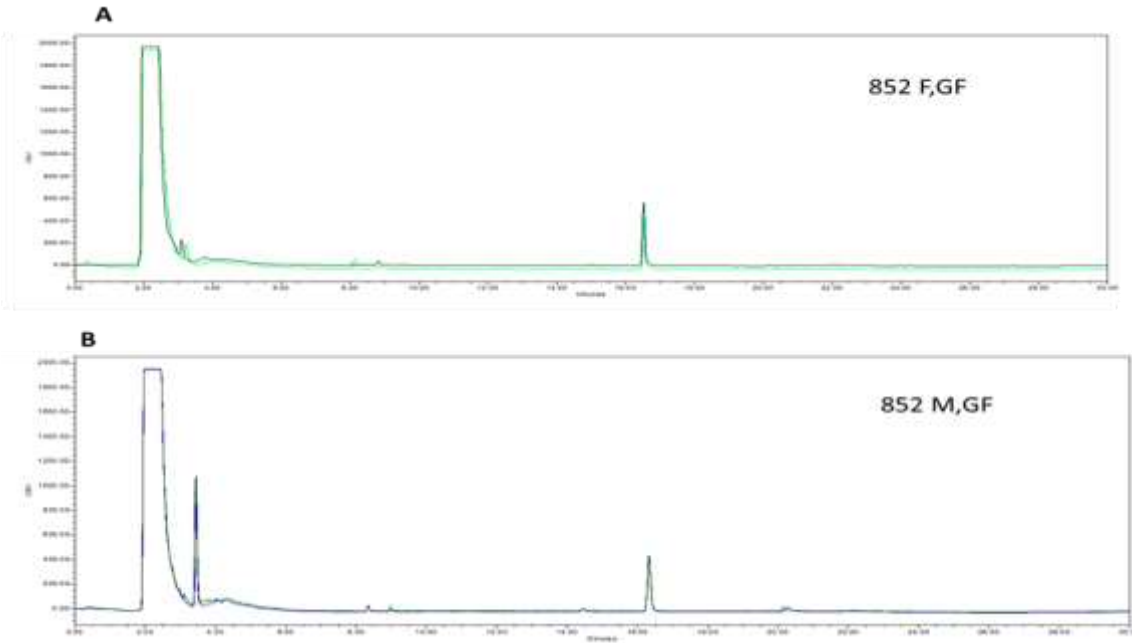
Şekil 75. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 860 Erkek, Inguinal



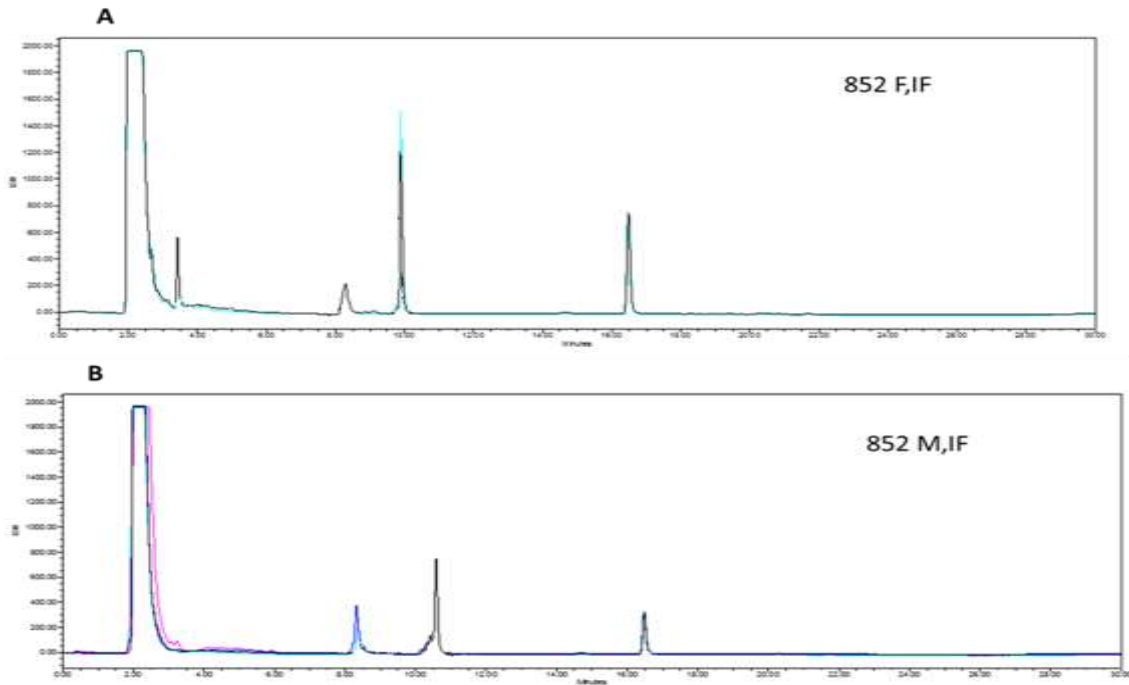
Şekil 76. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 861 Dişi, Inguinal



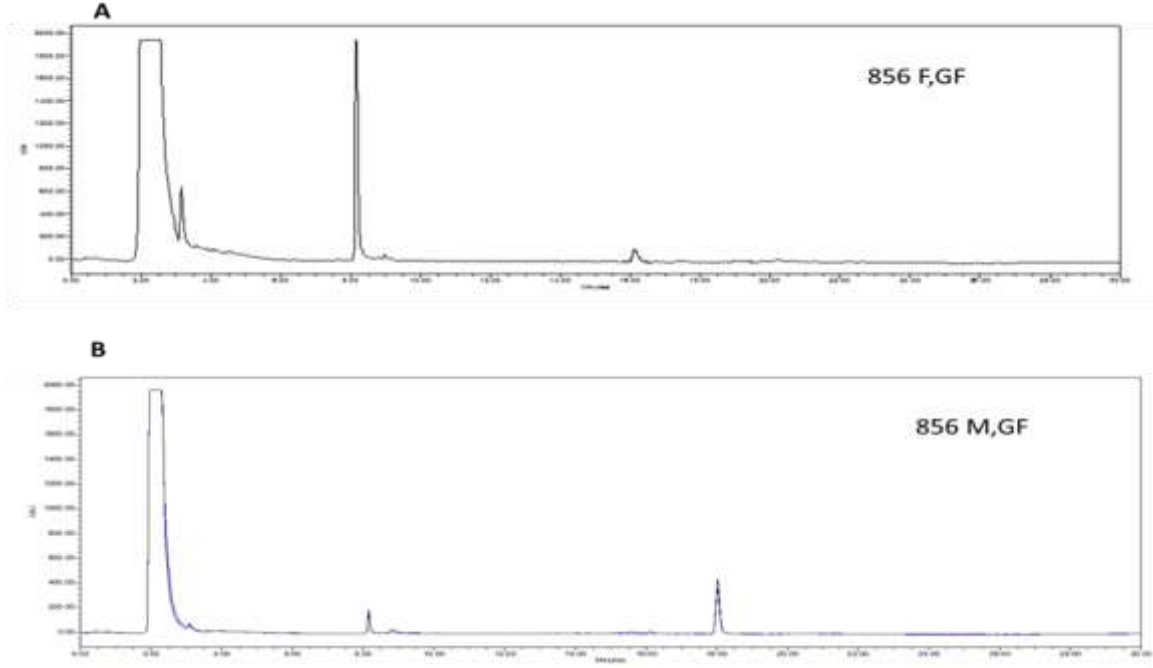
Şekil 77. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Erkek, Gonadal, (B) BFMI 861 Erkek, Inguinal



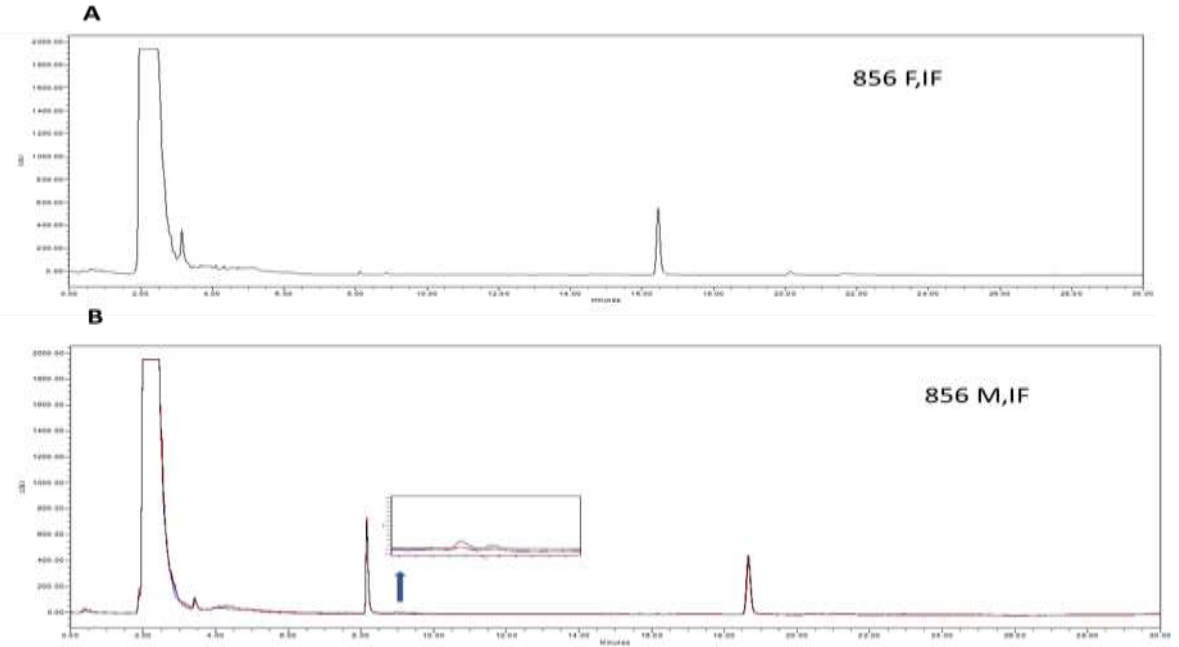
Şekil 78. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 852 Erkek, Gonadal



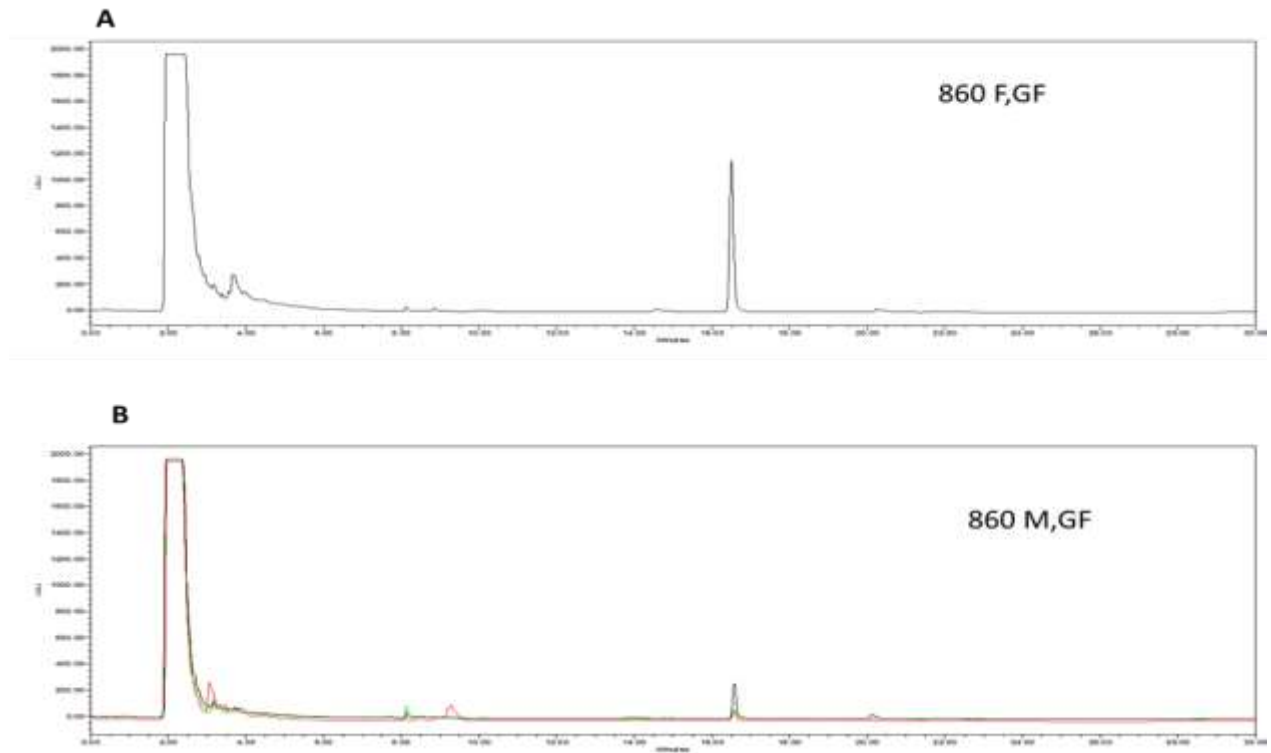
Şekil 79. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 852 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 852 Erkek, Inguinal



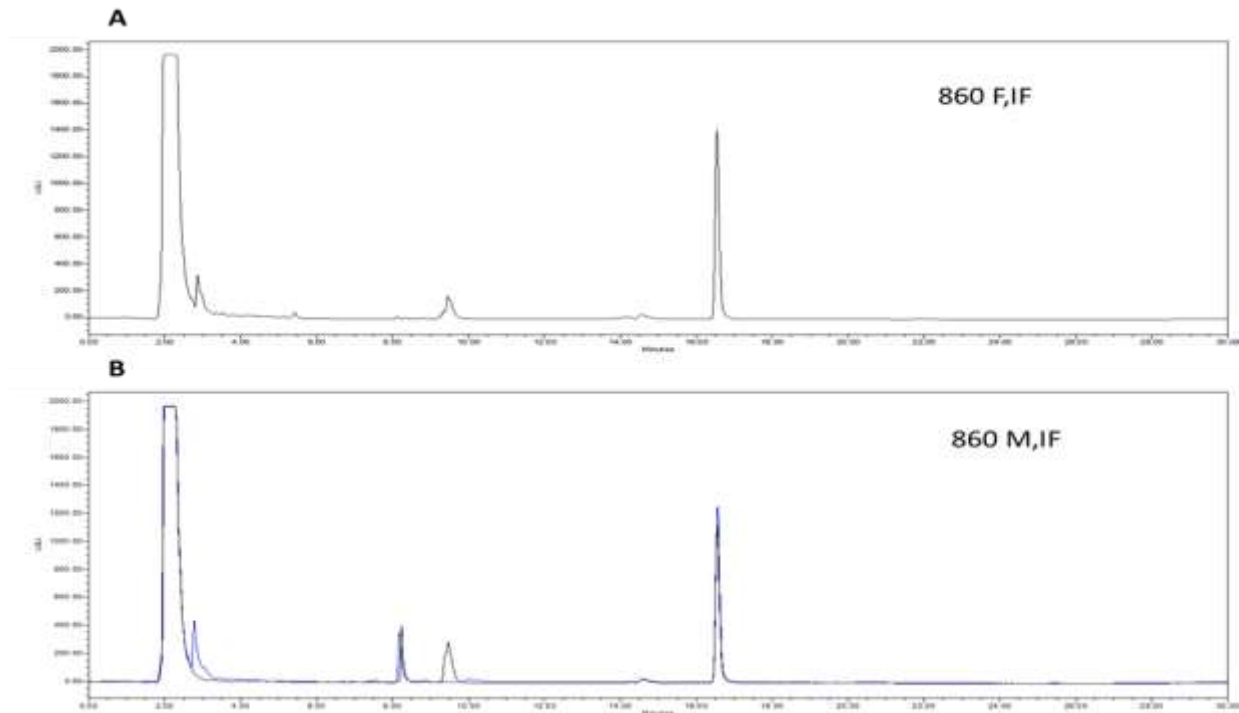
Şekil 80. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 856 Erkek, Gonadal



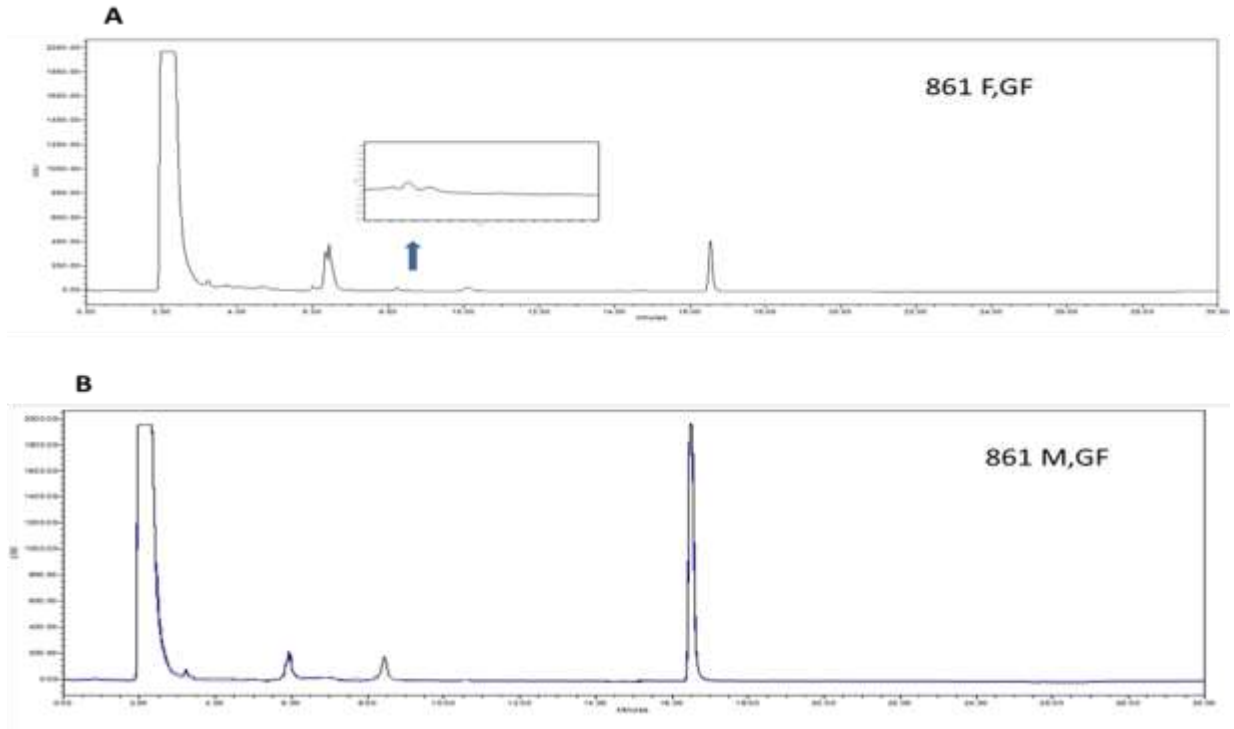
Şekil 81. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 856 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 856 Erkek, Inguinal



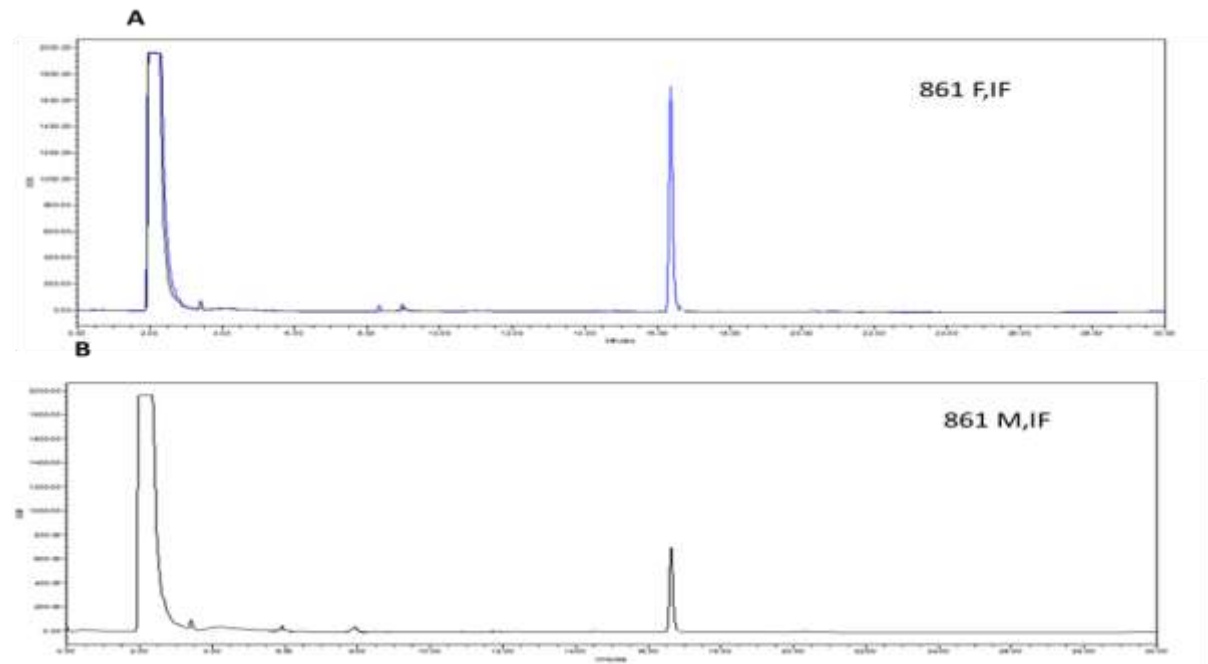
Şekil 82. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 860 Erkek, Gonadal



Şekil 83. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 860 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 860 Erkek, Inguinal



Şekil 84. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Dişi, Gonadal, (B) BFMI 861 Erkek, Gonadal



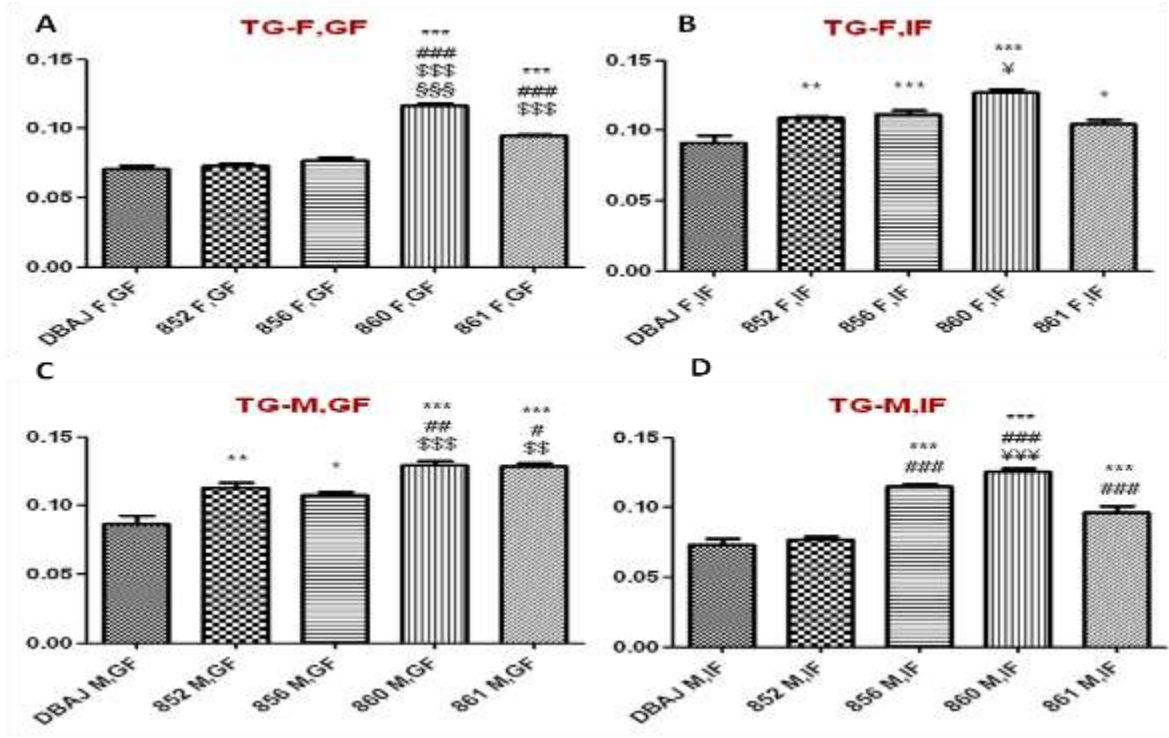
Şekil 85. Lipit profil kromatogram sonucu (A) BFMI 861 Dişi, Inguinal, (B) BFMI 861 Erkek, Inguinal

Nitel olarak kromatogramlarda tayin edilen lipitlerin, nicel ölçümleri Waters Empower Pro adlı program kullanılarak yapılmıştır. Her bir standart lipit için çizilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak, örneklerdeki lipitlerin konsantrasyon ölçümleri başarıyla yapılmıştır. Bütün örneklerde bulunan lipitlerin istatistiksel analizi “Oneway ANOVA” ve “Tukey’s multiple comparison test” yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Tüm gruplar arasında ve kontrol gruplarına göre olacak şekilde örnekler karşılaştırılmıştır.

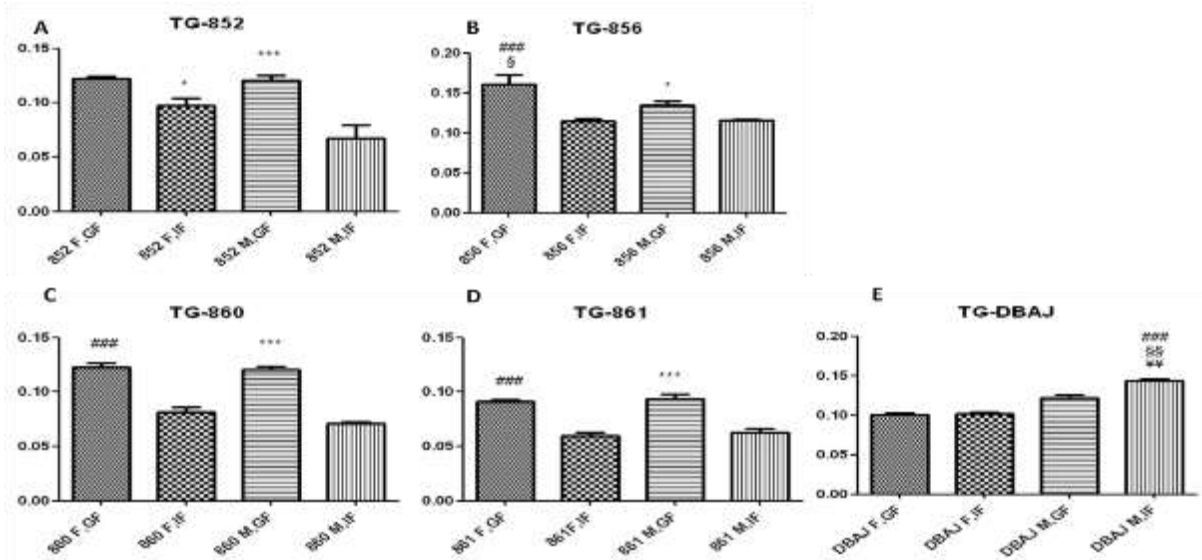
BFMI fare ırkları karşılaştırıldığında, inbred obez olan farelerde TG konsantrasyonunun kontrol farelerine göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 86). Bu fazlalık, TG gibi basit lipitlerin canlıların hem fizyolojik durumlarına, hem de diyetlerine göre en çok değişen lipitlerden olmasından kaynaklanmaktadır (St-Pierre v.d., 2002; Karatayev v.d., 2009; Christie, 1987). Özellikle BFMI 860 ve BFMI 861 ırklarında TG konsantrasyonunun çok yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Çalışılan diğer obez fare ırkları olan BFMI 852 ve BFMI 856’da ise, diğer iki ırktaki kadar TG görülmemiştir.

BFMI ırkları arasında, gonadal dokularda inguinal dokuya göre daha çok TG bulunmuştur (Şekil 87). Viseral yağlanma, obezite ve insülin direnci gibi bazı metabolik bozukluklarla yakından ilgilidir (St-Pierre v.d., 2002). Bu nedenle elde ettiğimiz sonuç beklenen bir sonuçtur.

Erkek ve dişi dokuları arasında, BFMI 852 ve BFMI 856 hariç, TG farkı bulunmamaktadır. BFMI 852 ve BFMI 856 karşılaştırıldığında dişilerdeki TG konsantrasyonunun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 86. BFMI ırkları arasındaki TG (mg/ml) konsantrasyonları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.)

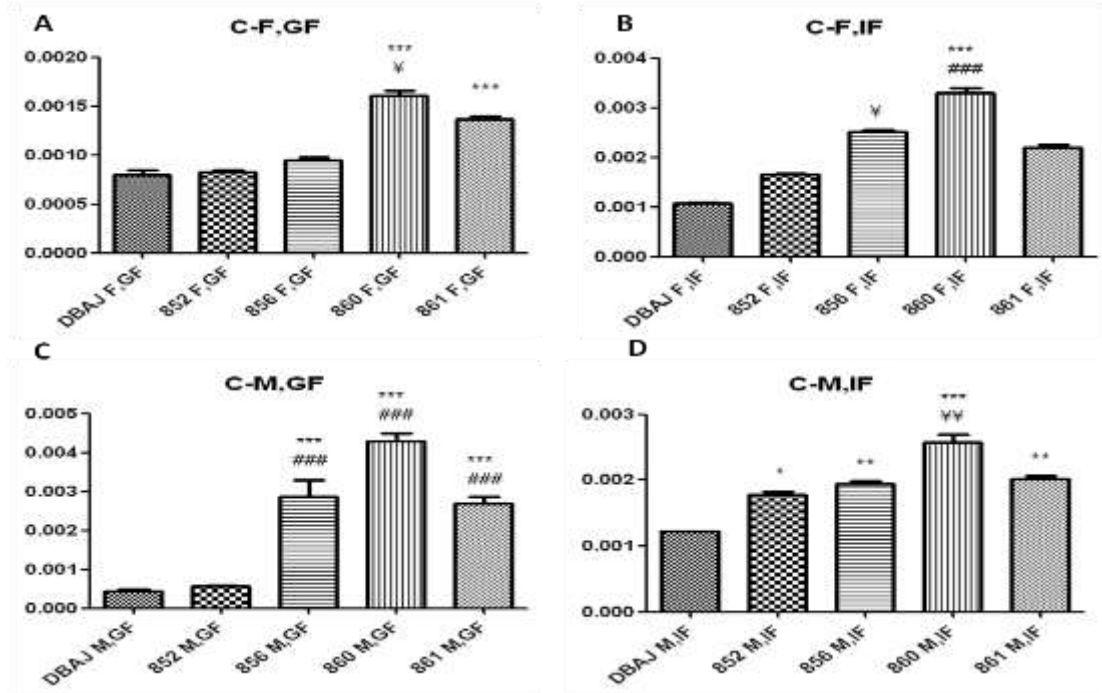


Şekil 87. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki TG (mg/ml) konsantrasyon farklılıkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.)

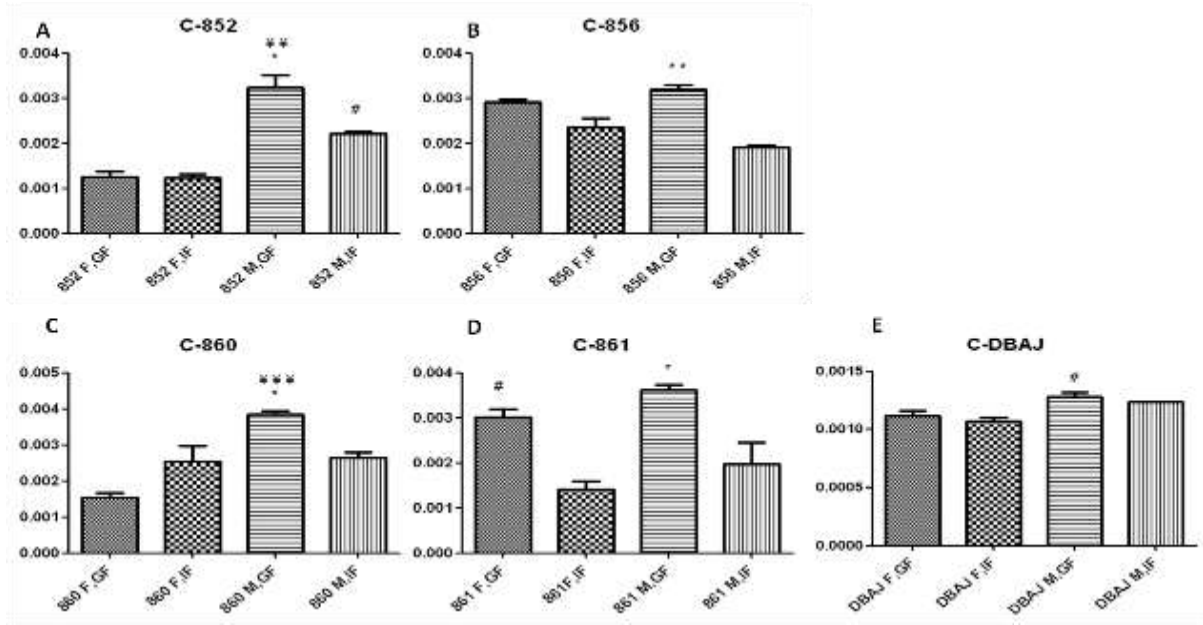
Hayvan dokularında çok bulunan bir diğer lipid türü de kolesteroldür. Bu lipid, serbest kolesterol (C) ve esterleşmiş kolesterol, yani kolesteril ester (CO) formlarında bulunmaktadır ve hücre zarında önemli rol oynamaktadır. Serbest kolesterol zar akışkanlığı gibi hayati bir rolde görev alırken, kolesterolün iki formu da canlı için büyük bir önem arz etmektedir (**Christie, 1987**).

Üzerinde çalışılan ırklar göz önüne alındığında, kolesterolün BFMI ırklarında kontrol ırklarına göre dramatik bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 88). BFMI ırkları arasında en düşük kolesterol miktarı BFMI 852 ırkında görülmektedir. En yüksek kolesterol ise BFMI 860 ırkında gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuç yüksek kolesterolün obezite, tip 2 diyabet ve arteroskleroz gibi hastalıklarının oluşma riskini artırdığını işaret etmektedir.

Şekil 89'da gösterildiği üzere gonadal dokularda inguinal dokulara göre kolesterol daha yüksek çıkmıştır. Erkek ve dişiler arasında, BFMI 852 ırkı dışında, çok fark görülmemektedir.

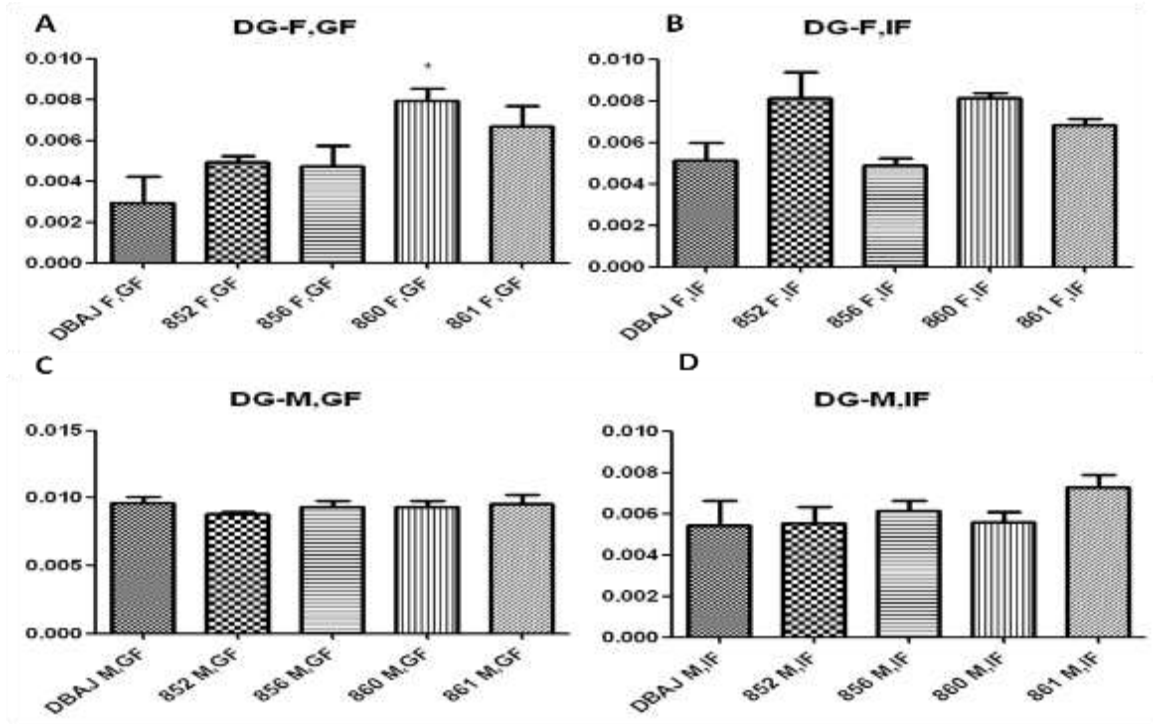


Şekil 88. BFMI ırkları arasındaki kolesterol (mg/ml) farklılıkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.)

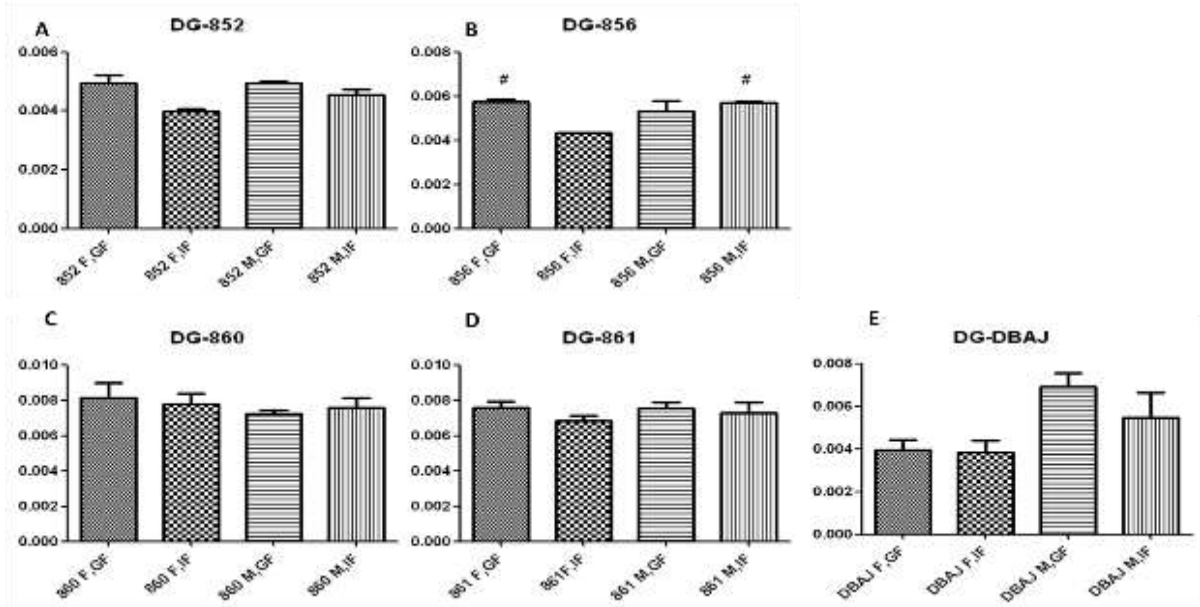


Şekil 89. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki kolesterol (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.)

Diğliserit sonuçlarına göre (Şekil 90 ve 91), BFMI ırkları arasında çok fazla fark yoktur. Gonadal ve inguinal veya dişi ve erkek arasında, BFMI 856 dışında, fark görülmemektedir. BFMI 856 ırkının inguinal dokusunda erkeklerde daha çok DG olduğu gözlenmiştir. Dişilerde ise gonadal dokuda daha yüksek DG belirlenmiştir. Literatüre göre de DG seviyeleri ırklara göre değişmemektedir (Anastasiou v.d., 2009).

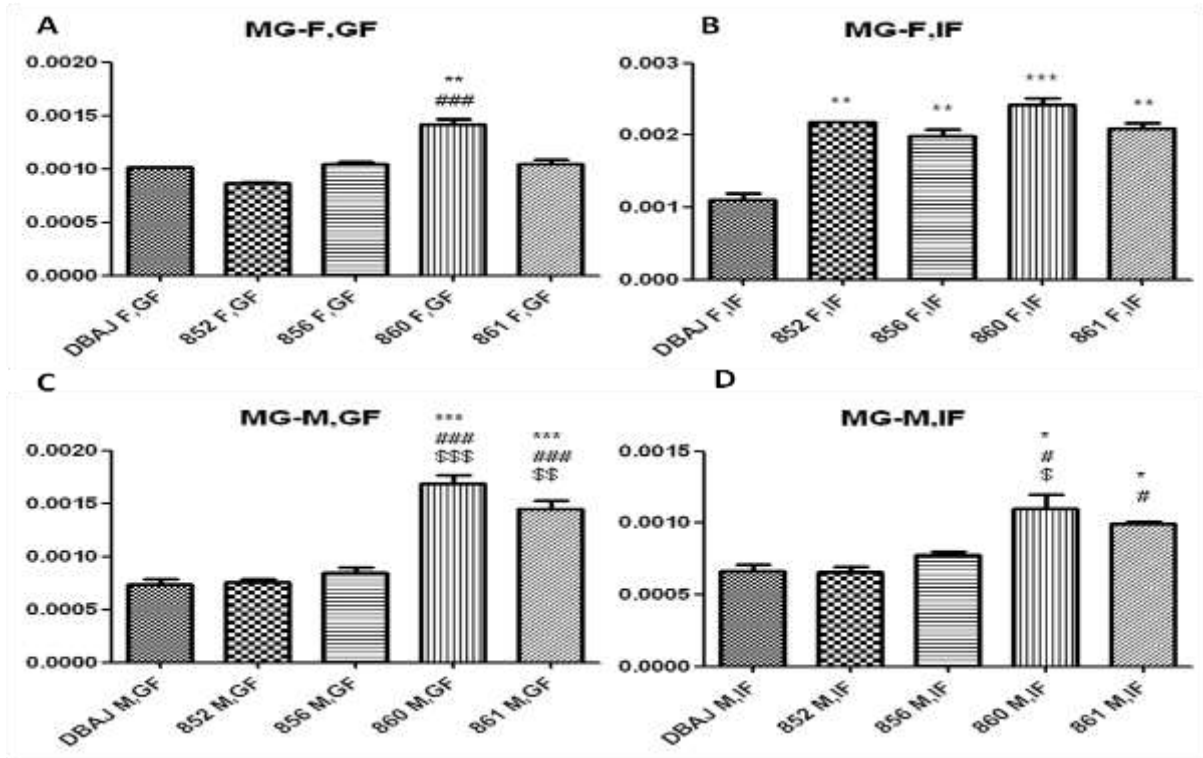


Şekil 90. BFM1 ırkları arasındaki DG (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFM1 852, BFM1 856, BFM1 860 ve BFM1 861'in önem derecelerini göstermektedir.)

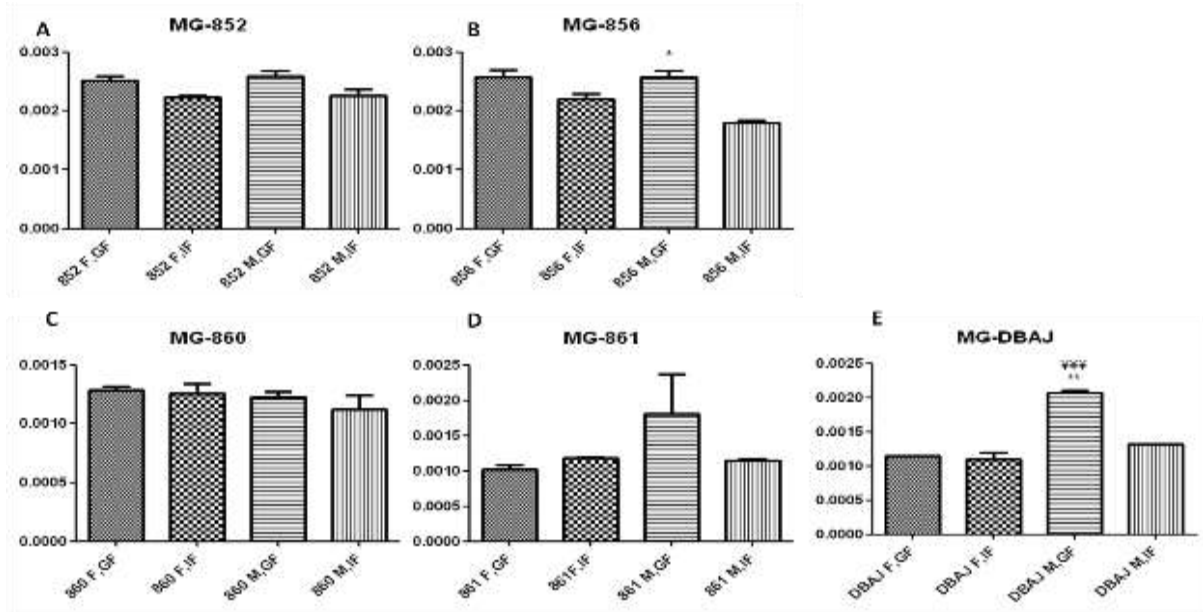


Şekil 91. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki DG (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFM1 852, (B) BFM1 856, (C) BFM1 860, (D) BFM1 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.)

Şekil 92 ve 93'den görüldüğü gibi genel olarak MG miktarı BFMI 860 ve 861 ırklarında anlamlı bir şekilde artmaktadır. En anlamlı artış ise BFMI 860 ırkında görülmektedir. Bu ırklardaki TG yüksekliği de bu sonuca bağlı olabilir çünkü MG'ler trigliseritlerin kırılması ile oluşabilirler (Christie, 1987; Dinh v.d., 2002). Erkek-dişi ve gonadal-inguinal arasında, BFMI 856 ırkı dışında, çok farka rastlanmamıştır. BFMI 856 ırkında gonadal doku daha yüksek MG'ye sahiptir.

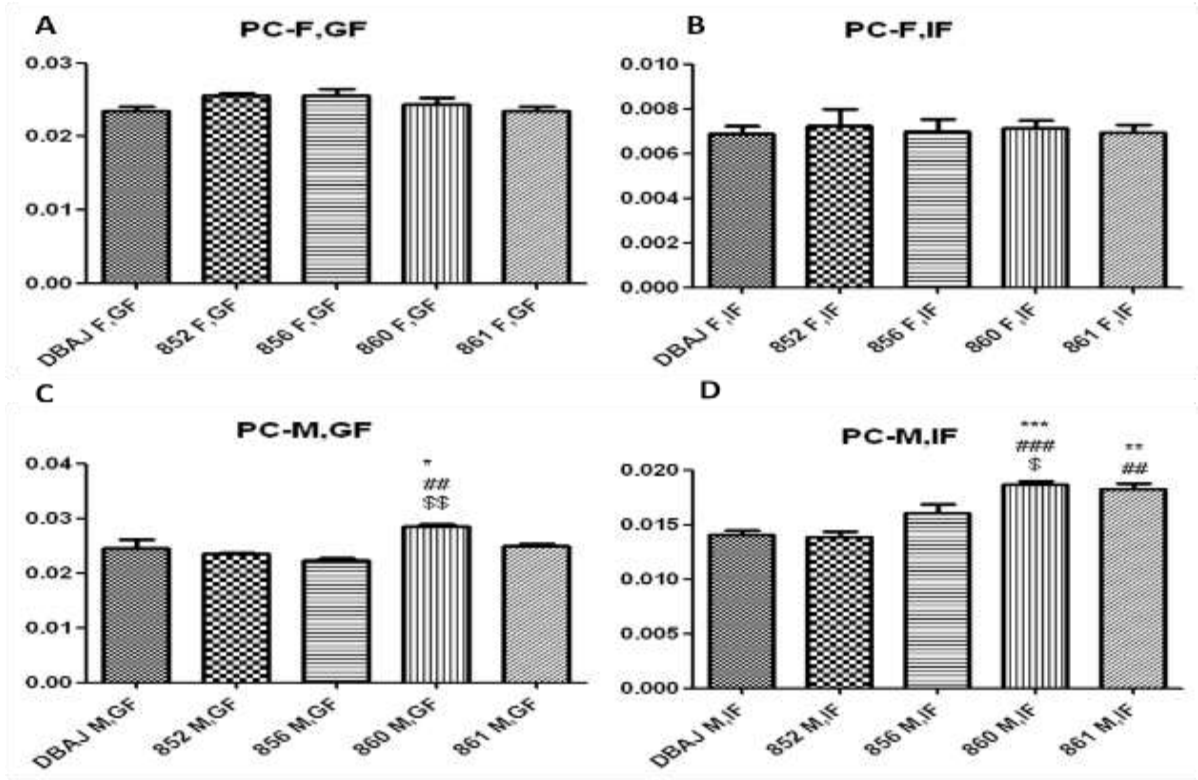


Şekil 92. BFMI ırkları arasındaki MG (mg/ml) farkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, §, ve ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.)

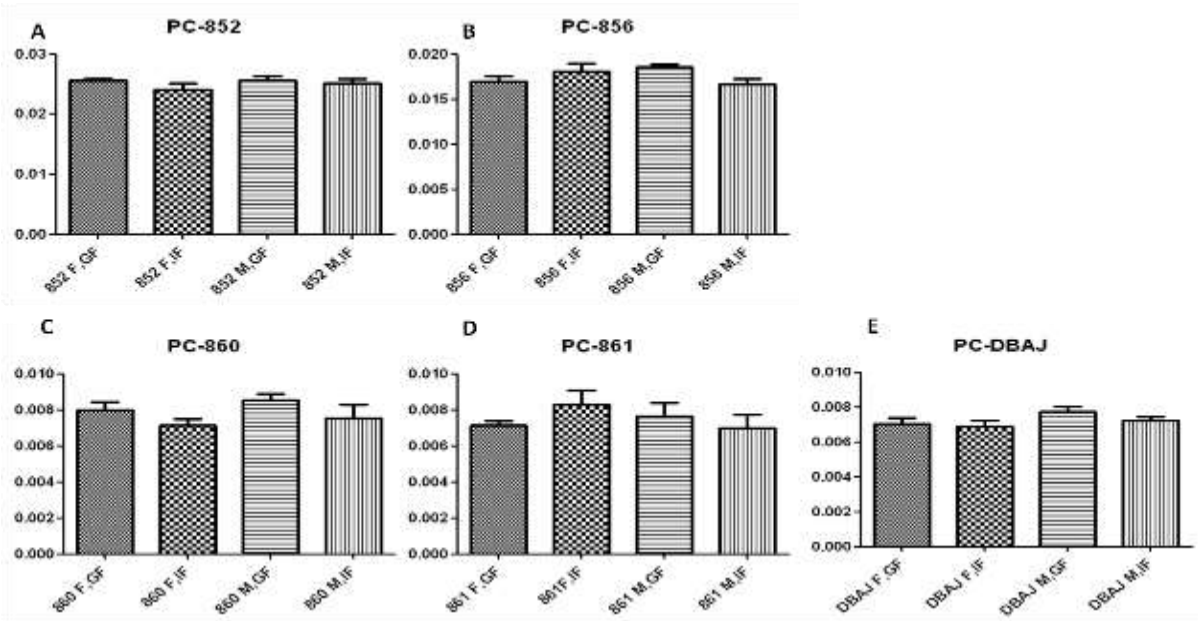


Şekil 93. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki MG (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, § ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.)

Fosfatidilkolin sonuçlarına göre (Şekil 94 ve 95) BFMI ırklarından BFMI 860 ve 861'in erkek dokularında en yüksek konsantrasyon görülmektedir. Bunun nedeni bu dokularda görülen insülin direnci ve obezite olabilir. Dişi dokularında çok fark gözlenmemiştir. GF ve IF erkek dokularının herikisinde ise belirgin değişim BFMI 860 ırkında gözlenmiştir. Aynı ırka ait örneklerde Dişi - erkek ve GF – IF farkı gözlenmemiştir.



Şekil 94. BFMI ırkları arasındaki PC (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) Dişi, Gonadal, (B) Dişi, Inguinal, (C) Erkek, Gonadal, (D) Erkek, Inguinal. (*, #, \$, ¥ sırasıyla DBAJ, BFMI 852, BFMI 856, BFMI 860 ve BFMI 861'in önem derecelerini göstermektedir.)



Şekil 95. Doku çeşidi ve cinsiyet arasındaki PC (mg/ml) konsantrasyon farkları (A) BFMI 852, (B) BFMI 856, (C) BFMI 860, (D) BFMI 861. (¥, #, \$ ve * sırasıyla Dişi-Gonadal yağ, Dişi-Inguinal yağ, Erkek-Gonadal yağ ve Erkek-Inguinal yağ'ın önem derecelerini göstermektedir.)

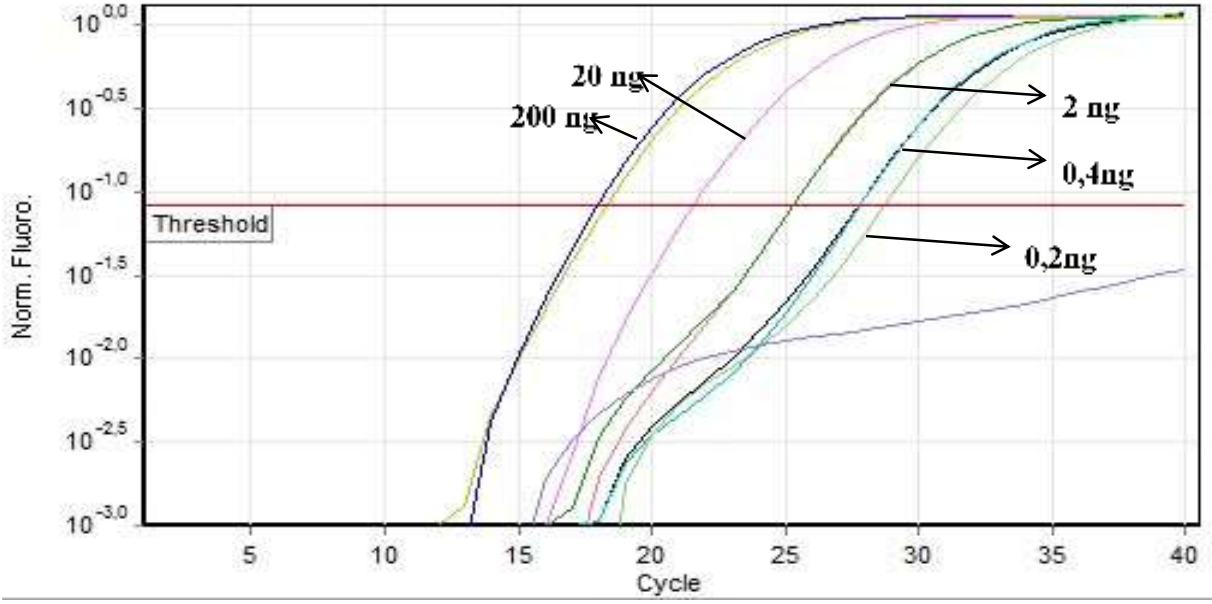
Sonuçlara göre BFMI 860 ve 861 ırkları, DG dışında, en yüksek lipit miktarına sahiptir. Bu sonuçlar o dokularda obezite seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Gonadal ve inguinal dokular arasında, bunun yanı sıra erkek ve dişiler arasında da çok fark bulunmamaktadır.

4.5. Genetik çalışmalar

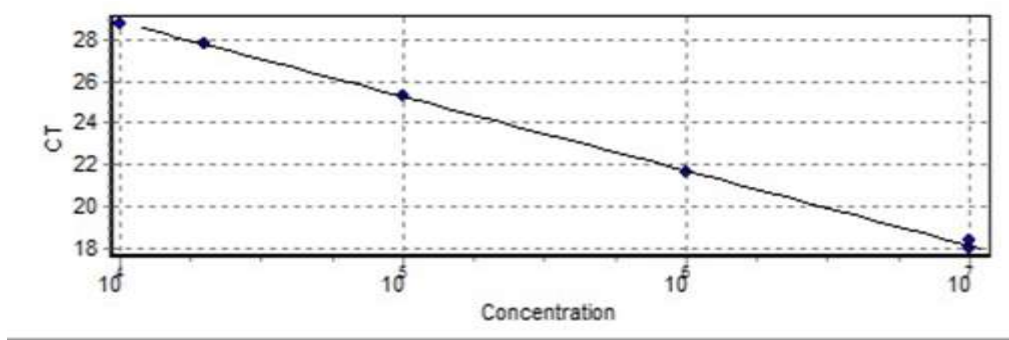
4.5.1. BFMI fare modelleri adipoz dokularında gen ifadelerindeki değişimler

Beyaz adipoz dokulardaki hipertropi ve hiperplazi, çok sıklıkla obezite gelişimi ile ilişkilidir. Obez farelerdeki genişlemiş adipositler, makrofajların bölgeye gelerek enflamasyonun tetiklenmesine ve insülin direncine yol açan çeşitli faktörlerin salınımına neden olurlar (Greenberg ve Obin, 2006). BFMI fare modellerinin moleküler düzeyde karakterizasyonu amacıyla, obezite ile ilişkilendirilen ve enflamasyon ve/veya obezite belirteci olarak kabul gören bir kısım sitokin ve hormononun mRNA ifadeleri real time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bunlar, leptin, interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör alfa (TNF α), peroksizom proliferatif reseptör gama (PPAR γ) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'i (IGF-1) içermektedir. Böylelikle, genotipi bilinmeyen bu hayvanların IF ve GF yağ dokularında, bu genlerde ve adipokinlerde bir değişim olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır.

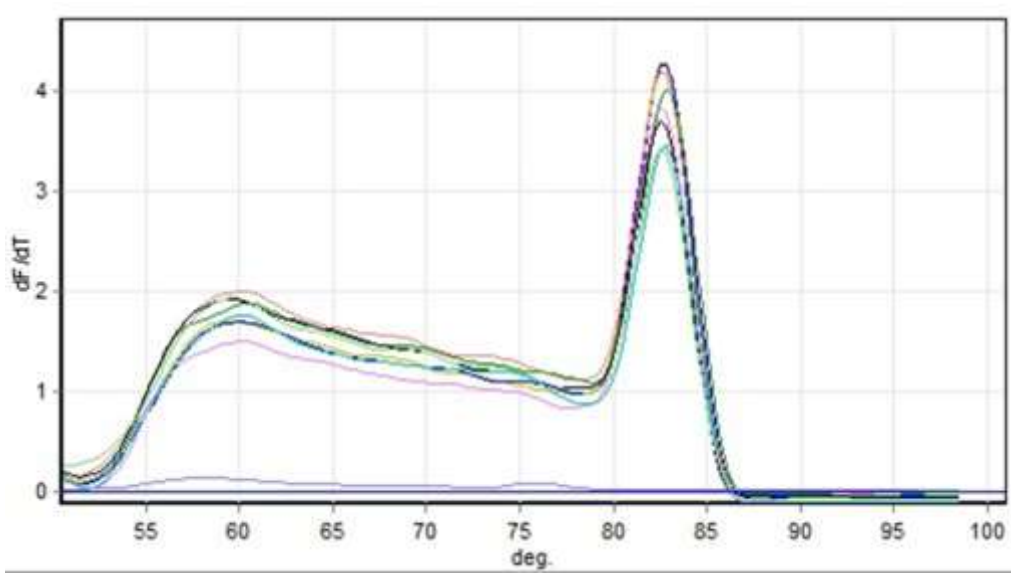
Bütün genlerin [β aktin (kontrol gen olarak kullanılacaktır, bu genin bütün dokularda ifadesinin olduğu bilinmektedir), leptin, igf-1, tnf- α , il-6, ppar γ -2] RT-QPCR deneylerinde kullanılmak üzere standart eğrileri elde edildi ve örnekler kullanılarak çekimlere başlandı. RT-QPCR çalışmaları Rotor Gene6000 realtime PCR cihazıyla (Corbett Qiagen) SYBR Green sistemi kullanılarak yürütülmüştür. Erime ve standart eğrileri ilgili yazılımla elde edilmiş ve ifade değerleri delta-delta C yöntemi ile hesaplanmıştır. Erime ve Standart eğrileri Şekil 96-113'te gösterilmektedir.



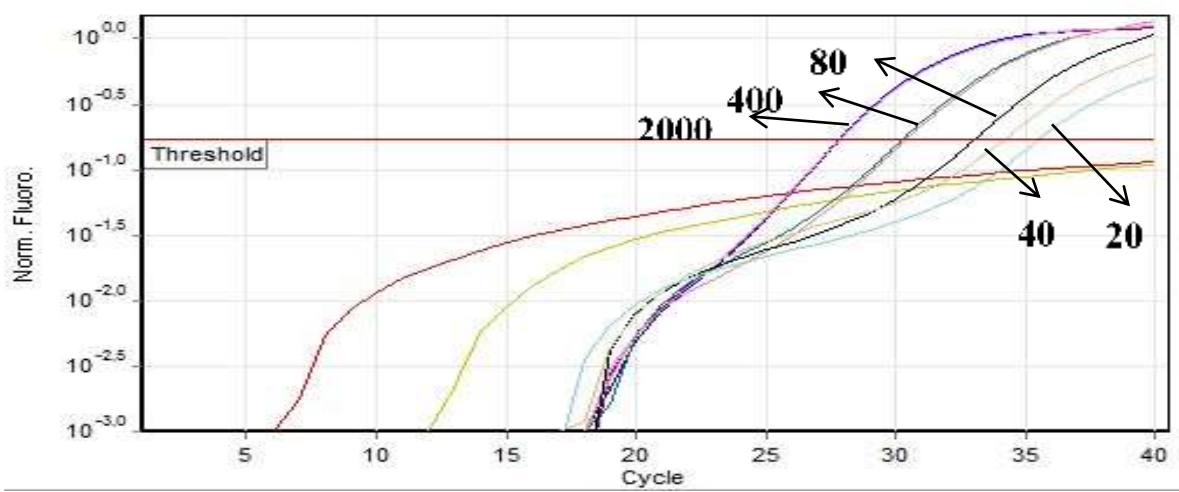
Şekil 96. Beta actin geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi



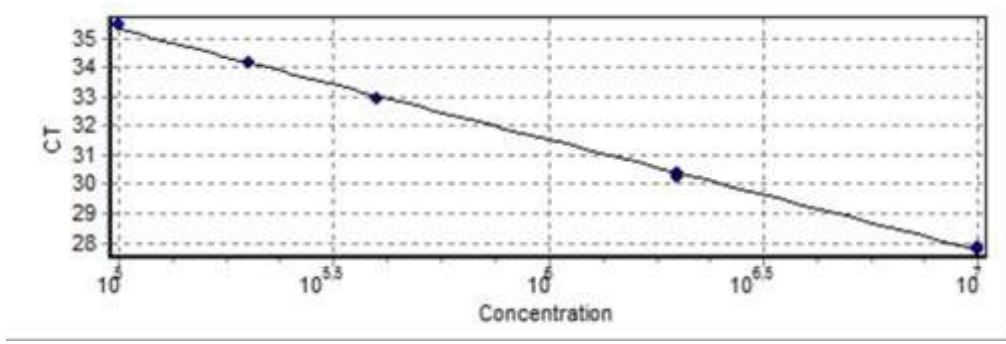
Şekil 97. Beta actin geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 0.90 ve R^2 ise 0,99 olarak hesaplandı



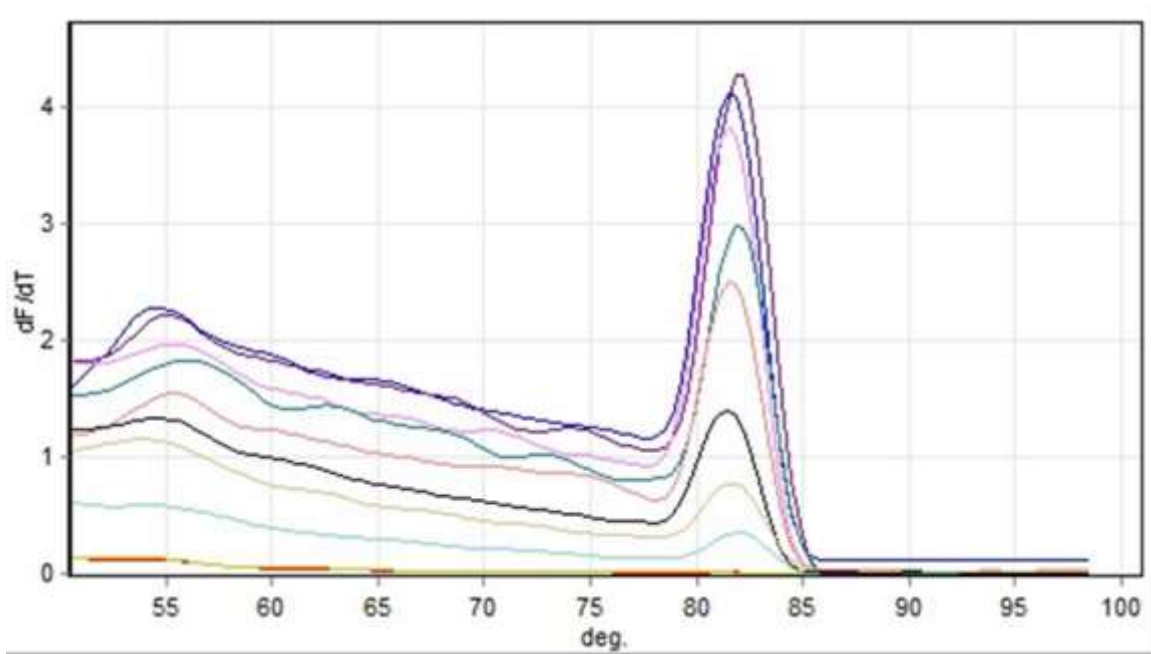
Şekil 98. Beta actin geninin melt A.Green erime grafiği



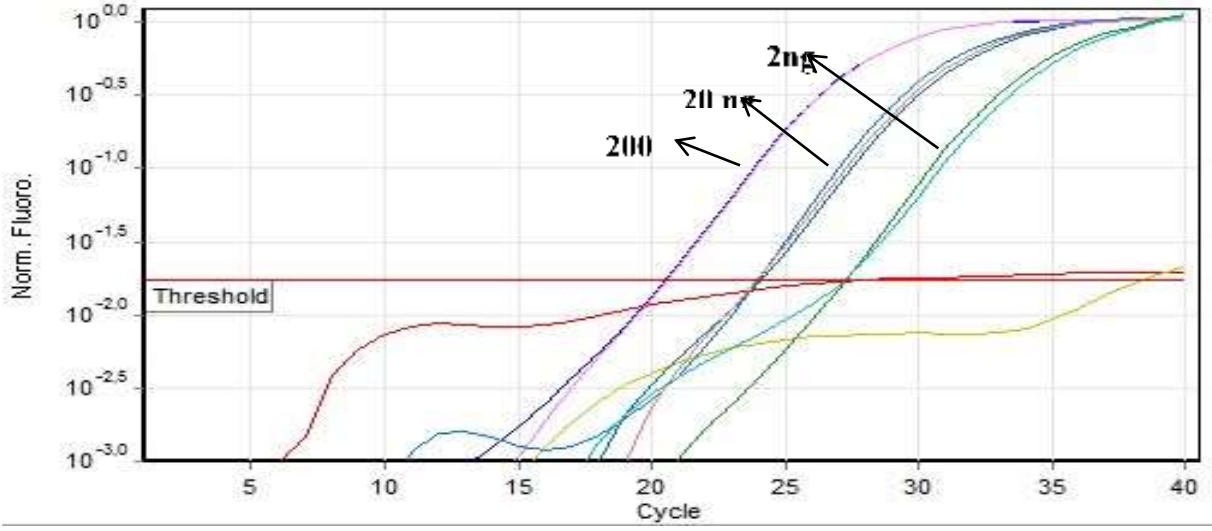
Şekil 99. Tnf- α geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi



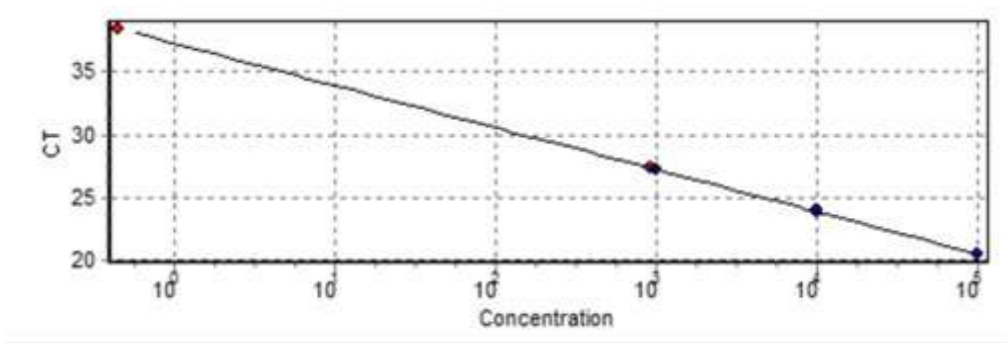
Şekil 100. Tnf- α geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 0.84 ve R^2 ise 0,99 olarak hesaplandı.



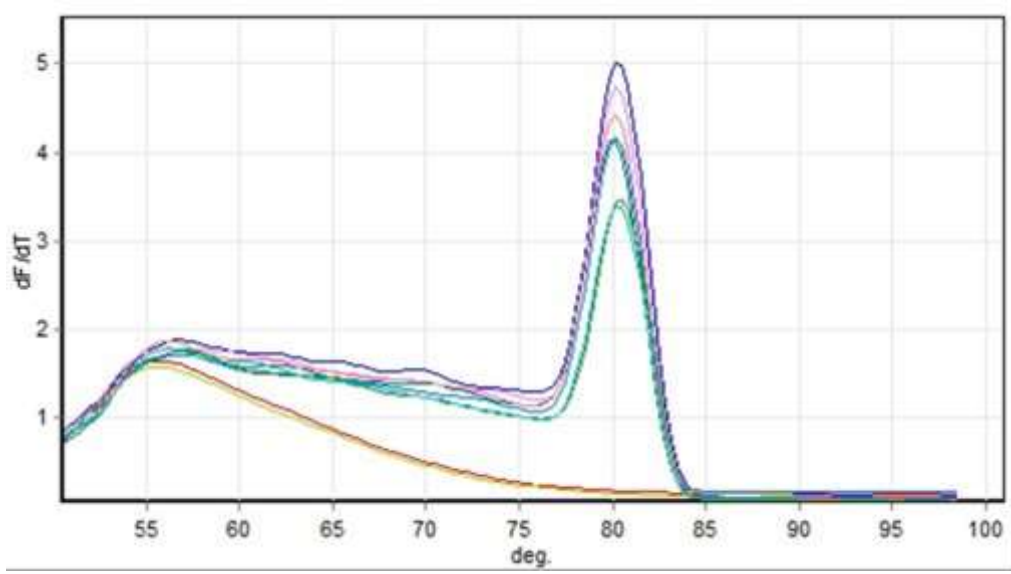
Şekil 101. Tnf- α geninin melt A.Green erime grafiği.



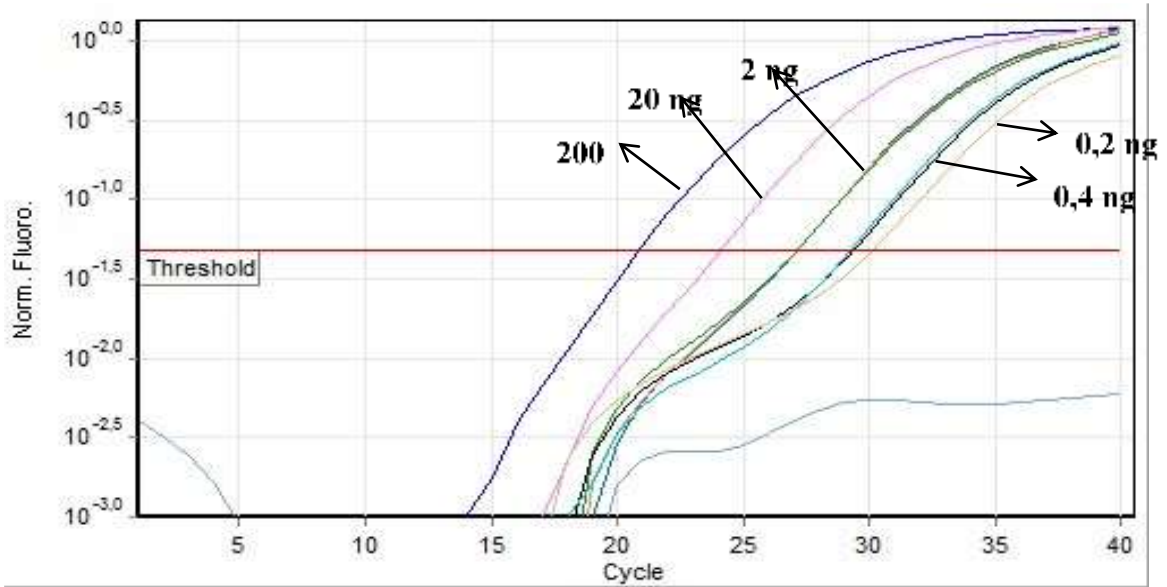
Şekil 102. Ppar-2 geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi



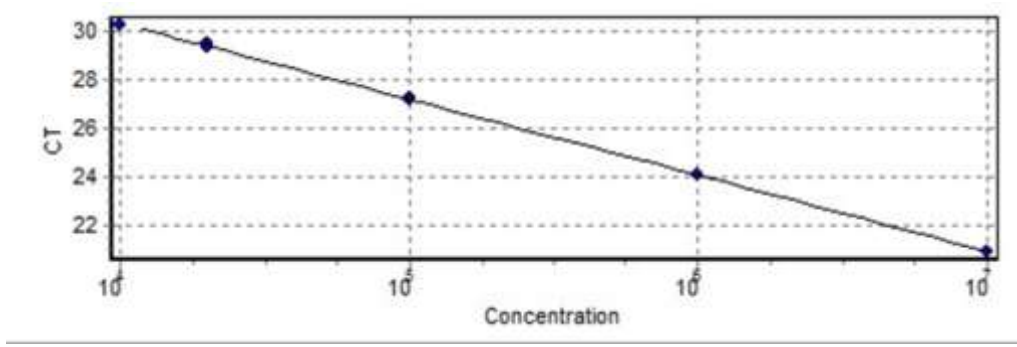
Şekil 103. Ppar-2 geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 0.99 ve R^2 ise 0,99 olarak hesaplandı.



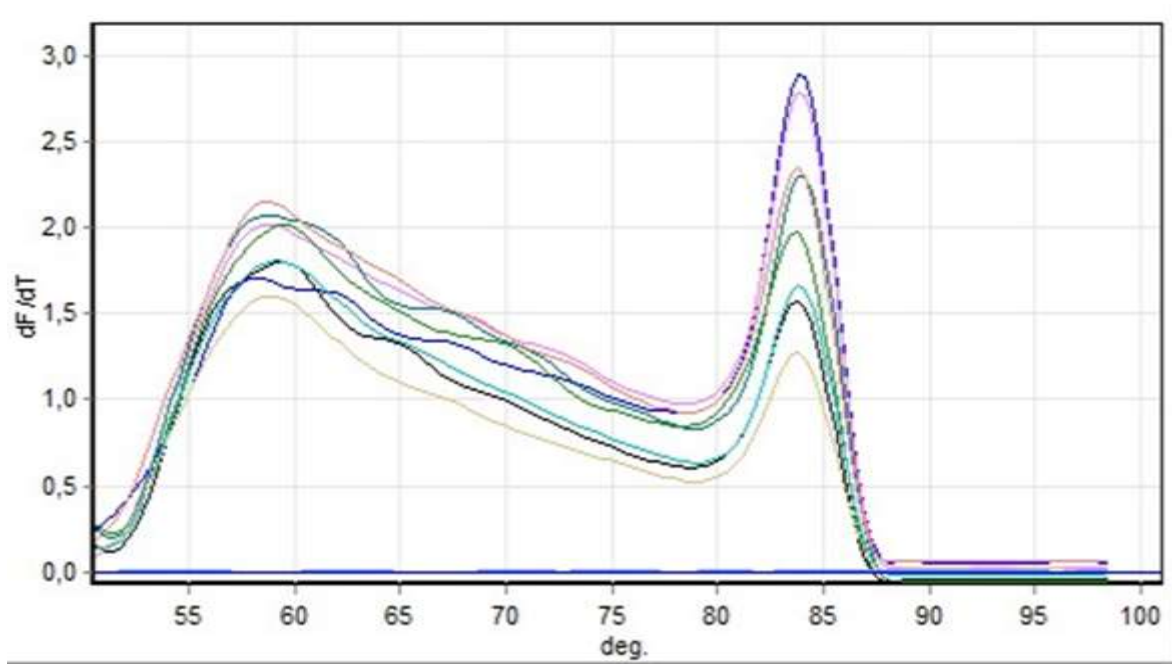
Şekil 104. Ppar-2 geninin melt A.Green erime grafiği.



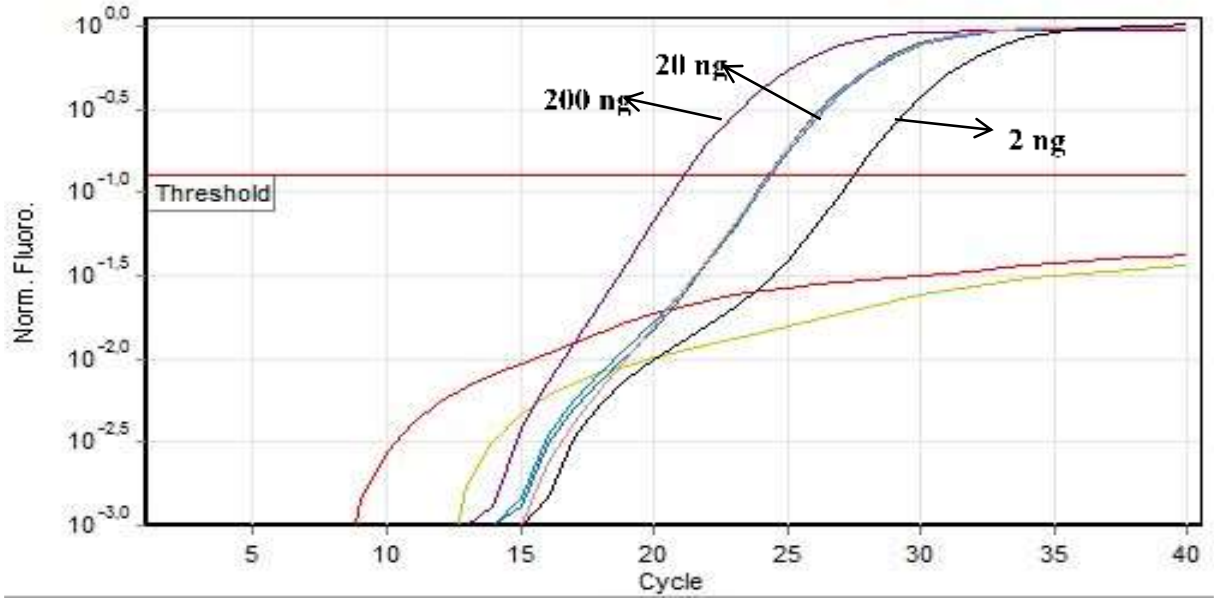
Şekil 105. Leptin geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi



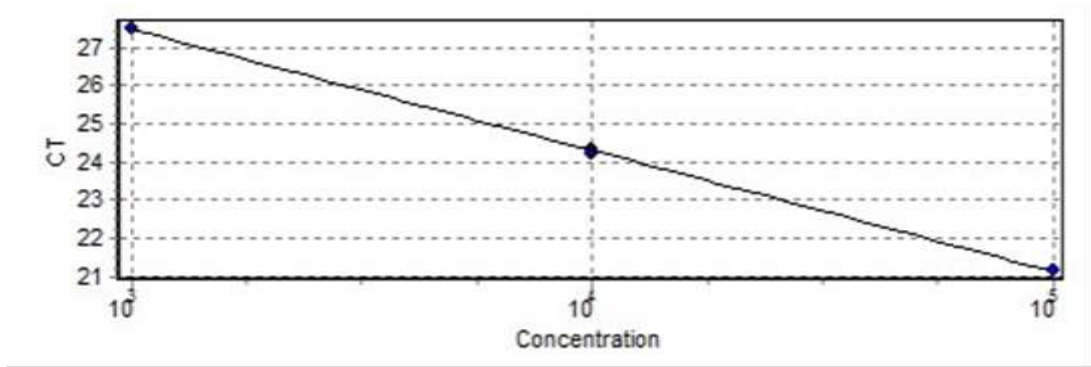
Şekil 106. Leptin geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 1.09 ve R^2 ise 0,99 olarak hesaplandı.



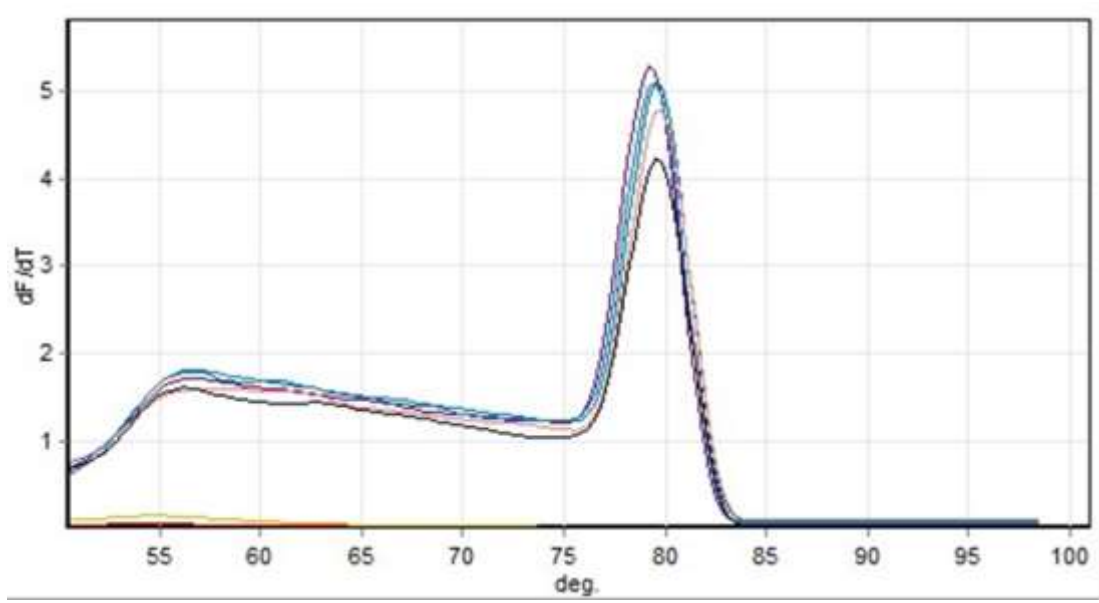
Şekil 107. Leptin geninin melt A.Green erime grafiği



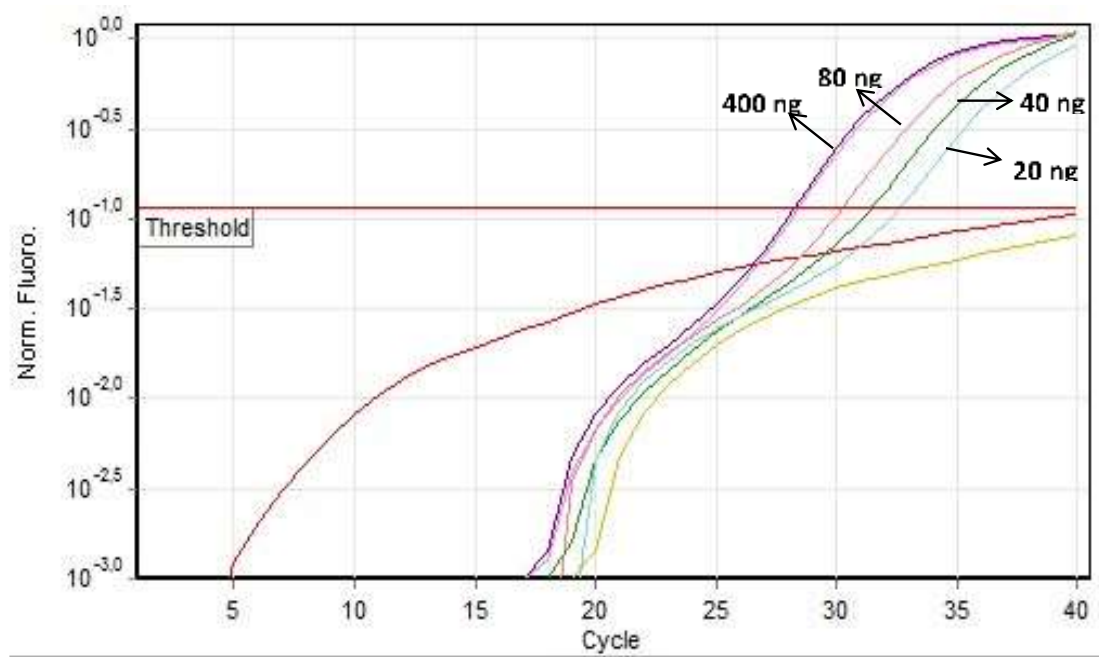
Şekil 108. Igf-1 geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi



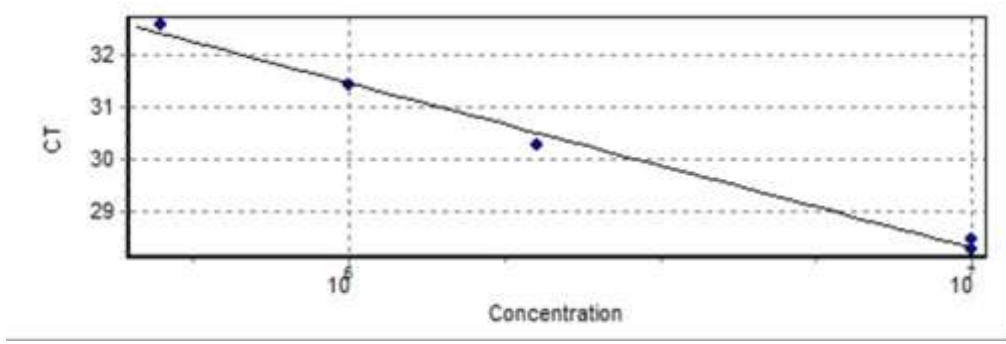
Şekil 109. Igf-1 geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 1.06 ve R^2 ise 0,99 olarak hesaplandı.



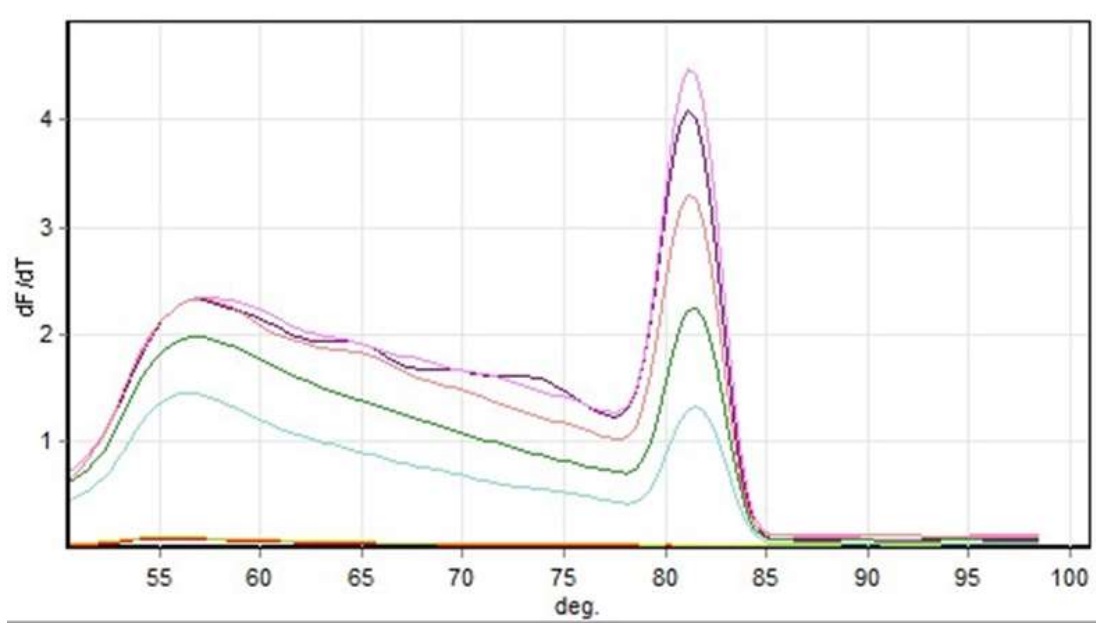
Şekil 110. Igf-1 geninin melt A.Green erime grafiği



Şekil 111. IL-6 geninin standart eğrisi için kullanılan Cycling A.Green kuantifikasyon verisi



Şekil 112. II-6 geni standart eğrisi. Reaksiyon efisiyanı 1.05 ve R^2 ise 0,99 olarak hesaplandı.



Şekil 113. II-6 geninin melt A.Green erime grafiği

Eldedilen bu standart eğriler, QRT-PCR deneylerinde kullanılan genlerin örneklerdeki ekspresyon seviyelerinin incelenmesinde kullanıldı.

4.5.2. Gen İfadesindeki Değişimler (Fold Changes in Expression):

Proje kapsamında, obez hayvanlarda miktarlarının değişeceği düşünülen ve beyaz adipoz dokudan (WAT) salgılanarak anti-adipogenik etkisi olduğu bilinen Il-6, leptin ve Tnf- α gibi adipokinlerin ve adipogenik etkisi olan Ppar γ -2 geninin ve Igf-1 adipokininin, dokulardaki miktarlarına bakabilmek için yapılan QRT-PCR deneylerinin sonuçları Tablo 29-32'de verilmiştir. Böylelikle, genotipi bilinmeyen bu hayvanların IF ve GF yağ dokularında, bu genlerde ve adipokinlerde bir değişim olup olmadığı saptanmıştır. Hesaplamalar, QRT-PCR deneyleri sonucu elde edilen standart eğriler ve Δ CT (Δ CP) değerleri ile aşağıdaki formül (Pfaffl, 2001) kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler ise One-way Anova ile yapılmış ve obez ırklar kontrole göre Dunnett testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Tablo 29. Dişi fare GF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar.

Dişi GF	Kontrol	BFMI852	BFMI856	BFMI860	BFMI861
Leptin	1	6,40 \pm 3,20	5,21 \pm 0,73	4,24 \pm 1,44	9,28 \pm 4,60
Ppar γ -2	1	1,05 \pm 0,31	0,87 \pm 0,25	0,64 \pm 0,19	1,46 \pm 0,58
Igf-1	1	1,58 \pm 0,58	1,06 \pm 0,41	0,91 \pm 0,40	1,75 \pm 0,70
Tnf- α	1	0,30 \pm 0,13**	0,16 \pm 0,04***	0,28 \pm 0,07**	0,51 \pm 0,14*
Il-6	1	0,28 \pm 0,11*	0,13 \pm 0,05**	0,25 \pm 0,06*	0,48 \pm 0,12*

Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

Tablo 30. Erkek fare IF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar.

Erkek GF	Kontrol	BFMI852	BFMI856	BFMI860	BFMI861
Leptin	1	17,13 ± 3,30 **	5,21 ± 0,73	7,32 ± 0,28	11,18 ± 3,72*
Ppar γ -2	1	1,12 ± 0,30	0,73 ± 0,11	1,03 ± 0,37	0,55 ± 0,17
Igf-1	1	0,70 ± 0,25	0,52 ± 0,05	1,02 ± 0,50	0,24 ± 0,04
Tnf- α	1	0,63 ± 0,20	0,49 ± 0,12	0,59 ± 0,27	0,33 ± 0,06
Il-6	1	0,58 ± 0,18	0,43 ± 0,14	0,51 ± 0,22	0,30 ± 0,04

Verilen değerler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Tablo 31. Dişi fare IF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar

Dişi IF	Kontrol	BFMI852	BFMI856	BFMI860	BFMI861
Leptin	1	116,81 ± 45,75	52,74 ± 10,65	167,29 ± 87,40	441,92 ± 49,67***
Ppar γ -2	1	2,11 ± 0,73	1,94 ± 1,13	2,45 ± 1,48	6,04 ± 3,42
Igf-1	1	4,90 ± 0,59	15,60 ± 6,22	13,98 ± 5,22	18,21 ± 7,94
Tnf- α	1	0,50 ± 0,25	0,57 ± 0,33	0,30 ± 0,16	0,74 ± 0,30
Il-6	1	0,46 ± 0,20	0,55 ± 0,28	0,26 ± 0,11	0,68 ± 0,23

Verilen değerler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Tablo 32. Erkek fare IF adipoz dokusunda kontrol ve obez grupları arasında gen ifadesinde görülen farklılıklar

Erkek IF	Kontrol	BFMI852	BFMI856	BFMI860	BFMI861
Leptin	1	2,09 ± 0,09***	4,79 ± 0,15***	9,05 ± 0,05***	4,15 ± 0,09***
Ppar γ -2	1	0,42 ± 0,12*	0,52 ± 0,17*	0,57 ± 0,14	0,24 ± 0,04**
Igf-1	1	0,73 ± 0,23	2,00 ± 0,91	2,17 ± 0,84	3,65 ± 1,53
Tnf- α	1	0,77 ± 0,18	0,45 ± 0,01*	0,50 ± 0,13*	0,53 ± 0,07
Il-6	1	0,71 ± 0,15	0,38 ± 0,03**	0,44 ± 0,11*	0,49 ± 0,10

Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Adipoz doku içerisinde beyaz (WAT) ve kahverengi (BAT) olmak üzere iki farklı doku çeşidi bulunmaktadır. Termogenezden sorumlu olan BAT adrenerjik olarak stimüle edilmediği zaman, kahverengi karakteristiklerinin çoğunu kaybederek WAT'a benzer dokulara dönüşür (transdiferansiyasyon). Bu morfolojik dönüşüm de UCP1 geninin inhibisyonu ve leptin geninin aktivasyonu ile meydana gelir (*Cancello v.d., 1998*). Bu transdiferansiyasyon sayesinde, miktarı ve hacmi artan WAT'tan salgılanan IL-6, TNF α ve IGF-1 gibi adipokinlerin ve Ppar γ 2 gen ekspresyonu seviyeleri de değişmektedir. WAT ve bazı immün hücrelerinden yüksek miktarda salgılanan bu sitokinlerin, hem obezitede görülen metabolik bozukluk haline, hem de kronik enflamasyona eşlik ettiği tespit edilmiştir (*Hotamisligil v.d., 1996; Hotamisligil v.d., 1993; Sethi ve Hotamisligil, 2003; Aguirre 2000*).

Adipokinler, insülin direnci ve obezite ile de yakın ilişki içindedir. Bunlardan bazıları: leptin, insulin benzeri büyüme hormonu (IGF-1) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) dır. Bu adipokinler içinde yer alan IGF-1, lipoliz inhibisyonu, glikoz transport ve oksidasyonun stimüle edilmesinde IL-6 lipoliz indüksiyonunda; leptin, lipoliz stimülasyonu ve otokrin leptin ekspresyonu regülasyonunda ve TNF- α ise lipoliz stimülasyonu, leptin salgılanması regülasyonunda, adipozit diferensiyasyonun inhibisyonunda ve insülin direncinin oluşmasında görevlidir (*Kahn v.d., 2006; Fantuzzi, 2005; Nawrocki v.d., 2005; Berg v.d., 2005; Bell v.d., 2005; Trayhum, 2005; Trayhum ve Wood, 2004; Blake ve Ridker, 2002; Marette, 2002; Früchbeck, 2006*).

WAT birçok faktör salgılayarak organizmanın bütün vücut metabolizmasını etkiler. Bu faktörler içinde en önemlisi leptin hormonudur (**Zhang, 1994**). Leptin, sitokinlere benzer yapıda bir hormon olup, hipotalamustaki reseptörüne bağlanır ve IL-1 vasıtasıyla, insanlarda yemek yeme hissini azaltarak kilo alımını engeller. Kandaki düzeyi yağ dokusu ile doğru orantılıdır (**Özbalcı ve Şahin, 2007**). Ayrıca, düşük dereceli inflamasyon durumu ile insülin direnci oluşumu arasındaki bağlantıyı sağlayan proinflamatuvar sitokinlerin de WAT'tan salgılandığı gösterilmiştir. Obez hayvanlarda kandaki seviyesi artan leptin adipoz doku tarafından depolanmaktadır. Depolanan leptin adipoz dokunun bir süre sonra leptine direnç göstermesine sebep olur ve obezitenin şiddetli (severe) bir duruma gelmesine sebep olur (**Funaki, 2009**). Proje kapsamında yapılan QRT-PCR çalışmaları sonucunda dişi ve erkek fare IF ve GF adipoz dokularında leptin miktarları kat kat yüksek tespit edilmiştir. Özellikle, BFMI861 ırkında dişi ve erkek fare IF ve GF adipoz dokularının tümünde çok yüksek bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, bu hayvanlarda obezitenin yeni gelişmeye başladığı ve BFMI861 ırkında bu hastalığın etkilerinin daha şiddetli görülüyor olabileceği saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda, TNF- α ve IL-6 gibi bazı sitokinlerin, insülin sinyal yolağını inhibe ederek, insülinin hücredeki etkisini önlediği gösterilmiş ve bu sitokinlerin, obezitede adipoz doku ve makrofaj gibi immün sistem elemanlarından yüksek miktarda salgılandıkları tespit edilmiştir (**Hotamisligil v.d., 1996; Hotamisligil v.d., 1993; Sethi ve Hotamisligil, 1999; Aguirre, 2000**). Dolayısıyla, obezitede görülen artmış sitokin salgılanması, obeziteye kronik bir enflamasyon durumunun eşlik ettiğini göstermektedir (**Hotamisligil, 2003**). Ancak, projede kullanılan obez ırkların adipoz dokularında TNF- α ve IL-6 sitokinlerinin gen ifadelerinde bir artış bulunamamıştır. Hatta bazı doku ve ırklarda kontrol grubuna göre adipoz dokudan salgılanan bu sitokinlerin miktarları daha düşük tespit edilmiştir (Tablo 29-32). Bunun sebebi de kontrol olarak kullanılan inbred obez DBAJ ırkının genetik olarak kullandığımız obez BFMI ırklarından farklı olması olarak düşünülmüştür. Bu sonuçlara göre 10 haftalık standart diyet (SBD) ile beslenen bu hayvanlarda obeziteye bağlı enflamasyon gözlenmemiştir. Ek olarak, burada çalışılan sitokinler genellikle parakrin olarak salınıp etki ettikleri için, transkripsiyon sonrası yani translasyon veya salınım basamaklarında bir regülasyon söz konusu olabilir. Bu amaçla, bu sitokinlerin salınmış protein seviyelerinin belirlenmesi gelecek çalışmaların konusu olabilir.

Proje kapsamında, lipoliz inhibasyonu, glikoz transport ve oksidasyonun stimüle edilmesinde görevi olduğu bilinen igf-1 geninin IF ve GF adipoz dokularındaki ifadelerine bakıldı. Ancak bu genin kontrol ve obez ırklardaki ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmedi.

Son yıllarda PPAR γ knock out fareleri ile yapılan çalışmalarda, peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptörlerden (PPARs) PPAR γ 'nın, BAT'da UCP1 geninin ekspresyonunu tetiklediği ve BAT dokusunun WAT'a dönüşümüne etki ettiği bulunmuştur (**Sears v.d., 1996; Puigserver v.d., 1998; Nedergaard v.d., 2005; Barak v.d., 1999, He v.d., 2003**). Bu knockout çalışmalarının biri sonucunda, PPAR γ geni yokluğunda serum serbest yağ asidi ve trigliserit miktarlarının arttığı, leptin miktarlarının ise azaldığı tespit edilmiştir (**He v.d., 2003**). Ayrıca, PPAR γ geni, WAT dokusu gelişimi ve normal fonksiyonu için de gereklidir (**He v.d., 2003; Koutnikova v.d., 2003; Loviscach v.d., 2000**). Obezite hastalığının gelişiminde önemli rolü bulunan bu genin adipoz dokudaki ifadesine de bakılmıştır. Kontrol ve obez ırkların adipoz dokularında bu genin miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmamıştır.

Leptin'in keşfinden sonra adipoz doku salt enerji depo eden pasif bir doku sistemi olmaktan çıkmıştır. Artık, adipoz dokunun, özellikle de beyaz adipoz dokunun ve onunla ilişkili stromal hücrelerin birer endokrin organ olup üzerlerinde birçok farklı sitokin ve hormon için reseptörler taşıdıkları bilinmektedir. Bu sitokin ve hormonlarla başlatılan sinyal yolları, sıklıkla enflamasyon yollarıyla kesişmektedir.

Çalışılan fare modellerinde enflamasyon belirteçlerine ait mRNA ifade seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlenememesinin birden çok nedeni olabilir. Kontrol fare ırkı olan DBAJ, karşılaştırma için uygun bir ırk olmayabilir. BFMI farelerinin DBAJ ırkıyla aynı kökenden gelmelerine karşın, birkaç kuşak boyunca devam ettirilen iç dölleme, BFMI ırkının genetik yapısında önemli bir değişime yol açmış olabilir. Bu olası durum DBAJ ile karşılaştırma yapmayı zorlaştırmaktadır. İkinci olarak, sitokinler genellikle salınmış proteinlerdir, gelecek çalışmalar protein ifadesi ve/veya salınmış sitokin ve hormon miktarlarının belirlenmesi olarak dizayn edilebilir. Son olarak, stromal hücreler (makrofajlar) beyaz adipoz dokuyla ilişki içinde bulunurlar ve enflamasyon kaynaklı sitokinlerin salınımından sorumludurlar. Bu nedenle, Hücre ayırımı gibi ileri tekniklerin stromal hücrelerin adipoz dokudan ayrılarak her birine ait sitokin ifade seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kullanımı, obezite ilişkili enflamasyonla ilgili ek bilgi sağlayabilir.

Leptin bir hormon olup beslenme sonrası doyumla ilintilidir. Leptin direncinin vücuttaki yağ dokusunun artması ile ilgili olduğu iyi bilinmektedir. Bu durumun obezite oluşumu ve/veya devamı ile ilgisi olduğuna inanılmaktadır. BFMI fare modelleri adipoz dokularındaki çeşitli genlerin ifade profilleri, tüm çalışılan yağ dokularında leptin ifadesinin birkaç yüz kat yükseldiğini göstermiştir. Bu önemli bilgi, bu hayvanların hiperfajik yapıda olduğunu pekiştirmekte ve bu modellerin obezite ve ilgili hastalıkların çalışmaları için uygunluğunu göstermektedir.

4.6. Genel değerlendirme

Obezite gibi birçok metabolik hastağın kaynağı hücre düzeyindeki bazı işleyiş bozukluklarıdır (**Storlien v.d., 1998; Rask-Madsen ve King, 2007**). Bu işlev bozuklukları, hücre fonksiyonlarını yürüten hücre zarı, iyon kanalları, reseptörler gibi organel ve moleküllerinin yapısal ve regülatör bozuklukları ve birbirleri ile etkileşimlerindeki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır (**Awayda v.d., 2004; Wang ve Zhang, 2005; Luneva v.d., 2007**). Dolayısıyla, dokularda oluşan moleküler düzeydeki değişikliklerin tayini, hastalıkların moleküler mekanizmalarını ve ilerleyişlerini çözümlmek açısından büyük önem taşımaktadır. Biyolojik moleküllerin fonksiyonları yapılarına bağlıdır ve bu nedenle yapısal çalışmaların önemi büyüktür. Günümüzde moleküler kompozisyondaki değişimlerin membranda normal işleyiş için gerekli olan lipit ve protein gibi moleküllerin asimetric dağılımını değiştirdiğini, bunun da çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Örneğın doymamış/doymuş lipit, lipit/protein oranlarındaki değişimin membran kalınlığını ve lipit düzeni diğeri bir deyimle membran yapısını değiştirdiğini ve bunun da membran akışkanlığı ile ilgili olduğu ve iyon akımları kinetiğı ve fonksiyonunu altüst ettiğı bilinmektedir (**Szalontai v.d. 2000, Awayda w.d. 2004, Cakmak v.d. 2011**) Bu nedenle Yapısal ve moleküler içeriklerindeki değişimleri belirlemeye yönelik çalışmaların önemi büyüktür. Bu konuda projede kullandığımız FTIR spektroskopisi ve mikroskopisinin önemli bir yeri vardır.

FTIR spektroskopisi, biyolojik çalışmalar açısından lipitlerin diğeri biyomoleküllerle etkileşimleri, proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi, kanser, diyabet gibi patolojik durumların doku ve membran düzeyinde tanım ve teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (**Mantsch, 1984; Liu v.d., 1996; Boyar ve Severcan, 1997; Fukuyama v.d., 1999; Severcan v.d., 2000; Ramesh v.d., 2002; Toyran v.d., 2006; Dogan v.d., 2007; Ozek v.d., 2010; Severcan v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011; Cakmak v.d., 2012, Severcan ve Haris, 2012**).

Yaptığımız ATR-FTIR çalışmalarında incelenen 3010 cm^{-1} konumunda gözlenen ve doymamış yağ asitlerinde bulunan HC=CH gruplarının C-H bağlarındaki gerilme titreşimlerinden kaynaklanan bandın şiddeti veya altındaki alan hidrokarbon zincirlerinin doymamışlığı hakkında bilgi vermektedir (**Takahashi v.d., 1991; Melin v.d., 2000; Cakmak v.d., 2003; Severcan v.d., 2005a, Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Proje sonuçlarımız dişi ve erkek fare IF dokusunda doymamış yağ içeriğide özellikle BFMI852, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında kayda değer biçimde azalma meydana gelmiştir. FTIR mikroskopisinde ise benzer olarak IF dokuda BFMI852, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında ve GF dokuda BFMI860 ve BFMI861 ırklarına doymamış lipit miktrında azalma görülmüştür.

Olefinik bant alanında görülen bu azalmanın nedeninin, artan lipit peroksidasyonu sonucu dokudaki doymamış yağ asitlerinin azalmasına bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır. (**Bruch v.d., 1983; Curtis v.d., 1984; Bozkurt v.d., 2010; Severcan v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). BFMI ırkları içerisinde BFMI860 ve BFMI861 fareleri inguinal adipoz dokularında en düşük olefinik bant alanına ve doymamışlık indeksine sahip oldukları ve lipit peroksidasyonuna en yatkın olan ırklar oldukları gözlenmiştir.

BFMI ırkları ve kontrol fare GF ve IF adipoz doku spektrumları parmak izi bölgesinde yer alan, trigliseritler ve kolesterol esterlerinden kaynaklanan 1743 cm^{-1} bandı frekans ve alan değerlerinde, kontrole göre anlamlı bir değişim ,artış doğrultusunda, tüm erkek GF BFMI ırklarında ve en belirgin olarak da BFMI 860 ırkında görülmüştür. Erkek IF dokularında ise trigliseritte anlamlı artış sadece BFMI 860 ve 861 ırkları için elde edilmiştir. Yapılan HPLC çalışmaları sonucunda bu bulguları destekleyecek nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Trigliserit miktarı BFMI860 ve BFMI861 ırklarında, BFMI852 ve BFMI856 ırklarına ve kontrol (DBAJ) ırkına nispeten anlamlı olarak artış göstermiştir. Bu sonuçlar özellikle BFMI860 olmak üzere BFMI860 ve BFMI861 ırklarının daha yüksek insülin direncine sahip olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir (**Wagener, 2006; Hantschel v.d., 2011**). Trigliseritler kolesterol esterleri ile birlikte adipoz dokuda depolanan lipit çeşitleri arasında en büyük orana sahiptirler. Bunun yanı sıra az miktarda gangliositler de adipoz doku içerisinde depolanmaktadır (**Tanabe v.d., 2009**). Depolanan TG yapılarında doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asitleri bulunmaktadır (**Perona v.d., 2000; Summers v.d., 2000**). Adipoz dokuda depolanan lipitlerin, özellikle de yağ asitlerinin, kompozisyonu adipositlerin sayılarını ve hücre büyüklüklerini etkileyebilir (**Azain, 2004**). TG'lerin adipoz dokuda depolanmaları ve parçalanarak mobilize edilmelerinde, yapıları içerisinde bulunan yağ asitlerinin zincir uzunlukları, doymamışlık miktarları ve çift bağlarının yerleri önem taşımaktadır (**Raclot, 1997; Raclot ve Ourdart, 2000**). Ayrıca, membran yapısında bulunan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asidi miktarındaki artımın, hücrede bulunan insülin reseptör sayısında ve insülin yoluyla gerçekleşen glikoz taşınmasında değişikliklere neden olabileceği ve insülin duyarlılığını arttırabileceği öne sürülmüştür (**Storlien v.d., 1991; Ayre v.d., 1998**). Bu nedenle, adipoz doku içerisindeki lipit içeriğinin ve yapısal özelliklerinin incelenmesi adipoz dokudan dolaşıma karışan FFA ve gliserol miktarının belirlenmesinde, dolayısıyla da insulin direnci ve obezite oluşumunun aydınlatılmasında önemli bir basamak teşkil etmektedir.

HPLC sonuçlarımız kolesterol düzeylerinin başta BFMI860 olmak üzere BFMI861 ve BFMI 856 ırklarında yükselmiş olduğunu göstermektedir. Kolesterol lipitlerin önemli bir üyesidir ve en önemli görevlerinden biri steroid hormonların sentezinde rol almasıdır diğer bir önemli görevi ise hücre membranı akışkanlığını sağlamasıdır (**Christie, 1987; Duane, 1997; Hu v.d.,**

2010). Membran akışkanlığının ise İnsülin reseptörlerinin fonksiyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. İnsülin reseptörleri membranda lipit rafları adı verilen yapılara yerleşmiştir ve bu yapılarda meydana gelebilecek problemler insülin reseptörlerini fonksiyonsuz kılabilir. Bunun sonucunda oluşabilecek yüksek insülin düzeyinin insülin direnci ve arteroskleroz gibi bazı hastalıklara neden olabileceği bilinmektedir (**Gustavsson, 1999; Pike, 2009**). İnsülin direnci ise obezite riskini arttıran en önemli etkenlerdendir (**Gedik, 2003; Stuart v.d., 2003**).

Ayrıca, proje kapsamında yapılan QRT-PCR çalışmaları sonucunda dişi ve erkek fare IF ve GF adipoz dokularında leptin miktarları kat kat yüksek tespit edilmiştir. Özellikle, BFMI861 ırkında dişi ve erkek fare IF ve GF adipoz dokularının tümünde çok yüksek bir artış tespit edilmiştir. Leptin hormonunun birçok faktör salgılayarak organizmanın bütün vücut metabolizmasını etkileyen WAT tarafından salgılandığı bilinmektedir (**Zhang, 1994**). Leptin, sitokinlere benzer yapıda bir hormon olup, hipotalamustaki reseptörüne bağlanır ve IL-1 vasıtasıyla, insanlarda yemek yeme hissini azaltarak kilo alımını engeller. Kandaki düzeyi yağ dokusu ile doğru orantılıdır (**Özbalcı ve Şahin, 2007**). Ayrıca, düşük dereceli inflamasyon durumu ile insülin direnci oluşumu arasındaki bağlantıyı sağlayan proinflamatuvar sitokinlerin de WAT'tan salgılandığı gösterilmiştir. Obez hayvanlarda kandaki seviyesi artan leptin adipoz doku tarafından depo lanmaktadır. Depolanan leptin adipoz dokunun bir süre sonra leptine direnç göstermesine sebep olur ve obezitenin şiddetli (severe) bir duruma gelmesine sebep olur (**Funaki, 2009**). Bu bilgiler doğrultusunda özellikle BFMI861 ırkında leptin direnci geliştiği, bu hayvanlarda obezitenin yeni gelişmeye başladığı ve bu ırkta bu hastalığın etkilerinin daha şiddetli görülüyor olabileceği saptanmıştır.

Projemiz FTIR mikroskobisi çalışmaları dahilinde, SBD ile beslenmiş kontrol (DBAJ) ve BFMI ırkları dişi ve erkek bireylere ait gonadal ve inguinal adipoz doku kesitlerden lipit/protein dağılımı (CH/amid 1), lipitlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim), doymamış/doymuş lipitlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim), lipit içeriğindeki karbonil grubu miktarı (Karbonil (C=O) gerilim bant alanı/CH gerilim bölge alanı) ve karbonhidrat/protein dağılımı (1030 cm⁻¹/amid 1) oranları hesaplanmıştır. Bütün ırklarda DBAJ (kontrol) grubuna göre daha yüksek lipit/protein dağılımı, yüksek miktarda trigliserit içeriği (karbonil, C=O) ile daha uzun zincirli lipit yapıları bulunduğu tespit edilmiştir. Irklar içinde ise, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında BFMI852 ve BFMI856 ırklarına nispeten daha yüksek lipit/protein dağılımı, yüksek miktarda trigliserit içeriği (karbonil, C=O) ile daha uzun zincirli lipit yapıları bulunduğu; ayrıca daha düşük doymamışlık indeksi tespit edilmiştir. BFMI860 ve BFMI861 ırklarında gözlenen bu lipit birikimi, UCP1 boyama sonuçlarından elde etmiş olduğumuz WAT- BAT ayrımı sonuçlarında bu ırklarda daha yüksek WAT oranı çıkması sonucunu desteklemektedir. Yaptığımız UCP1 (uncoupling protein 1) immünohistolojik

boyama sonuçlarından elde ettiğimiz sonuçlara göre bütün BFMI ırklarında kontrole göre hücrelerin hacimce büyüdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca küçük ve bol nukleuslu kahverengi adipoz doku hücrelerinin kontrol örneklerinde daha çok görüldüğü fakat BFMI ırklarında yerini büyük ve daha az nukleuslu beyaz adipoz doku hücrelerine bıraktığı görülmektedir. UCP1, sadece BAT' da ifade edilen önemli bir proteindir. (**Cannon v.d., 1982**). İncelediğimiz BFMI ırkı farelerde, beyaz adipoz doku miktarının artmasına bağlı olarak UCP1 gen ekspresyonunun azalmış ve dolayısıyla UCP1 proteinine BFMI ırklarında kontrole kıyasla daha az rastlanmıştır. BAT adrenerjik olarak stimüle edilmediği zaman, kahverengi karakteristiklerinin çoğunu kaybederek ünilocüler hücrelerden oluşan WAT'a benzer dokulara dönüşür. Bu morfolojik dönüşüm UCP1 geninin inhibisyonu ve leptin geninin aktivasyonu ile meydana gelir, fakat bu transformasyon geri dönüşümlüdür (**Cancello v.d., 1998**). Yapılan gözlemler sonucu beyaz adipoz doku miktarının inguinal dokularda gonadal dokulara nazaran daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum deri altı yağ dokusu olan inguinal adipoz dokunun ve iç organlara ait yağ dokusu olan gonadal adipoz dokusu hücrelerine göre daha fazla beyaz adipozit (WAT) içerdiğini dolayısıyla inguinal dokunun gonadal dokuya göre yağ depolamasına daha yatkın olduğunu göstermektedir. Inguinal ve gonadal dokular kendi içinde incelendiğinde, özellikle BFMI 852 ve 856 ırklarında BAT oranının BFMI860 ve BFMI861 ırklarına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Kemirgenlerde, adipoz dokularında bulunan BAT fenotipi, obezite ve diyabet gibi rahatsızlıkların önlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (**Cinti, 2006**). BFMI860 ve BFMI861 ırklarının ise yoğun olarak WAT'a sahip olduğu görülmüştür. BFMI860 ve BFMI861 ırklarında görülen bu değişim bu ırkların obeziteye daha yatkın olduğunu göstermektedir. Proje Alman ortağının daha önce yaptığı çalışmalarda BFMI ırkları içerisinde BFMI860 farelerinin en yüksek vücut yağ yüzdesine sahip olduğu gösterilmiştir (**Meyer v.d., 2009**).

Yapılan protein ikincil yapı analizi çalışmalarında, her iki metodla elde edilen protein ikincil yapılarındaki değişimler hem erkek hem de dişi bireylerde gonadal ve inguinal dokularda beta katlamalı miktarında azalma ve random coil miktarında artışın olduğunu göstermiştir ki bu da özellikle inguinal dokularda obeziteye bağlı proteinlerde denatürasyonun olduğunu göstermektedir. Söz konusu denatürasyon en çok BFMI860 ırkında gözlenmiştir. Projede incelenmiş olan adipoz dokularda protein ikincil yapılarında meydana gelebilecek değişimlerin tespit edilmesi, makromoleküler yapı ve fonksiyonlardaki değişimlerin belirlenmesi BFMI farelerinde kendiliğinden gelişen obezitenin fenotipik karakterizasyonu için gereklidir. Şimdiye kadar metabolik rahatsızlıklarla ilgili yapılan çalışmalarda, değişik proteinlerin miktarları ve gen ekspresyonları incelenmiştir (**Kim v.d., 2004; Deangelis v.d., 2005; Qiu v.d., 2005; Koza v.d., 2006; Charbonneau v.d., 2007; Benoit v.d., 2009**). Protein yapılarındaki ve buna bağlı

olarak da fonksiyonlarındaki değişimler, yalnızca gen ekspresyonundaki veya protein sentezindeki farklılaşmalara bağlı değildir. Proteinlerin görevlerini tam olarak yapabilmeleri doğal hallerindeki üç boyutlu yapılarına bağlıdır (**Anfinsen, 1973**). Proteinlerin katlanma aşamasında meydana gelebilecek her türlü hata, proteinlerin farklı ikincil, üçüncül ya da dördüncül yapılara ulaşmalarına, böylece ilgili proteinlerin işlevlerini yitirmelerine veya farklı işlevlere sahip olmalarına neden olmaktadır (**Soto, 2001**). Bu nedenle, ekspresyon değişikliği olmadan, yalnızca var olan proteinlerin birincil ya da ikincil yapılarının değişmesinin de proteinlerde fonksiyon bozulmalarına yol açabildikleri bilinmektedir. Örneğin, protein konformasyon değişimleri nedeni ile protein fonksiyon kaybı ve çökmesi (agregasyonu) gözlenen Alzheimer, Parkinson, Huntington ya da prion hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklarda çökelen proteinlerin çoğunlukla β -plakalı yapısında olduğu bir çok çalışma ile gösterilmiştir (**Blake ve Serpell, 1996; Perutz v.d., 2002; Jaroniec v.d., 2004**). Değişik hastalık durumlarında proteinlerin fonksiyonlarını anlayabilmek için proteinlerin yapısal değişimleri saptamak yeni tedavi yöntemleri geliştirebilmek açısından gereklidir. Günümüzde, metabolik hastalıklarda protein ikincil yapılarında görülebilecek olası değişikliklerle ilgili bilgi gereksiniminden dolayı bu alanda yapısal araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (**Toyran v.d., 2007; Bozkurt v.d., 2010; Bozkurt v.d., 2012**).

Dişi erkek farkı çalışmaları dahilinde aldığımız ATR sonuçlarında özellikle dişi IF adipoz dokusunda RNA ve protein sentezi miktarı, glikojen ve kolajen kalitesinde kontrol grubuna göre azalma, lipit zincir uzunluğu ve lipit miktarında artım, gözlenmiştir. Tüm bu değişimler, obezitenin bu dokuda etkisinin daha çok olduğunu göstermektedir. Bütün sonuçları biraraya getirdiğimizde, Lipit peroksidasyondan dişilerin daha çok etkilendiği saptanmış ve BFMI fare ırkları moleküler içerik yapılarında, kontrole göre en çok IF adipoz dokusunda farklılık bulunmuştur. Projemiz FTIR mikroskobisi çalışmaları dahilinde alınan sonuçlarda ise bu sonuçları destekler niteliktedir. Dişi ve erkek bireyler arasında WAT ve BAT transdiferansiyasyonunu anlamak üzere incelendiğinde genel olarak BFMI ırklarda kontrol(DBAJ) gruba göre UCP1 proteini miktarı dolayısıyla BAT oranının azaldığı ve yerini WAT'a bıraktığı görülmektedir. İnguinal dokular incelendiğinde, BFMI ırkı erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir, özellikle BFMI 852 ve 856 ırklarına ait erkek bireylerde bu fark diğer ırklara göre daha fazla gözlenmiştir. Dişi bireylerde ise yoğun olarak WAT gözlenmiştir. Gonadal dokular incelendiğinde, yine ırkı erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir fakat bu oran inguinal dokulara göre daha azdır. Obezitede oluşabilen cinsiyete dayalı farklılıklar steroid cinsiyet hormonlarından kaynaklanabilir çünkü bu hormonlar farklı adipoz dokulardaki yağ dokunun miktarı ve dağılımının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda, bu tip cinsiyete dayalı

farklılıklar insanlarda da görülmüştür (**Woods, 2003; Mayes ve Watson, 2004**). Genel olarak adipoz dokusunun normal dişilerde erkeklere göre daha fazla olduğu, aynı şekilde obez dişilerde adipoz dokunun obez erkeklerden daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca, obez farelerin, obez olmayanlara göre ve dişî farelerin erkeklere göre insülin direncinin daha yüksek olduğu görülmüştür (**Karlsson v.d., 2006**). BFMI ırkları ile ilgili yapılan geçmiş çalışmalarda cinsiyete göre farklı fenotipler gözlenmiştir. Bu çalışmalarda, genel olarak erkek farelerin, dişilere göre daha fazla kilo aldığı ve daha uzun olduğu belirlenmiş, erkek farelerin gövde uzunluğu ve organ ağırlıklarının daha yüksek olduğu, ayrıca erkek farelerin total WAT kütlelerinin dişilere göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu etki muhtemelen erkeklerde, dişilere nazaran daha yüksek olan enerji alımının bir sonucudur. İki cinsiyette de glikoz konsantrasyonlarının aynı olduğu görülmüştür (**Wagener v.d., 2006**). Obezitede dişî ve erkek arasındaki farklılıkları ortaya koymak için yapılan bir çalışmada, vücudun farklı bölgelerinde adipoz doku miktarlarının değişimi incelenmiş ve total adipoz doku, iç organlara ait adipoz doku, deri altıadipoz doku ve derin deri altı adipoz dokusu miktarlarının obez insanlarda yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (**Karlsson v.d., 2006**). Aynı çalışmada ayrıca, genel olarak adipoz dokusunun normal dişilerde erkeklere göre daha fazla olduğu, aynı şekilde obez dişilerde adipoz dokunun obez erkeklerden daha fazla olduğu bulunmuştur. Yapılan araştırmada, serum insülin, trigliserit, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol miktarlarına bakılmış ve serum insülin miktarının, obez grupta, obez olmayan gruba göre hem kadın hem de erkekte 2 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca, obez kadın ve erkeklerde, trigliserit miktarları da farklı bulunmuştur (**Karlsson v.d., 2006**). Homeostaz model analizi (HOMA) ile pankreatik beta hücresi fonksiyonları kıyaslanmış ve bu fonksiyonun obez kadın ve erkeklerde, obez olmayanlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, yine aynı metodla, insülin direncine bakılmış ve obez farelerin, obez olmayanlara göre ve dişî farelerin erkeklere göre insülin direncinin daha yüksek olduğu görülmüştür (**Karlsson v.d., 2006**). Obezite oluşumunda cinsiyete bağlı farklılıkların anlaşılmasına yönelik çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, farklı adipoz dokularında biyomoleküler içerik ve yapısal anlamdaki özellikle lipit profilindeki değişimler henüz açığa çıkarılamamıştır. Tamamlanan projemizde , yüksek yağ oranına göre seçilmiş erkek ve dişî 4 farklı inbred obez fare modellerinin (BFMI) inguinal ve gonadal adipoz dokularında total kolesterol, trigliserit miktarı gibi lipit çeşitleri HPLC tekniği ile belirlenmiş, ayrıca intraperitoneal glikoz tolerans testi (IPGTT) ile serum insülin ve glikoz değerlerinden bu farelerdeki insülin direncinin değişimi incelenmiştir.

İncelenen ırklar göz önünde bulundurulduğu zaman ise BFMI860 ve BFMI860 ırklarının spektral parametrelerde en belirgin farklılıkları gösterdikleri belirlenmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, projede incelenen karmaşık genetik yapıya sahip olmaları

nedeniyle insanlarda da görülen ve kendiliğinden gelişen obeziteye model oluşturan inbred fare ırklarından BFMI860 ve BMMI806 farelerinin obezite çalışmalarına daha uygun oldukları belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Obezite, serbest yağ asitlerinin ve trigliseritlerin kan dolaşımındaki miktarlarının artması ile bir çok dokuda lipit birikimine sebep olan metabolik bir rahatsızlıktır. Diğer hastalıklara benzer olarak obezitenin de, dokulardaki moleküllerin ve membran gibi makromoleküler toplulukların yapısal ve regülatör değişimleri sonucu oluşan bazı işleyiş bozukluklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tüm bu değişimlerin temelinde makromoleküler içerik, yapı ve fonksiyon değişimlerinin olması beklenmektedir. Bu neden ile, bu çalışma, yapısal ve içeriksel biyomoleküler değişimleri inceleyerek kendiliğinden oluşan obezitenin temelini anlamaya katkıda bulunmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Projenin diğer bir amacı da 52 nesil boyunca inbred olarak çiftleştirilmek elde edilmiş, genetik özellikleri henüz çok iyi bilinmeyen projede kullandığımız BFMI farelerini karakterize ederek obezite ve diyabet çalışmaları için uygun ırkları belirlemektir. Obezite çalışmalarında kullanılmak üzere oluşturulan bu yeni fare modelleri, yüksek yağ içerikli diyet ile tetiklenmemiş, aksine kendiliğinden oluşan obezitenin farklı adipoz dokular ve farklı cinsiyetler üzerine olan etkisinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu amaç doğrultusunda, ATR-FTIR spektroskopisi ve FTIR mirospektroskopisi (FTIRM) tekniklerini kullanılarak BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 (BFMI) ve kontrol (DBAJ) farelerinin subkütan adipoz doku olan (SAT) inguinal (IF) ve viseral adipoz doku (VAT) olan gonadal (GF) adipoz dokularındaki makromoleküllerin yapı ve içeriği karakterize edilmiştir. Detaylı lipit analizi HPLC tekniği ile yapılmıştır. FTIR spektroskopisi ve mikroskopisi ile doymuş ve doymamış lipit, protein, nükleik asit, kolajen, glikojen miktar ve yapısındaki değişimler, doymamış ve doymuş yağ, lipit ve protein oranı gibi molekül miktarları arasındaki oranlar, lipit zincir uzunluğundaki ve protein ikincil yapısındaki değişimler araştırılarak ırklara ve cinsiyete göre farklılıklar belirlenmiştir. Detaylı lipit analizinde trigliserit, digliserit, kolesterol, monogliserit ve fosfatidilkolin, HPLC ile tanımlanan ve miktarları ölçülen lipitlerdir.

Adipoz dokularda, fakat özellikle dişi ve erkek fare IF adipoz dokusunda lipit peroksidasyon varlığını gösteren bir parametre olan düşük doymamış lipit oranı BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en düşük olarak gözlenmiştir, Bunlara ilaveten, en yüksek lipit/protein oranının da BFMI860 ve BFMI861 ırklarının gonadal ve inguinal adipoz dokularında bulunduğunu göstermektedir. HPLC sonuçları BFMI 860 ve 861 modellerinin BFMI 852 ve BFMI 856 modellerine göre daha fazla lipit, özellikle TG, C ve MG lipitlerini içerdiğini göstermiştir.

Kahverengi adipoz doku (BAT) ve beyaz adipoz doku (WAT) oranlarındaki değişimler tespit etmek amacıyla UCP-1 antikolarıyla (Ab) boyanmış örnekler ışık mikroskobu ile ve

FTIR mikrospektroskopisi metodu ile incelenmiştir. Genel olarak BFMI ırklarda kontrol (DBAJ) gruba göre UCP1 proteini miktarı dolayısıyla BAT oranının azaldığı ve yerini WAT'a bıraktığı görülmektedir. İnguinal ve gonadal dokular karşılaştırıldığında gonadal dokularda BAT miktarının inguinal dokulara oranla daha fazla olduğu görülmüştür. İnguinal dokularda ise yoğun olarak WAT'a rastlanmıştır. Erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenirken, dişi bireylerde ise yoğun olarak WAT gözlenmiştir. Gonadal dokular incelendiğinde, yine ırkı erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir fakat bu oran inguinal dokulara göre daha azdır. Genel olarak BFMI860 ve BFMI861 ırklarına ait hem gonadal hem inguinal dokularda daha fazla WAT olduğu nispeten BFMI852 ve BFMI856 ırklarının daha çok BAT içerdiği görülmüştür fakat bu oran DBAJ (kontrol) ırkına oranla oldukça azdır. BAT fenotipi, obezite ve diyabet gibi rahatsızlıkların önlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmalarımızda BFMI860 ve BFMI861 ırklarında BAT miktarının çok az olduğu, aksine yoğun olarak WAT'a sahip olduğu görülmüştür. BFMI860 ve BFMI861 ırklarında görülen bu değişim bu ırkların obeziteye ve Tip-2 diyabete daha yatkın olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, proje kapsamında yapılan QRT-PCR çalışmaları sonucunda dişi ve erkek fare IF ve GF adipoz dokularında leptin miktarları kat kat yüksek tespit edilmiştir. Özellikle, BFMI861 ırkında dişi ve erkek fare IF ve GF adipoz dokularının tümünde çok yüksek bir artış tespit edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda özellikle BFMI861 ırkında leptin direnci geliştiği, bu hayvanlarda obezitenin yeni gelişmeye başladığı ve bu ırkta bu hastalığın etkilerinin daha şiddetli görülüyor olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yapılan protein ikincil yapı analizi çalışmalarında, elde edilen protein ikincil yapılarındaki değişimler hem erkek hem de dişi bireylerde gonadal ve inguinal dokularda beta katlamalı miktarda azalma ve random coil miktarda artışın olduğunu göstermiştir ki bu da özellikle inguinal dokularda obeziteye bağlı proteinlerde bozulma (denatürasyon) olduğunu göstermektedir. Söz konusu bozulma en çok BFMI860 ırkında gözlenmiştir. Projede incelenmiş olan adipoz dokularda protein ikincil yapılarında meydana gelebilecek değişimlerin tespit edilmesi, makromoleküler yapı ve fonksiyonlardaki değişimlerin belirlenmesi BFMI farelerinde kendiliğinden gelişen obezitenin fenotipik karakterizasyonu için gereklidir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, projede incelenen karmaşık genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle insanlarda da görülen ve kendiliğinden gelişen obeziteye model oluşturan inbred fare ırklarından BFMI860 ve BFMI 861 ırklarının obezite çalışmalarına daha uygun oldukları belirlenmiştir. Hem ATR-FTIR hem de HPLC sonuçlarının gösterdiği üzere BFMI 860 ve BFMI 861 ırklarında özellikle trigiserit ve kolesterol oranları en çok artışı

için, insilün direnci geliştirdikleri sonucuna varılabilir. Bu sonuçlar da bize ayrıca bu ırkların obezite - tip 2 diyabet çalışmalarında da kullanılabileceğini göstermektedir.

Yaptığımız bu çalışmaların devamı ve geliştirilmesi açısından ileride daha detaylı lipit araştırmalarına imkan veren kütle spektroskopisi ile lipit analizi yapılabilir. Bu tip çalışmalarda örnek sayısının çok olması dolayısı ile daha büyük bir bütçe gerektireceği ve merkezi laboratuvarlardaki cihazların vereceği kısıtlı zamanlarda 120-150 arasında örnekleri analiz etmenin biraz sorun yaratacağını ve proje süresinin uzayacağını göz önüne almak gerekir. Ayrıca bu projeden farklı olarak yüksek yağ içerikli diyetle beslenmiş önermiş olduğumuz ırk farelerle obezite ve tip 2 diyabet ilişkisi araştırmaları yapılabilir.

KAYNAKÇA

Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., White M.F., The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307, *J Biol Chem*, 275, 9047–9054, (2000).

Aksoy C , Guliyev A, Kilic E, Uckan D, Severcan F., Bone marrow mesenchymal stem cells in patients with beta thalassemia major: Molecular analyses with attenuated total reflection-fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy study as a novel method,. *Stem Cells Dev.*, 21(11), (2012).

Alo F., Brun P., Cont C., Gorgini E., Rubi C., Tosi G., Fourier Transform Spectroscopy,: *11th International Conference, The American Institute of Physics*, (1998).

Anastasiou CA, Kavouras S, Lentzas Y, Gova A, Sidossis LS, Melidonis A, Diabetes mellitus is associated with increased intramyocellular triglyceride, but not diglyceride, content in obese humans. *Metabolism* 58(11): 1636-13642, (2009).

Anfinsen C.B., Principles that Govern the Folding of Protein Chains, *Science*, 181 4096, 223-230, (1973).

Avalli A, Contarini G., Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD, *J Chromatogr A.*; 1071(1-2):185-90, (2005).

Ayre KJ, Phinney SD, Tang AB, Stern JS, Exercise training reduces skeletal muscle membrane arachidonate in the obese (fa/fa) Zucker rat, *J Appl Physiol.*, Nov;85(5):1898-902 (1998).

Awayda M.S., Shao W., Guo F., Zeidel M., Hill W.G., ENaC-membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order, *J. Gen. Physiol.*, 123, 709–727, (2004).

Azain M.J., Role of fatty acids in adipocyte growth and development, *J Anim Sci* 82, 916–924, (2004).

Banyay M., Sarkar M., Graslund A., A library of IR bands of nucleic acids in solution, *Biophysical Chemistry*, 104, 477–488, (2003).

Barak Y., Nelson M.C., Ong E.S., Jones Y.Z., Ruiz-Lozano P., Chien K.R., Koder A., Evans R.M., PPAR is required for placental, cardiac, and adipose tissue development, *Mol Cell* ,4, 585–595, (1999).

- Bayari S.H., Utku H., Ikemoto Y., Celasin B., Kömürcü M., Atik A., Synchrotron FTIR microspectroscopic analysis of necrotic bone, *Spectroscopy*, 21(4), 227-234, (2007).
- Bell C.G., Walley A.J., Froguel P., The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*, 6, 221–234, (2005).
- Benoit S.C., Kemp C.J., Elias C.F., Abplanalp W., Herman J.P., Migrenne S., Lefevre A.L., Cruciani Guglielmacci C., Magnan C., Yu F., Niswender K., Irani B.G., Holland W.L., Clegg D.J., Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents, *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 9, 2577-2589, (2009).
- Berg A.H., Scherer P.E., Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease, *Circ Res*, 96, 939–949, (2005).
- Bi, X., Yang, X., Bostrom, M.P.C., Camacho, N.P., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 934–941, (2006).
- Bizeau M.E., Salano J.M., Jeffrey R., Menhaden oil feeding increases lipolysis without changing plasma membrane order in isolated rat adipocytes, *Nutrition Research*, 20(11), 1633-1644, (2000).
- Blake C, ve Serpell L., Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix, *Structure*, 4, 989–998, (1996).
- Blake G.J., Ridker P.M., Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction, *J Intern Med*, 252, 283–294, (2002).
- Boden G., Free Fatty Acids The Link Between Obesity And Insulin Resistance, *Endocrine Practice*, 7, 44-51, (2001).
- Boskey A. ve Camacho N.P., FT-IR Imaging of Native and Tissue Engineered Bone and Cartilage, *Biomaterials*, 28, 2465-2478, (2007).
- Boyar H., Severcan F., Tamoxifen-Phospholipid Model Membrane Interactions: An FT-IR Study, *J. Molecular Structure*, 408/409, 265-268, (1997).
- Boyar H., Zorlu F., Mut M., Severcan F., The effects of chronic hypoperfusion on rat cranial bone mineral and organic matrix: A fourier transform infrared spectroscopy study, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (3), 433-438, (2004).

Bozkurt O., Bilgin M.D., Severcan F., The Effect of Diabetes Mellitus on Rat Skeletal Extensor Digitorum Longus Muscle Tissue: An FTIR Study, *Spectroscopy An Int. J*, 21(3), 151-160, (2007).

Bozkurt O., Severcan M., Severcan F., Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle, *Analyst*, 135(12):3, 110-9, (2010).

Bozkurt O., Bayari, SH , Severcan, M ; Krafft, C; Popp, J ;Severcan, F, Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium: Fourier transform infrared microspectroscopy and neural network study, *Journal of Biomedical Optics*, 17(7), (2012).

Brockmann G. A., Tsaih S. W., Neuschl C., Churchill G. A., Li R., Genetic factors contributing to obesity and body weight can act through mechanisms affecting muscle weight, fat weight, or both, *Physiol Genomics*, 36, 114–126, (2009).

Bruch R. C., Thayer W.S., Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes, *Biochim. Biophys. Acta*, 733, 216-222, (1983).

Bush A.K., Gurisik E., Cordery D.V., Sudlow M., Denyer G.S., Laybutt D.R., Hughes W.E., Biden T.J., Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis. *Diabetes*, 54, 2917–2924, (2005).

Cakmak G, Zorlu F, Severcan M, F. Severcan, Screening of protective effect of amifostine on radiation-induced structural and functional variations in rat liver microsomal membranes by FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 83 (7), 2438-2444 , (2011).

Cakmak G., Miller L.M., Zorlu F., Severcan F., Amifostine, a Radioprotectant Agent, Protects Rat Brain Tissue Lipids against Ionizing Radiation Induced Damage: An FTIR Microspectroscopic Imaging Study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, In press, 10.1016/j.abb.2012.02.012, (2012).

Cakmak G., Togan I., Severcan F., FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol, *Applied Spectroscopy*, 57 (7), 835-841, (2003).

Cakmak G., Togan I., Severcan, F., 17 β -estradiol induced compositional, structural and functional changes on rainbow trout liver, revealed by FTIR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol, *Aquatic Toxicology*, 77(1), 53-63, (2006).

Camacho N.P., Rinnerthaler S., Paschalis E.P., Mendelsohn R., Boskey A.L., Fratzl P., Complementary Information on Bone Ultrastructure from Scanning Small Angle X-ray Scattering and Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, *Bone*, 25, 287-293, (1999).

Camacho N.P., West P., Torzilli P.A., Mendelsohn R., FTIR Microscopic Imaging of Collagen and Proteoglycan in Bovine Cartilage, *Biopolymers*, 62(1), 1-8, (2001).

Cameron P.G., Charette G.M., Automation of Fourier Transform Infrared of Temperature-Induced Phenomena, *Appl. Spectrosc.*, 35, 224, (1981).

Cancello R., Zingaretti M.C., Sarzani R., Ricquier D., Cinti S., Leptin and UCP1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue, *Endocrinology*, 139, 4747e50, (1998).

Cannon B., Hedin A., Nedergaard J., Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue, *FEBS Lett*, 150,129–132, (1982).

Cannon B., Nedergaard J., Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84,277–359, (2004).

Casal H. L., Mantsch, H. H., Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy, *Biochim Biophys Acta*, 779, 381-401, (1984).

Charbonneau A., Unson C.G., Lavoie J.M., High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise, *J Physiol*, 579, 1, 255–267, (2007).

Chiriboga L., Yee H., Diem M., Infrared spectroscopy of human cells and tissue. Part VII: FT-IR microscopy of DNAase- and RNAase-treated normal, cirrhotic, and neoplastic liver tissue., *Appl Spectrosc.*, 54:480–5.v.d., (2000).

Chomczynski P, Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem.*, 162: 156-159, (1987).

Christie W.W., Detectors for High-Performance Liquid Chromatography of Lipids with Special Reference to Evaporative Light-Scattering Detection, *Advances in Lipid Methodology – One*, pp. 239-271, (1992).

Christie W.W., *High-performance Liquid Chromatography: Theoretical Considerations and Equipment*, *High-performance Liquid Chromatography and Lipids*, Pergamon Press, Oxford, (1987), pp. 12-23.

Christie W.W., *Lipids: Their Structures and Occurrence, High-performance Liquid Chromatography and Lipids*, Pergamon Press, Oxford, (1987), pp. 44-60.

Cinti S., *The adipose organ*, Milan, Kurtis, (1999).

Cinti S., The role of brown adipose tissue in human obesity, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Volume 16, Issue 8, (2006) , Pp 569-574.

Cortes V.A., Curtis D.E., Sukumaran S., Shao X., Parameswara V., Rashid S., Smith A.R., Ren J., Esser V., Hammer R.E., Agarwal A.K., Horton J.D., Garg A., Molecular mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance in the AGPAT2-deficient mouse model of congenital generalized lipodystrophy, *Cell Metab*, Feb, 9,2,165-76, (2009).

Curtis M.T., Gilfor D., Farber J.L, Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes, *Arch. Biochem.Biophys.*, 35, 644–649, (1984).

Deangelis R.A., Markiewski M.M., Taub R., Lambris J.D., A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappa B inhibitor, I kappa B alpha, *Hepatology*, 42,1148-1157, (2005).

Descalzo A.M., Insani E.M., Pensei N.A., Light-Scattering Detection of Phospholipids Resolved by HPLC, *Lipids*, 38, no. 9, 999-1003, (2003).

Diem M., Boydston-White S., Chiriboga L., Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject, *Applied Spectroscopy*, 53, 148A-161A., (1999).

Diem M., Chalmers J.M., ed: Griffiths P.R., *Vibrational spectroscopy for medical diagnosis*, John Wiley & Sons Ltd, Pp. 158-165, (2008).

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sens SL, Kathuria S, and Piomelli D, Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *PNAS* vol. 99 no. 16 10819-10824, (2002).

Dogan A., Ergen K., Budak F., Severcan F., Evaluation of Disseminated Candidiasis on an Experimental Animal Model: An FTIR Study, *Applied Spectroscopy*, 61,2, 199-203,(2007).

Duane WC, Cholesterol metabolism in familial hypertriglyceridemia: Effects of obesity versus triglyceride level, *J of Laboratory and Clinical Medicine* 130 (6): 635-642, (1997)

- El-Haschimi K., Pierroz D.D., Hileman S.M., Bjorbaek C., Flier J.S., Two Defects Contribute to Hypothalamic Leptin Resistance in Mice with Diet-induced Obesity, *J. Clin. Invest.*, 105,1827–1832, (2000).
- Fantuzzi G., Adipose tissue, adipokines, and inflammation, *J Allergy Clin Immunol*, 115, 911–919, (2005).
- Fernandez D.C., Bhargava R., Hewitt S.M., Levin I.W., Infrared spectroscopic imaging for histopathological recognition., *Nat Biotechnol*, 23(4), 469-474, (2005).
- Ferranti S., Mozaffarian D., The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences, *Clinical Chemistry*, 54,6 945–955, (2008).
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissue, *J. Biol. Chem*, No. 226, 497-509, (1957).
- Freifelder D., Applications to biochemistry and molecular biology, Physical Chemistry, Freeman Press, W. H. (Ed), New York, (1982), pp. 145.
- Fruchbeck G., Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders, *Methods Mol Biol.*,456,1-22, (2008).
- Fruchbeck G., Vasoactive factors and inflammatory mediators produced in adipose tissue, *Nutrition and Health*, 2007, (2006), pp 63-77.
- Fukuyama Y., Yoshida S., Yanagisawa S., Shimizu M., A Study on the Differences Between Oral Squamous Cell Carcinomas and Normal Oral Mucosae Measured by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biospectroscopy*, 5, 117-126, (1999).
- Funaki M., Saturated Fatty Acid and Insulin Resistance, *The Journal of Medical Investigation*, 56, (2009).
- Furler S.M., Oakes N.D., Watkinson A.L., Kraegen E.W., A high-fat diet influences insulin-stimulated posttransport muscle glucose metabolism in rats, *Metabolism*, 46, 1101–1106, (1997).
- Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome *J Clin Invest*. 2004 Dec,114(12), 1752-61, (2004).

- Garip S., Gozen A.C., Severcan F., Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates, *Food Chemistry*, 113(4), 1301-1307, (2009).
- Garip Ş., Severcan F., Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (2010) 580–588.
- Gazi E., Baker M., Dwyer J., Lockyer N.P., Gardner P., Shanks J.H., Reeve R.S., Hart C.A., Clarke N.W., Brown M.D., A correlation of FTIR spectra derived from prostate cancer biopsies with gleason grade and tumor stage, *European Urology*, 50: 750-761, (2006).
- Gedik O. , Obezite ve Çevresel Faktörler, *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, Suppl. 2, 1-4, (2003).
- Gerich J.E., Contributions of Insulin-Resistance and Insulin-Secretory Defects to the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus, *Mayo Clin Proc*, 78, 447–456, (2003).
- Gesta S., Tseng Y.H., Kahn C.R., Developmental origin of fat: tracking obesity to its source, *Cell*, 19, 131, 2, 242-56, (2007).
- Goodpaster B.H., Wolf, D., Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes, *Pediatric Diabetes*, 5: 219-226, (2004).
- Gorgulu T. S., Dogan M., Severcan F., A Novel Method In The Characterization of Higher Plants: FTIR Spectroscopic Study of Ranunculus, Acantholimon and Astragalus, *Applied Spectroscopy*, 61(3), 300-308, (2007).
- Gough K.M., Zelinski D., Wiens R., Rak M., Dixon I.M.C., Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT1 suppression, *Analytical Biochemistry*, 316, 232-242, (2003).
- Greenberg AS, Obin MS., Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism, *Am J Clin Nutr.*, Feb;83(2):461S-465S (2006).
- Griebe M., Daffertshofer M., Stroick M., Syren M., Ahmad-Nejad P., Neumaier M., Backhaus J., Hennerici M.G., Fatar M., Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease, *Neurosci Lett*, 420(1), 29-33, (2007).

Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P, Localization of the Insulin Receptor in Caveolae of Adipocyte Plasma Membrane, *FASEB J* 13: 1961-1971, (1999).

Han D.H., Nolte L.A., Ju J.S., Coleman T., Holloszy J.O., Semenkovich C.F., UCP-mediated energy depletion in skeletal muscle increases glucose transport despite lipid accumulation and mitochondrial dysfunction, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E347–E353, (2004).

Hantschel C, Wagener A, Neuschl C, Teupser D, Brockmann GA, Features of the metabolic syndrome in the Berlin Fat Mouse as a model for human obesity, *Obes. Facts.*, 4(4):270-7, (2011).

Haris P. ve Severcan F., FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *J. Molecular Catalysis: B (Enzymatic)*, 7, 207-221, (1999).

He W, Barak Y., Hevener A., Olson P., Liao D., Le J., Nelson M., Ong E., Olefsky J.M., Evans R.M., Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 15712–15717, (2003).

Hevener A.L., Febbraio M.A., Stock Conference Working Group, The Inflammation, Obesity and Metabolic Disease obesity reviews, 2009 Stock Conference Report: (2009).

Hirosumi J., Tuncman G., Chang L., Gorgun C.Z., Uysal K.T., Maeda K., Karin M., Hotamisligil G.S., A Central Role for Jnk in Obesity and Insulin Resistance, *Nature*, 420, 333–336, (2002).

Hotamisligil G.S., Inflammatory pathways and insulin action, *International Journal of Obesity*, 27, S53–S55, (2003).

Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M., IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α and Obesity-Induced Insulin Resistance, *Science* 271,665– 668, (1996).

Hotamisligil G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M., Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, 259, 87–91, (1993).

Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S, Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones, *Nutr Metab* 7:47 (2010).

Iverson S.J., Lang L.C.S., Cooper M.H., Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue, *Lipids*, 36, no. 11, 1283-1287, (2001).

Ivkovic-Lazar T., Development and differentiation of adipose tissue, *Med Pregl.*, 56, 3-4, 142-5, (2003).

Jackson M., Ramjiawan B., Hewko M., Mantsch H. H., Infrared microscopic functional group mapping and spectral clustering analysis of hypercholesterolemic rabbit liver, *Cell. Mol. Biol.*, 44(1), 89-98, (1998).

Jaroniec C.P., MacPhee C.E., Bajaj V.S., McMahon M.T., Dobson C.M., Griffin R.G., High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 711–716, (2004).

Kahn B.B., Flier J.S., Obesity and insulin resistance, *The Journal of Clinical Investigation*, 106:4, 473-481, (2000).

Kahn S.E., Hull R.L., Utzschneider K.M., Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, 444, 840–846, (2006).

Kanety H., Hemi R., Papa M.Z., Karasik A., Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1, *J. Biol. Chem.*, 271, 9895–9897, (1996).

Karatayev O, Gaysinskaya V, Chang G-Q, Leibowitz SF, Circulating triglycerides after a high-fat meal: Predictor of increased caloric intake, orexigenic peptide expression, and dietary obesity., *Brain Research* 1298: 111-122 (2009).

Karlsson M., Mårild S., Brandberg J., Lonn L., Friberg P., Strandvik B., Serum Phospholipid Fatty Acids, Adipose Tissue, and Metabolic Markers in Obese Adolescents, *Obesity*, 14, 11, (2006).

Kazarian S. ve Chan K., Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(7): 858-867, (2006).

Kidder R., Ziegler C., Wessels J.M., γ -Irradiation and UV-C light-induced lipid peroxidation: A Fourier transform-infrared absorption spectroscopic study, *Int. J. Radiat. Biol.*, 71(5), 561-571, (1997).

- Kim S., Sohn I., Ahn J., Lee K., Lee Y.S., Lee Y.S., Hepatic gene expression profile in long-term high-fat diet-induced obesity mouse model, *Gene*, 340, 99–109, (2004).
- Klaus S., Casteilla L., Bouillaud F., Ricquier D., The uncoupling protein UCP: a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue, *Int J Biochem*, 23,791, e801, (1991).
- Kneipp J., Lasch P., Baldauf E., Beekes M., Naumann D., Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, *BBA*, 1501, 189-199, (2002).
- Koutnikova H., Cock T.A., Watanabe M., Houten S.M., Champy M.F., Dierich A., Auwerx J., Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 14457–14462, (2003).
- Koza R. A., Nikonova L., Hogan J., Rim J.S., Mendoza T., Faulk C., Skaf J., Kozak L.P., Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice, *PLoS Genetics*, 2, 5, 769-780, (2006).
- Krafft C., Sergo V., Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues, *Spectroscopy*, 20, 195–218, (2006).
- Krafft C., Steiner G., Beleites C., Salzer R., Disease Recognition by Infrared and Raman Spectroscopy, *J. Biophoton*. 2, 1-2, 13-28, (2009).
- Kretlow, A., Wang, Q., Beekes, M., Naumann, D., and Miller, L. M., Changes in protein structure and distribution observed at pre-clinical stages of scrapie pathogenesis, *Biochimica et biophysica acta*, 1782(10): 559-565, (2008).
- Kuhlmann J., Neumann-Haefelin C., Belz U., Kramer W., Jureschke H.P., Herling A.W., Correlation between insulin resistance and intramyocellular lipid levels in rats, *Magnetic Resonance in Medicine*, 53: 6, 1275–1282, (2005).
- Lee D.C., Haris P. I., Chapman D., Mitchell C. R., Determination of protein secondary structure using factor-analysis of infrared spectra, *Biochemistry*, 29 (1990) 9185-9193.
- Lee K., Shin J., Latshaw J. D., Suh Y., Serr J., Cloning of adipose triglyceride lipase complementary deoxyribonucleic acid in poultry and expression of adipose triglyceride lipase during development of adipose in chickens, *Poult Sci.*, 88: 620-630, (2009).

Lefterova M.I. ve Lazar M.A., New developments in adipogenesis, *Trends Endocrinol Metab.*, 20:3,107-14, (2009).

Leskovjan A.C., Kretlow A., Miller L.M., Fourier transform infrared imaging showing reduced unsaturated lipid content in the hippocampus of a mouse model of Alzheimer's disease. *Anal Chem*, 82, 2711-2716, (2010).

Lin S.Y., Li M.J., Cheng W.T., FTIR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biondiagnosis of human tissues, *Spectroscopy*, 21:1-30, (2007).

Lin Y., Berg A.H., Iyengar P., Lam T.K., Giacca A., Combs T.P., Rajala M.W., Du X., Rollman B., Li W., Hawkins M., Barzilai N., Rhodes C.J., Fantus I.G., Brownlee M., Scherer P.E., The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species, *J Biol Chem.*, 280(6), 4617-26, (2005).

Liquier J. , Taillandier E., Infrared spectroscopy of nucleic acids, *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, Inc., USA, (1996), pp. 131-158.

Liu K.Z., Jackson M., Sowa M.G., Haisong J.U., Dixon I.M.C., Mantsch H.H., Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)- Mol. Basis. Dis.*, 1315:2, 73-77, (1996).

Liu K.Z., Bose R., Mantsch H.H., Infrared spectroscopic study of diabetic platelets, *Vibrational Spectroscopy*, 28, 131–136, (2002).

Loviscach M., Rehman N., Carter L., Mudaliar S., Mohadeen P., Ciaraldi T.P., Veerkamp J.H., Henry R.R., Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action, *Diabetologia*, 43, 304–311, (2000).

Luneva O.G., Brazhe N.A., Maksimova N.V., Rodnenkov O.V., Parshina E.Yu., Bryzgalova N.Yu., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I., Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: Role of augmented plasma cholesterol, *Pathophysiology*, 14, 41–46, (2007).

Lyman D.J., Murray-Wijelath J., Vascular graft healing: I.FTIR analysis of a implant model for studying the healing of a vascular graft, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, 48, 172-186, (1999).

Mantsch H.H., Biological application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A study of phase transitions in biomembranes, *J. Mol. Structure*, 113, 201-212, (1984).

Marette A., Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5, 377–383, (2002).

Mayes JS and Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 5: 197–216, (2004).

Melin A., Perromat A., Deleris G., Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: in vivo toxicity of carbon tetrachloride on rat liver, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 57, 160–168, (2000).

Melin A.M., Perromat A., Gerard D., Sensitivity of deinococcus radiodurans to γ irradiation: A novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394, 265-274, (2001).

Mendelsohn R., Mantsch H.H., Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction, *Progress in Protein-Lipid Interactions*, Volume 2, Elsevier Science Publishers, Netherlands, 103-147, (1986).

Mendez V., Avelar E., Morales A., Cervantes M., Araiza A., Gonzalez D., A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet Mol Res*, 10: 3251-3255, (2011)

Meyer C.W., Wagener A., Rink N., Hantschel C., Heldmaier G., Klingenspor M., Brockmann G.A., High energy digestion efficiency and altered lipid metabolism contribute to obesity in BFMI mice, *Obesity (Silver Spring)*, 17:11, 1988-93, (2009).

Meyer T., Bergner N., Bielecki C., Krafft C., Akimov D., Romeike B.F.M., Reichart R., Kalff R., Dietzek B., Popp J., Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis, *J Biomed Opt*, 16(2), 021113, (2011).

Mohamed-Ali V., Pinkney J.H., Coppack S.W., Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ, *Int J Obes Relat Metab Disord.*, Dec, 22, 12, 1145-58, (1998).

Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I.U., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues, *Appl Spectrosc Rev*, 43: 134-179, (2008).

Murdolo G, Smith U, The dysregulated adipose tissue: A connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Volume 16, Supplement 1, Pp S35-S38, March 2006.

Musso G., Paschetta E., Gambino R., Cassader M., Molinaro F., Interactions among bone, liver, and adipose tissue predisposing to diabetes and fatty liver, *Trends Mol Med.*, 19(9):522-35, (2013).

Nawrocki A.R., Scherer P.E., Adipose tissue, adipokines, and inflammation, *Drug Discovery Today*, 10, 1219–1230, (2005).

Nedergaard J., Petrovic N., Lindgren E.M., Jacobsson A., Cannon B., PPAR in the control of brown adipocyte differentiation, *Biochim Biophys Acta*, 1740, 293–304, (2005).

Nguyen L.L., Kriketos A.D., Hancock D.P., Caterson I.D., Denyer G.S., Insulin Resistance Does Not Influence Gene Expression in Skeletal Muscle, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39, 457-463, (2006).

Nilsson M.R., Techniques to study amyloid fibril formation in vitro, Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: *Experimental and Theoretical Methods*, 34:1, 151–160, (2004).

Nissen-Meyer L.S., Svalheim S., Taubøll E., Gjerstad L., Reinholt F.P., Jemtland R., How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies, *Seizure*, 17(2), 187-91, (2008).

Olsson P., Holmback J., Herslof B., Separation of Lipid Classes by HPLC on a Cyanopropyl Column, *Lipids*, no. 47, 93-99, (2011).

Ong K. R., Sims A. H., Harvie M., Chapman M., Dunn W. B., Broadhurst D., Goodacre R., Wilson M., Thomas N., Clarke RB., Howell A., Biomarkers of dietary energy restriction in women at increased risk of breast cancer, *Cancer Prev Res (Phila)*, 2: 720-731, (2009).

Ozbalci D., Şahin M., Leptin ve İmmün sistem, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg*, 14, 2, 51-55, (2007).

Ozek N.S., Sara Y., Onur R., Severcan F., Low dose Simvastatin induces compositional structural and dynamical changes on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue, *Bioscience Reports*, 6; 30(1), 41-50, (2009).

- Ozek N.S., Tuna S., Erson-Bensan A.E., Severcan F., Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy, *Analyst*, 135(12), 3094-3102, (2010).
- Pan D.A. ve Storlien L.H., Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats, *J Nutr.*, 123(3), 512-9, (1993).
- Pelton J.T. ve Mclean L.R., Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure, *Analytical Biochemistry*, 277:2, pp. 167-176, (2000).
- Perona J. S., Portillo M.P., Macarulla M.T., Tueros A.I., Ruiz-Gutierrez V., Influence of dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue, *Br. J. Nutr.*, 84, 765–774, (2000).
- Perona J.S., Ruiz-Gutierrez V., Quantitative Lipid Composition of Iberian Pig Muscle and Adipose Tissue by HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, no. 28, 2445-2457, (2005).
- Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A., Amyloid fibers are water-filled nanotubes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 5591–5595, (2002).
- Pfaffl M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acid Research*, 29, (2001).
- Phillips M.S., Liu Q., Hammond H.A., Dugan V., Hey P.J., Caskey C.J., Hess J.F., Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat Genet.*, 13(1), 18–19, (1996).
- Pike JL, The challenge of lipid rafts, *J of Lipid Research*, 323-328 (2009).
- Pinnick K.E., Collins S.C., Londos C., Gauguier D., Clark A., Fielding B.A., Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition, *Obesity (Silver Spring)*, 16, 3, 522-30, (2008).
- Puigserver P., Ribot J., Serra F., Gianotti M., Bonet M.L., Nadal-Ginard B., Palou A., Involvement of the retinoblastoma protein in brown and white adipocyte cell differentiation: functional and physical association with the adipogenic transcription factor C/EBP, *Eur J Cell Biol*, 77, 117–123, (1998).
- Qiu L., List E.O., Kopchick J.J., Differentially expressed proteins in the pancreas of diet-induced diabetic mice, *Mol Cell Proteomics*, 4, 9, 1311-8, (2005).

Rabe K., Lehrke M., Parhofer K.G., Broedl U.C., Adipokines and insulin resistance, *Mol Med.*, Nov-Dec, 14, 11-12, 741-51, (2008).

Raclot T., Oudart H., Net release of individual fatty acids from white adipose tissue during lipolysis in vitro: evidence for selective fatty acid re-uptake, *Biochem. J.* 348, 129–136, (2000).

Raclot T., Selective mobilization of fatty acids from white fat cells: evidence for a relationship to the polarity of triacylglycerols, *Biochem. J.*, 322, 483–489, (1997).

Ramesh J., Kapelushnik J., Mordehai J., Moser A., Huleihel M., Erukhimovitch V., Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy, *Journal of biochemical and biophysical methods*, 51, 251-261, (2002).

Rask-Madsen C. ve King G.L., Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes, *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3:1, 46–56, (2007).

Razani B., Engelman J.A., Wang X.B., Schubert W., Zhang X.L., Marks C.B., Macaluso F., Russell R.G., Li M., Pestell R.G., Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities, *J. Biol. Chem.*, 276, 38121-38138, (2001).

Reaven G.M., Role of Insulin Resistance in Human Disease, *Diabetes*, 37:12, 1595-1607, (1988).

Restuccia D., Spizziri U.G., Puoci F., Cirillo G., Vinci G., Picci N., Determination of Phospholipids in Food Samples, *Food Reviews International*, 28, 1-46, (2011).

Rigas B., Morgellot S., Goldman I.S., Wong P.T.T., Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra, *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 87, 8140-8144, (1990).

Rodeheffer M.S., Birsoy K., Friedman J.M., Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo, *Cell.*, 17,135, 2, 240-9, (2008).

Ros D.P., Vona-Davis L., Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression, *Endocrine-Related Cancer*, 14, 2, 189-206, (2007).

Schulman G.I., Cellular mechanisms of insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, 106, 171-176, (2000).

Sears I.B., MacGinnitie M.A., Kovacs L.G., Graves R.A., Differentiation dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor, *Mol Cell Biol*, 16, 3410–3419, (1996).

Sethi, J.K., Hotamisligil G.S., The role of tumor necrosis factor alpha in adipocyte metabolism, *Semin. Cell Dev. Biol.* 10:19–29, (1999).

Severcan F., Vitamin E decreases the order of the phospholipid model membranes in the gel phase: An FTIR study, *Bioscience Reports*, 17, 231-235, (1997).

Severcan F., Toyran N., Kaptan N., and Turan B., FTIR study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C-H region, *Talanta*, 53, 55-59, (2000).

Severcan F., Kaptan N., Turan B., FTIR spectroscopic investigation of diabetic rat heart crude membranes, *Spectroscopy, an Int J*, 17, 569-577, (2003).

Severcan F., Gorgulu G., Gorgulu T.S., Guray T., Rapid monitoring of Diabetes-Induced Lipid peroxidation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, 339, 36-40, (2005a).

Severcan F., Sahin I., Kazanci N., Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes--evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Biochim Biophys Acta.*, 1668(2):215-22 (2005b).

Severcan F., Bozkurt O. (eds), Li-Chan E., Chalmers J.M., Griffiths P.R., *Application of vibrational spectroscopy to investigate radiation-induced changes in food*, in *Application of vibrational spectroscopy in food science*, John Wiley & Sons Ltd, Pp. 75-94, (2010).

Severcan F., Bozkurt O., Gurbanov R., Gorgulu G., FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model, *J. Biophoton.* 3, no 8–9: 621–631, (2010).

Severcan F., Haris P.I. (eds), *Applications of Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening*, IOS Press, Amsterdam, Netherlands, Pp. 105-9 (2012).

Severcan, M., Severcan, F. and Haris, P.I., Estimation of Protein Secondary Structure from FTIR Spectra Using Neural Networks. *"Journal of Molecular Structure"*, 565-566, p.383-387, (2001).

Severcan M., Severcan F., Haris, I.P., Using artificially generated spectral data to improve protein secondary structure prediction from FTIR spectra of proteins, *Analytical Biochemistry*, 332 (2), 238-244, (2004).

Soto C., Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy, *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)*, 498, 204-207, (2001).

Steppan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A., The hormone resistin links obesity to diabetes, *Nature*, 18;409(6818), 307-12, (2001).

Storlien L.H., Hulbert A.J., Else P.L., Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 1 (6): 559-563, (1998).

St-Pierre J, Lemieux I, Miller-Felix I, Prud'homme D, Bergeron J, Gaudet D, Nadeau A, Despres JP, Vohl MC. Visceral obesity and hyperinsulinemia modulate the impact of the microsomal triglyceride transfer protein -493G/T polymorphism on plasma lipoprotein levels in men. *Atherosclerosis*. Feb;160(2):317-2, (2002).

Stuart B., Biological Applications of Infrared Spectroscopy. *John Wiley and Sons, Ltd.*, England, (1997).

Stuart P., Weisberg, McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W. Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.*, 112, 1796-1808, (2003).

Summers, L. K., Barnes, S. C., Fielding, B. A., Beysen, C., Ilic, V., Humphreys, S. M. & Frayn, K. N., Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1470–1477, (2000).

Szalontai B., Nishiyama Y., Gombos Z., and Murata N., Membrane dynamics as seen by fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis PCC 6803*. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio, *Biochim Biophys Acta.*, 1509 409-419, (2000).

Takahashi H., French S.W., Wong P.T.T, Alterations in hepatic lipids and proteins by chronic ethanol intake: A high pressure Fourier transform infrared spectroscopic study on alcoholic liver disease in the rat, *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 15, 219–223, (1991).

Tanabe A., Matsuda M., Fukuhara A., Miyata Y., Komuro R., Shimomura I., Tojo H., Obesity causes a shift in metabolic flow of gangliosides in adipose tissues, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 547–552, (2009).

- Toyran N. ve SEVERCAN F., Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: An FTIR study, *Chemistry and Physics of Lipids*, 123, 165-176, (2003).
- Toyran N., Lasch P., Naumann D., Turan B., Severcan F., Early alterations in myocardial and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study, *Biochem J.*, 397, 3, 427-36, (2006).
- Toyran N., Severcan F., Interaction between vitamin D₂ and magnesium in liposomes: Differential scanning calorimetry and FTIR spectroscopy studies, *Journal of Molecular Structure*, 839 (1-3), 19-27, (2007).
- Toyran N., Severcan F., Severcan M., Turan B., Effects of selenium supplementation on rat heart apex and right ventricle myocardia by using FTIR spectroscopy: A cluster analysis and neural network approach, *Food Chemistry*, 110(3), 590-59, (2008).
- Trayhurn P., Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat, *Acta Physiol Scand*, 184, 285–293, (2005).
- Trayhurn P., Wood I.S., Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose Tissue, *Br J Nutr*, 92, 347–355, (2004).
- Tschöp M., Heiman M.L., *Overview of rodent models for obesity*, Research Curr Protoc Neurosci .Chapter 9: Unit 9.10, (2002).
- Vela M.E., Torres N., Tovar A.R., White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity, *Arch Med Res.*, Nov, 39, 8, 715-28, (2008).
- Umemura J., Cameron D.G., Mantsch H.H., A Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, *Biochim Biophys Acta.*, 16;602(1), 32–44, (1980).
- Wagener A., Schmitt A.O., Aksu S., Schlote W., Neuschl C, Brockmann G.A., Genetic, sex, and diet effects on body weight and obesity in the Berlin Fat Mouse Inbred lines, *Physiol Genomics*, 27, 264–270, (2006).
- Wang L., Mizaikoff B., Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1641–1654, (2008).

Wang J., Zhang G.J., Influence of membrane physical state on lysosomal potassium ion permeability, *Cell Biology International*, 29, 393-401, (2005).

Wang T.D., Triadafilopoulos G., Crawford J.M., Dickson L.R., Bhandari T., Sahbaie P., Friedland S., Soetikno R., Contag C.H., Detection of endogeneous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy, *PNAS*, 104(40): 15864-15869, (2007).

Watts A., De Pont J.J.H.H.M., Progress in protein–lipid interactions, vol. 2, Amsterdam, pp. 103–147, (1986).

Wellen K.E., Hotamisligil G.S., Inflammation, stress, and diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 5, 1111-1119, (2005).

West P.A., Bostrom P.G., Torzilli P.A., Camacho N.P., Fourier Transform Infrared Spectral analysis of degenerative cartilage: an infrared fiber optic probe and imaging study, *Applied Spectroscopy*, 58(4), 376-381, (2004).

Wong P.T.T., Wong R.K., Caputo T.A., Godwin T.A., Rigas B., Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 10988-10992 (1991).

Woods SC, Gotoh K, and Clegg DJ. Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med* 228: 1175–1180, (2003).

Xu B., Hu S.Q., Chu Y.C., Huang K., Nakagawa S.H., Whittaker J., Katsoyannis P.G., Weiss M.A., Diabetes-Associated Mutations in Insulin: Consecutive Residues in the B Chain Contact Distinct Domains of the Insulin Receptor, *Biochemistry*, 43, 8356-8372, (2004).

Xu H., Barnes T.G., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, 112:1821–1830 (2003).

Yano K., Sakamoto Y., Hirosawa N., Tonooka S., Katayama H., Kumaido K., Satomi A., Applications of Fourier transform infrared spectroscopy, Fourier transform infrared microscopy and near-infrared spectroscopy to cancer research, *Spectroscopy*, 17(2-3), 315-321, (2003).

Yeagle P.L. (ed), The structure of biological membranes, CRC Press, Florida, (2005). Pp. 98-110

Zechner R., Kienesberger P.C., Haemmerle G., Zimmermann R., Lass A., Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores, *Journal of Lipid Research*, Volume 50, (2009).

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman M.J., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, 372, 425 - 432 (1994).

EKLER

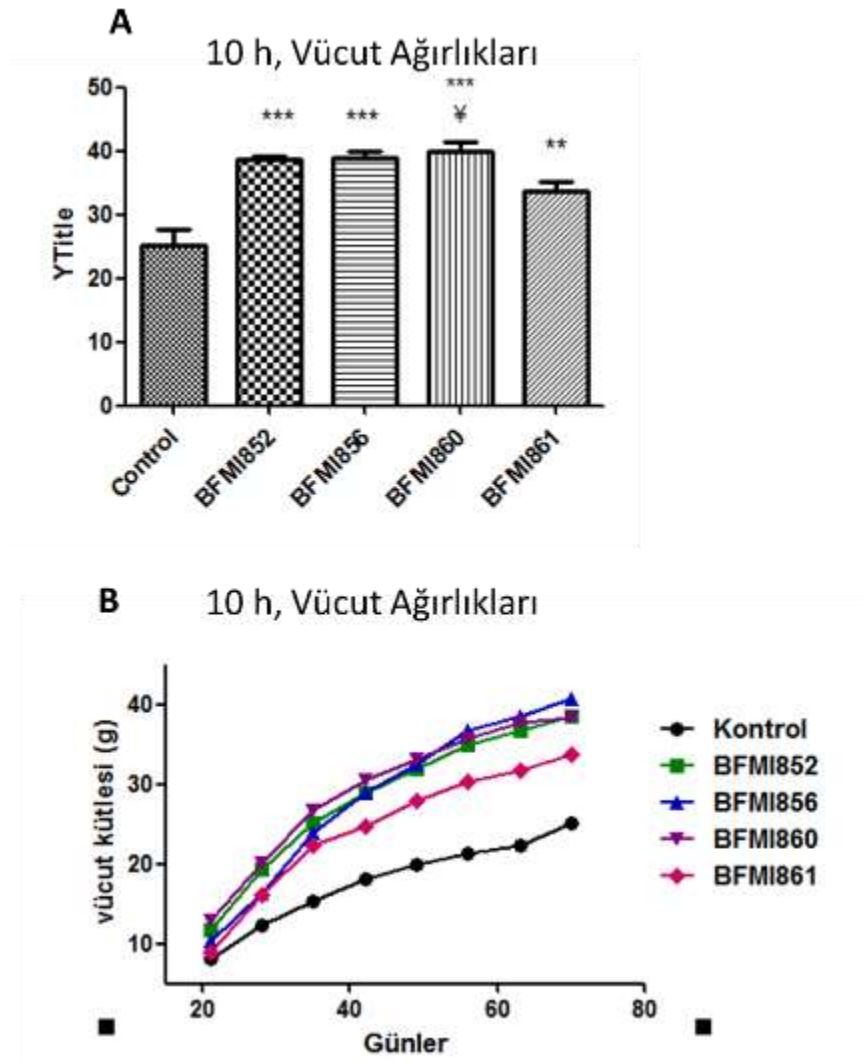
Ek 1. Fare ırklarının karakterizasyonu

- a) Fare ırklarının vücut ağırlıklarında görülen değişimler
- b) Fare ırkları serum parametreleri ve ipITT sonuçları

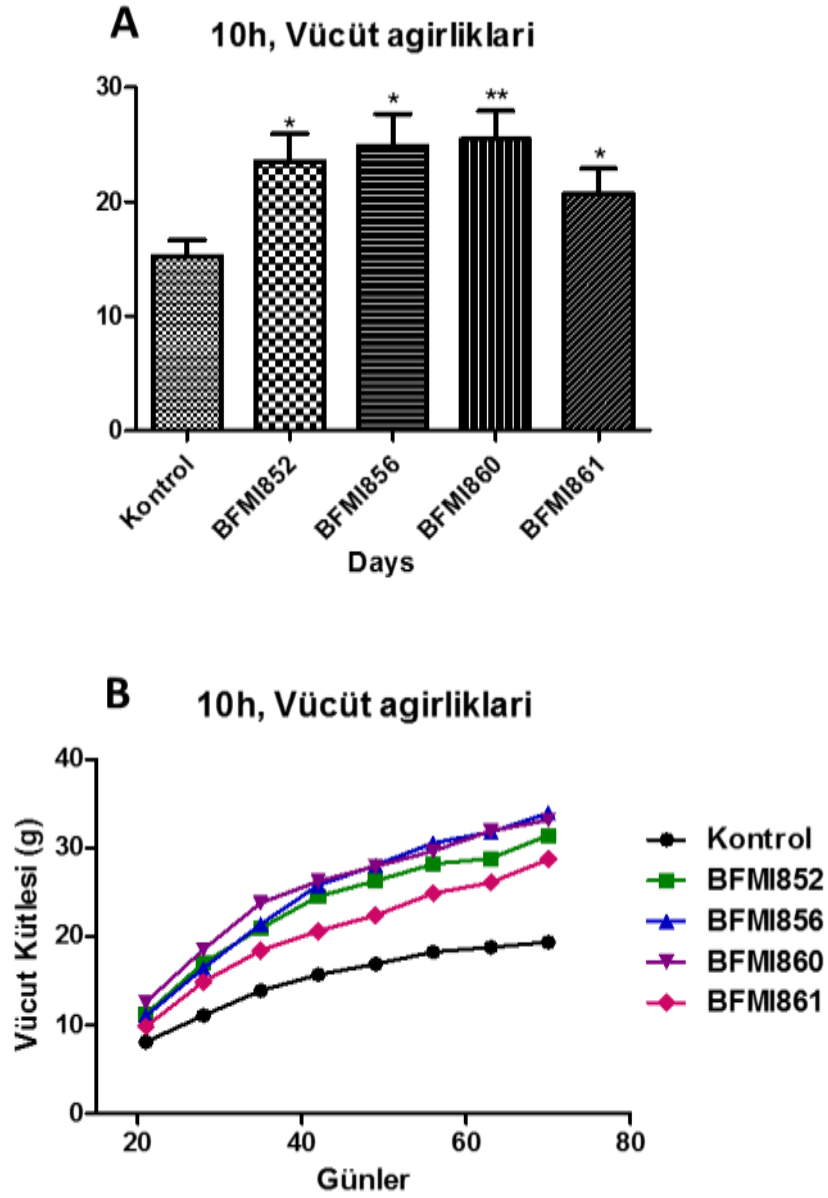
Yetiştirilen farelerin fenotipik karakterizasyonu için hayvanların vücut ağırlıkları düzenli aralıklarla izlenmiş, bazı kan serumu parametreleri (serum kan şekeri, insülin, leptin, adiponektin, kolesterol, esterifiye olmamış yağ asidi, trigliserit seviyeleri gibi) ölçümleri ve ipITT testi uygulanmıştır. Bu değerler ortaklaşa çalıştığımız Alman grubu tarafından hayvanların yetiştirilmesi sırasında ve ayrıca dekipasyondan 2 saat önce toplanan serumdan tayin edilmiştir.

Ek 1.1. Vücut ağırlıkları

Projede kullanılan farelerin vücut ağırlıkları değişimi Ek. 1 Şekil 1 ve 2'de görülmektedir. Şekil 1 ve 2 A'da 10 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, ve BFMI farelerin vücut ağırlığı değişimleri, Şekil 1 ve 2 B'de ise kontrol fareleri ile SBD ile beslenmiş BFMI farelerinin zaman içinde vücut ağırlıklarının değişimleri görülmektedir.



Ek 1. Şekil 1. 10 haftalık A) SBD ile beslenmiş kontrol, ve BFMi erkek farelerinin vücut ağırlıkları, B) SBD verilmiş kontrol, SBD verilmiş BFMi erkek farelerin değişik günlerde ölçülmüş vücut ağırlığı değişimleri.

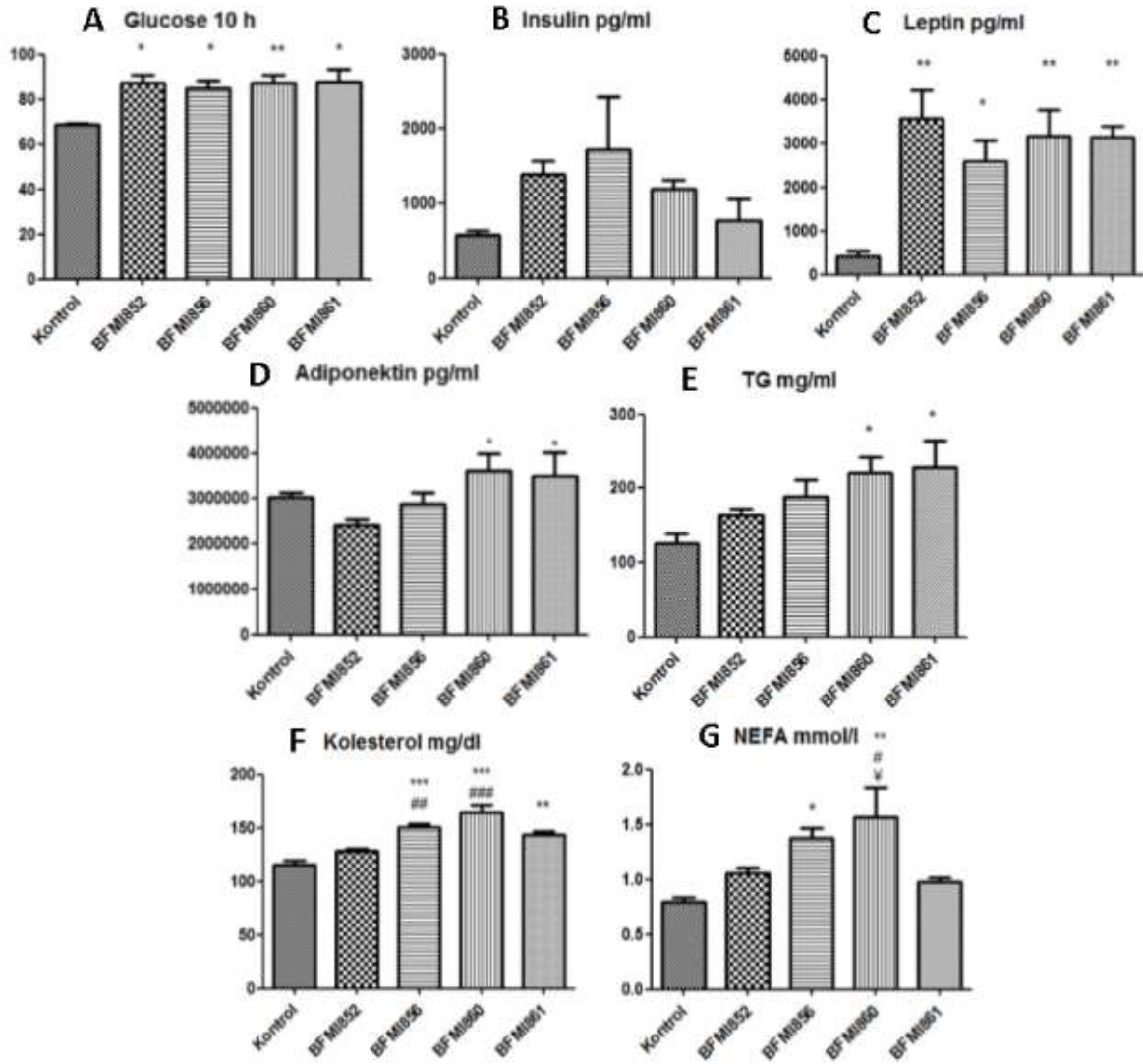


Ek 1. Şekil 2. 10 haftalık A) SBD ile beslenmiş kontrol, ve BFMI dişi farelerinin vücut ağırlıkları, B) SBD verilmiş kontrol, SBD verilmiş BFMI dişi farelerin değişik günlerde ölçülmüş vücut ağırlığı değişimleri.

Ek 1. Şekil 1 ve 2'de görüldüğü üzere, BFMI farelerinin vücut ağırlıkları kontrol farelere göre yüksektir. BFMI fareleri içerisinde de BFMI 860 hattı vücut ağırlığı en fazla olan ırk olarak bulunmuştur. En az artan ise BFMI 861 ırkıdır.

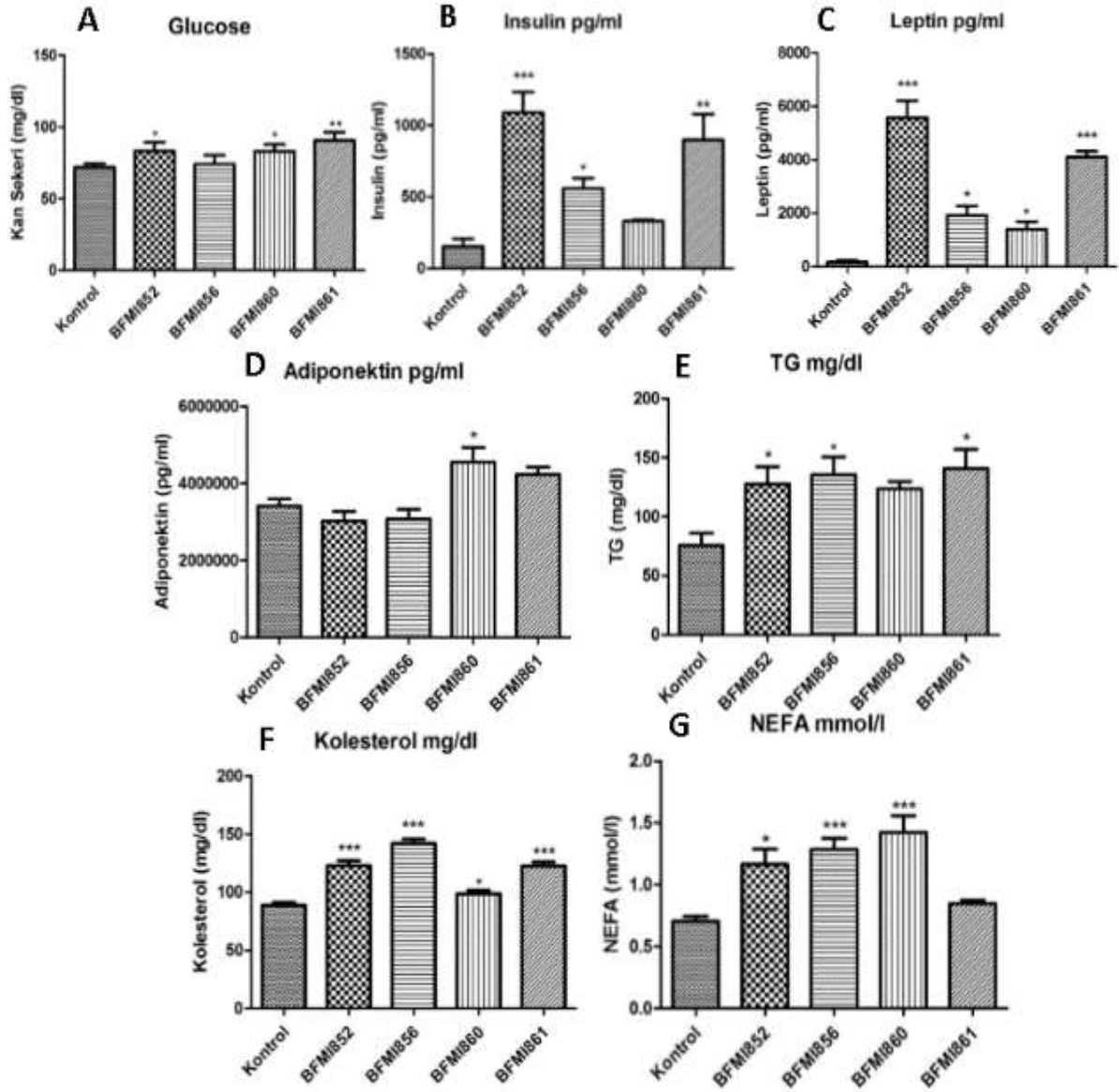
Ek 1.2. Serum parametreleri ve ipITT sonuçları

10 haftalık BFMI fareleri için serum parametreleri (glukoz, insulin, leptin, resistin, adiponektin, trigliserit (TG), kolesterol, esterifiye olmamış yağ asidi (NEFA) miktarları) ve intraperitoneal insulin duyarlılığı testi deneyleri projenin Alman ortağı Prof. Dr. Gudrun Brockmann'ın Humboldt Üniversitesi bünyesindeki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu ölçüm sonuçları Ek 1. Şekil 3 ve 4'te gösterilmektedir.



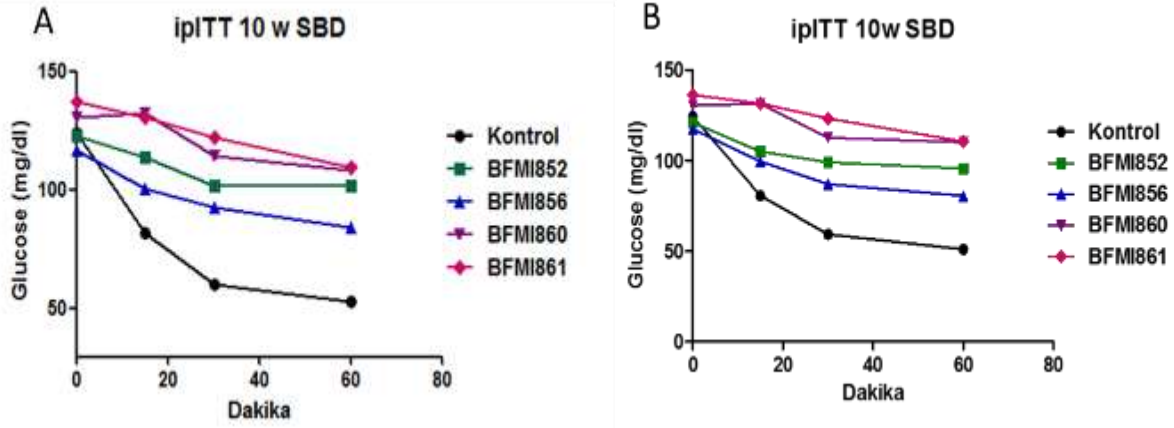
Ek 1. Şekil 3. 10 haftalık erkek fareler de serum parametreleri A) kan şekeri (glukoz) (mg/dl), B) insülin (pg/dl), C) leptin (pg/dl), D) adiponektin (pg/dl), E) trigliserit (TG, mg/ml), F)

cholesterol ve G) esterifiye olmamış yağ asidi (NEFA, mmol/l) miktarlarındaki değişimler. Kontrol ve BFMI ırkları SBD ile beslenmiştir.



Ek 1. Şekil 4. 10 haftalık dişi fareler de serum parametreleri A) kan şekeri (glukoz) (mg/dl), B) insülin (pg/dl), C) leptin (pg/dl), D) adiponektin (pg/dl), E) trigliserit (TG, mg/ml), F) kolesterol ve G) esterifiye olmamış yağ asidi (NEFA, mmol/l) miktarlarındaki değişimler. Kontrol ve BFMI ırkları SBD ile beslenmiştir.

Bu ek olarak incelenen erkek ve dişi fare ırklarındaki insülin duyarlılığı miktarını ölçmek için ipITT testi yapılmıştır, bu testin sonuçları Ek 1. Şekil 5 A ve B'de gösterilmektedir. Grafikte x ekseninde gösterilen zaman insülin enjeksiyonundan sonra ölçüm alınan zamanı göstermektedir.



Ek 1. Şekil 5. 10 haftalık erkek (A) ve dişi (B) kontrol ve BFMI hatlarının intra peritoneal insülin duyarlılığı testinin sonuçları.

Vücut ağırlığına benzer olarak glukoz, leptin, resistin, TG, kolesterol ve NEFA değerleri de BFMI 860 ve 861 ırklarında diğer ırklara oranla daha fazla gözlenmiştir. Yüksek miktarda Glukoz, TG ve NEFA, bu ırklarda insülin direncinin geliştiğine işaretler. Bunlara ek olarak, BFMI 860 ve BFMI 861 hatlarının insülin enjeksiyonuna daha geç cevap verdikleri görülmüştür. İnsülin direnci gelişen hayvanlarda bu durum görülebilmektedir. ipITT testinde hayvanlar 2 saat aç bırakılıp insülin vurulmaktadır ve sonra kandan glikoz temizlemesine bakılmaktadır. Ek 1. Şekil 3'ten görüleceği üzere elde edilen 10 haftalık SBD ile beslenmiş farelerin ipITT test sonuçlarına göre, insülin enjeksiyonundan sonra kan şekeri değerinde kontrol fareleri, BFMI fareleri ile karşılaştırıldığında daha hızlı bir düşüş gösterdikleri tespit edilmiştir. SBD verilmiş 10 haftalık farelerin ipITT grafikleri de en yüksek kan şekeri değerlerinin BFMI860 ve BFMI861 ırklarında gözlendiğini ortaya koymuştur (Ek 1. Şekil 5). Tüm bu grafiklerden, BFMI ırklarında insülin enjeksiyonuna verilen cevabın kan şekeri seviyelerinin daha yavaş düşüşü şeklinde olduğu görülmüştür. Bu da insülin duyarlılığında bir azalma gösterdiklerine işaret etmektedir. Bu ırklar içerisinde insülin direnci geliştirmeye en yakın ırklar ise BFMI860 ve BFMI861 ırklarındır. ipITT değerlerinde gözlenen bu sonuçlar, ölçülen serum parametreleri ile birlikte göz önüne alındığında da BFMI860 ve BFMI861 ırklarının insülin direnci gelişimi göstermiş olabilecekleri sonucuna varılmaktadır. BFMI856 ırkının ise insüline daha duyarlı olduğu görülmektedir.

Ek 2.

Yapılan analizler sonucu elde edilen dişi ve erkek farelerde obez ve kontrol grubu GF ve IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen başlıca fonksiyonel grupların frekans, bant alanı, bant genişliği ve bant alan oranı değerlerindeki değişimler.

Tablo 1. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

GF Dişi Frekans (cm ⁻¹)	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	3009,11 \pm 0,14	3008,73 \pm 0,22	3008,96 \pm 0,15	3009,22 \pm .17	3009,10 \pm 0,09
2957	2957,75 \pm 0,04	2957,59 \pm 0,04	2957,35 \pm 0,06**↓	2957,5 \pm 0,10	2957,67 \pm 0,08
2923	2923,66 \pm 0,23	2923,62 \pm 0,22	2923,1 \pm 0,22	2923,82 \pm 0,16	2923,78 \pm 0,21
2873	2873,16 \pm 0,03	2873,22 \pm 0,03	2873,13 \pm 0,03	2873,23 \pm 0,03	2873,20 \pm 0,03
2853	2853,72 \pm 0,07	2853,71 \pm 0,07	2853,53 \pm 0,07	285 ,77 \pm 0,05	2853,68 \pm 0,08
1743	1743,08 \pm 0,08	1742,93 \pm 0,10	1742,84 \pm 0,10	1742,87 \pm 0,22	1742,95 \pm 0,13
1642	1642,10 \pm 0,31	1641,72 \pm 0,24	1642,07 \pm 0,66	1641,93 \pm 0,43	1641,71 \pm 0,47
1551	1549,30 \pm 0,61	1550,78 \pm 0,22	1551,95 \pm 0,60	1550,59 \pm 0,35	1551,21 \pm 0,90
1457	1457,42 \pm 0,82	1456,37 \pm 0,07	1456,37 \pm 0,08	1456,30 \pm 0,19	1457,01 \pm 0,60
1416	1416,93 \pm 0,14	1416,71 \pm 0,12	1416,48 \pm 0,06	1416,61 \pm 0,18	1416,75 \pm 0,08
1400	1400,24 \pm 0,04	1400,84 \pm 0,29	1401,49 \pm 0,43	1400,46 \pm 0,44	1400,54 \pm 0,14
1377	1379,72 \pm 0,97	1378,64 \pm 0,79	1378,14 \pm 0,32	1378,94 \pm 0,98	1379,14 \pm 0,77
1366	1366,65 \pm 0,23	1366,78 \pm 0,18	1366,60 \pm 0,23	1366,63 \pm 0,34	1366,84 \pm 0,21
1345	1345,46 \pm 0,20	1345,78 \pm 0,16	1345,13 \pm 0,33	1344,97 \pm 0,41	1345,96 \pm 0,08
1280	1280,18 \pm 0,05	1280,21 \pm 0,08	1280,33 \pm 0,24	1280,34 \pm 0,06	1280,23 \pm 0,12
1235	1235,72 \pm 0,14	1236,23 \pm 0,33	1236,49 \pm 0,34	1236,29 \pm 0,68	1236,24 \pm 0,33
1158	1159,65 \pm 0,37	1158,55 \pm 0,27	1158,58 \pm 0,17	1159,38 \pm 0,80	1159,63 \pm 0,35
1118	1118,29 \pm 0,06	1118,04 \pm 0,05	1117,90 \pm 0,04**↓	1118,10 \pm 0,11	1118,11 \pm 0,05
1093	1091,56 \pm 0,72	1092,84 \pm 0,72	1092,94 \pm 0,83	1091,86 \pm 0,63	1092,31 \pm 0,49
1027	1028,28 \pm 0,72	1029,01 \pm 0,72	1027,48 \pm 0,83	1029,48 \pm 0,63	1029,71 \pm 0,49
970	970,16 \pm 0,78	970,64 \pm 0,45	969,52 \pm 1,06	970,37 \pm 0,88	970,64 \pm 0,70

Tablo 2. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

GF Erkek Frekans (cm ⁻¹)	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	3008,9 \pm 0,16	3009,22 \pm 0,08	3009,01 \pm 0,09	3009,13 \pm 0,13	3009,01 \pm 0,16
2957	2957,77 \pm 0,08	2957,57 \pm 0,06	2957,27 \pm 0,04***↓	2957,66 \pm 0,04	295 ,63 \pm 0,04
2923	2923,98 \pm 0,36	2923,18 \pm 0,14*↓	2922,95 \pm 0,19**↓	2923,33 \pm 0,12*↓	2923,14 \pm 0,06
2873	2873,18 \pm 0,05	2873,23 \pm 0,03	2873,11 \pm 0,05	2873,22 \pm 0,04	2873,19 \pm 0,03
2853	2853,92 \pm 0,16	2853,63 \pm 0,06	2853,58 \pm 0,11*↓	2853,68 \pm 0,04	2853,53 \pm 0,01*↓
1743	1743,04 \pm 0,06	1743,13 \pm 0,07	1743,05 \pm 0,08	1743,21 \pm 0,07	1743,15 \pm 0,06
1642	1642,22 \pm 0,52	1642,94 \pm 0,44	1642,67 \pm 0,58	1643,45 \pm 0,66	1643,04 \pm 0,27
1551	1550,58 \pm 0,71	1550,90 \pm 0,50	1552,78 \pm 1,25	1550,91 \pm 0,60	1551,97 \pm 0,47
1457	1457,87 \pm 0,87	1456,47 \pm 0,04	1456,42 \pm 0,12	1457,52 \pm 1,12	1457,74 \pm 0,71
1416	1416,79 \pm 0,10	1416,92 \pm 0,07	1416,56 \pm 0,21	1416,90 \pm 0,07	1416,90 \pm 0,06
1400	1400,41 \pm 0,52	1399,75 \pm 0,19	1398,49 \pm 0,77*↓	1399,74 \pm 0,14	1399,74 \pm 0,12
1377	1378,93 \pm 1,19	1377,50 \pm 0,32	1377,64 \pm 0,51	1377,14 \pm 0,24	1377,04 \pm 0,17
1366	1366,68 \pm 0,24	1366,10 \pm 0,21	1366,04 \pm 0,26	1365,86 \pm 0,35	1365,84 \pm 0,24
1345	1345,68 \pm 0,17	1345,78 \pm 0,17	1345,23 \pm 0,50	1345,48 \pm 0,36	1345,77 \pm 0,21
1280	1280,00 \pm 0,15	1280,06 \pm 0,09	1280,11 \pm 0,08	1279,70 \pm 0,07	1279,80 \pm 0,08
1235	1235,42 \pm 0,37	1235,22 \pm 0,21	1235,48 \pm 0,46	1235,04 \pm 0,22	1235,00 \pm 0,13
1158	1159,04 \pm 0,57	1158,51 \pm 0,29	1158,24 \pm 0,30	1158,03 \pm 0,13	1158,40 \pm 0,21
1118	1118,39 \pm 0,06	1118,23 \pm 0,07	1118,03 \pm 0,04***↓	1118,33 \pm 0,05	1118,16 \pm 0,05*↓
1093	1092,10 \pm 1,87	1094,61 \pm 0,69	1093,40 \pm 1,99	1095,25 \pm 0,64	1095,55 \pm 0,42
1027	1027,35 \pm 0,68	1026,73 \pm 0,60	1025,78 \pm 0,08	1027,84 \pm 0,73	1027,63 \pm 0,60
970	969,30 \pm 0,85	968,49 \pm 1,07	968,83 \pm 1,09	967,73 \pm 0,67	968,68 \pm 0,55

Tablo 3. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

IF Dişi frekans (cm ⁻¹)	Control	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	3009,47 \pm 0,38	3009,4 \pm 0,25	3008,72 \pm 0,23	3008,93 \pm 0,32	3009,15 \pm 0,21
2957	2958,31 \pm 0,10	2957,84 \pm 0,09* \downarrow	2957,70 \pm 0,15** \downarrow	2958,06 \pm 0,09	2957,91 \pm 0,07
2925	2926,33 \pm 0,64	2925,16 \pm 0,29	2925,82 \pm 0,77	2926,59 \pm 1,21	2925,33 \pm 0,39
2873	2873,36 \pm 0,06	2873,36 \pm 0,05	2873,26 \pm 0,06	2873,36 \pm 0,11	2873,21 \pm 0,08
2854	2854,69 \pm 0,30	2854,28 \pm 0,12	2854,55 \pm 0,30	2854,60 \pm 0,20	2854,19 \pm 0,20
1743	1735,55 \pm 4,06	1742,44 \pm 0,15	1740,84 \pm 1,63	1739,48 \pm 3,53	1742,51 \pm 0,16
1642	1639,57 \pm 0,30	1640,58 \pm 0,18	1640,57 \pm 0,19	1640,56 \pm 0,47	1640,53 \pm 0,22
1551	1550,15 \pm 0,44	1551,32 \pm 0,66	1552,48 \pm 0,47	1552,00 \pm 0,90	1551,70 \pm 0,48
1455	1453,89 \pm 0,24	1455,01 \pm 0,28	1454,95 \pm 0,39	1455,07 \pm 0,38	1455,10 \pm 0,43
1410	1407,99 \pm 0,00	1411,06 \pm 1,94	1412,42 \pm 1,51	1409,48 \pm 1,49	1412,84 \pm 1,61
1402	1403,23 \pm 0,21	1402,78 \pm 0,17	1403,04 \pm 0,29	1402,74 \pm 0,62	1402,08 \pm 0,49
1382	1384,91 \pm 0,24	1383,68 \pm 0,39	1382,93 \pm 0,89	1382,73 \pm 1,14	1383,36 \pm 0,93
1368	1369,04 \pm 0,20	1368,25 \pm 0,14	1367,95 \pm 0,26	1368,31 \pm 0,56	1367,93 \pm 0,38
1343	1340,99 \pm 0,00	1343,18 \pm 1,00	1343,53 \pm 0,83	1341,53 \pm 0,54	1343,27 \pm 1,02
1281	1282,77 \pm 0,17	1281,78 \pm 0,17	1281,60 \pm 0,36	1282,18 \pm 0,50	1281,59 \pm 0,42
1239	1239,41 \pm 0,15	1238,94 \pm 0,26	1239,07 \pm 0,33	1238,87 \pm 0,67	1238,56 \pm 0,49
1162	1189,73 \pm 8,19	1168,99 \pm 6,69	1168,45 \pm 6,92	1175,20 \pm 8,83	1175,28 \pm 8,74
1118	1118,57 \pm 0,13	1117,99 \pm 0,17* \downarrow	1118,33 \pm 0,17	1118,35 \pm 0,06	1118,25 \pm 0,08
1083	1082,21 \pm 0,29	1083,79 \pm 0,66	1084,33 \pm 1,10	1084,53 \pm 1,88	1085,27 \pm 1,26
1030	1031,97 \pm 0,04	1031,37 \pm 0,23	1030,61 \pm 0,35	1031,13 \pm 0,64	1031,62 \pm 0,33
971	971,81 \pm 0,09	971,82 \pm 0,19	972,00 \pm 0,23	971,42 \pm 0,65	971,73 \pm 0,25

Tablo 4. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

IF Erkek frekans (cm ⁻¹)	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
3009	3008,70 \pm 0,23	3008,86 \pm 0,18	3008,65 \pm 0,20	3008,96 \pm 0,21	3009,42 \pm 0,47
2957	2957,82 \pm 0,18	2957,89 \pm 0,33	2957,44 \pm 0,32*↓	2957,99 \pm 0,29	2957,85 \pm 0,16
2925	2925,36 \pm 0,08	2925,91 \pm 0,14	2925,56 \pm 0,13	2925,43 \pm 0,12	2925,22 \pm 0,06
2873	2873,32 \pm 0,55	2873,46 \pm 0,66	2873,13 \pm 0,71	2873,39 \pm 0,27	2873,2 \pm 0,40
2854	2854,32 \pm 0,05	2854,59 \pm 0,09	2854,82 \pm 0,12	2854,47 \pm 0,05	2854,29 \pm 0,05
1743	1742,72 \pm 0,31	1742,32 \pm 0,70	1742,14 \pm 0,41	1743,23 \pm 0,10	1742,91 \pm 0,17
1642	1640,89 \pm 0,25	1640,58 \pm 0,25	1640,87 \pm 0,29	1640,90 \pm 0,23	1641,14 \pm 0,20
1551	1551,64 \pm 0,46	1552,51 \pm 0,46	1552,36 \pm 0,34	1552,48 \pm 0,58	1553,14 \pm 0,45
1455	1455,88 \pm 0,86	1454,89 \pm 0,19	1454,75 \pm 0,42	1457,52 \pm 1,12	1455,63 \pm 0,23
1410	1410,49 \pm 1,36	1409,51 \pm 1,52	1411,87 \pm 1,80	1411,00 \pm 1,90	1413,76 \pm 1,84
1402	1402,81 \pm 0,41	1403,53 \pm 0,27	1403,74 \pm 0,47	1402,47 \pm 0,35	1401,92 \pm 0,41
1382	1382,71 \pm 0,83	1383,02 \pm 0,63	1382,54 \pm 0,81	1382,00 \pm 0,93	1381,16 \pm 0,97
1368	1368,27 \pm 0,43	1368,60 \pm 0,45	1368,34 \pm 0,36	1368,13 \pm 0,31	1367,58 \pm 0,22
1343	1341,66 \pm 0,67	1341,00 \pm 0,01	1342,48 \pm 0,95	1342,44 \pm 0,86	1343,21 \pm 0,99
1281	1282,07 \pm 0,34	1282,34 \pm 0,26	1282,15 \pm 0,46	1281,82 \pm 0,32	1281,33 \pm 0,31
1239	1239,07 \pm 0,43	1239,85 \pm 0,35	1239,69 \pm 0,53	1239,18 \pm 0,31	1238,97 \pm 0,41
1162	1169,27 \pm 6,69	1162,67 \pm 0,31	1175,23 \pm 8,73	1161,53 \pm 0,54	1161,22 \pm 0,57
1118	1118,36 \pm 0,07	1118,35 \pm 0,13	1118,24 \pm 0,13	1118,38 \pm 0,14	1118,26 \pm 0,07
1083	1084,73 \pm 1,24	1082,87 \pm 0,64	1083,69 \pm 1,32	1085,07 \pm 1,30	1087,11 \pm 1,43
1030	1031,61 \pm 0,31	1031,49 \pm 0,23	1030,60 \pm 0,35	1031,76 \pm 0,16	1031,61 \pm 0,32
971	971,75 \pm 0,30	972,23 \pm 0,16	972,27 \pm 0,24	972,20 \pm 0,32	971,37 \pm 0,17

Tablo 5. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant genişlik değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

GF Dişi Bant Genişliği	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
CH ₃ Asim. Ger.	14,76 \pm 0,46	14,21 \pm 0,72	14,20 \pm 0,83	14,14 \pm 0,94	14,00 \pm 1,03
CH ₂ Asim. Ger.	16,29 \pm 0,18	16,70 \pm 0,28	16,70 \pm 0,32	16,89 \pm 0,42	16,95 \pm 0,37
CH ₂ Sim. Ger.	10,18 \pm 0,07	10,25 \pm 0,09	10,20 \pm 0,10	10,27 \pm 0,12	10,19 \pm 0,08
Amid I	36,85 \pm 0,36	37,29 \pm 0,20	37,00 \pm 0,53	36,88 \pm 0,37	37,14 \pm 0,41
Amid II	28,12 \pm 1,56	33,35 \pm 1,23* \uparrow	32,88 \pm 1,65	29,45 \pm 0,78	32,19 \pm 1,42

Tablo 6. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu GF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant genişlik değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

GF Erkek Bant Genişliği	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
CH ₃ Asim. Ger.	14,15 \pm 0,93	14,61 \pm 0,27	13,54 \pm 0,77	14,41 \pm 0,31	14,33 \pm 0,22
CH ₂ Asim. Ger.	16,71 \pm 0,36	16,09 \pm 0,19	16,14 \pm 0,31	16,01 \pm 0,27	15,98 \pm 0,13
CH ₂ Sim. Ger.	10,34 \pm 0,16	10,08 \pm 0,06	10,14 \pm 0,15	10,07 \pm 0,08	9,97 \pm 0,03
Amid I	36,88 \pm 0,61	36,15 \pm 0,48	36,29 \pm 0,62	35,57 \pm 0,72	36,22 \pm 0,30
Amid II	31,47 \pm 1,96	32,44 \pm 1,38	34,53 \pm 0,61	32,19 \pm 1,45	34,69 \pm 0,98

Tablo 7. Dişi farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant genişlik değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

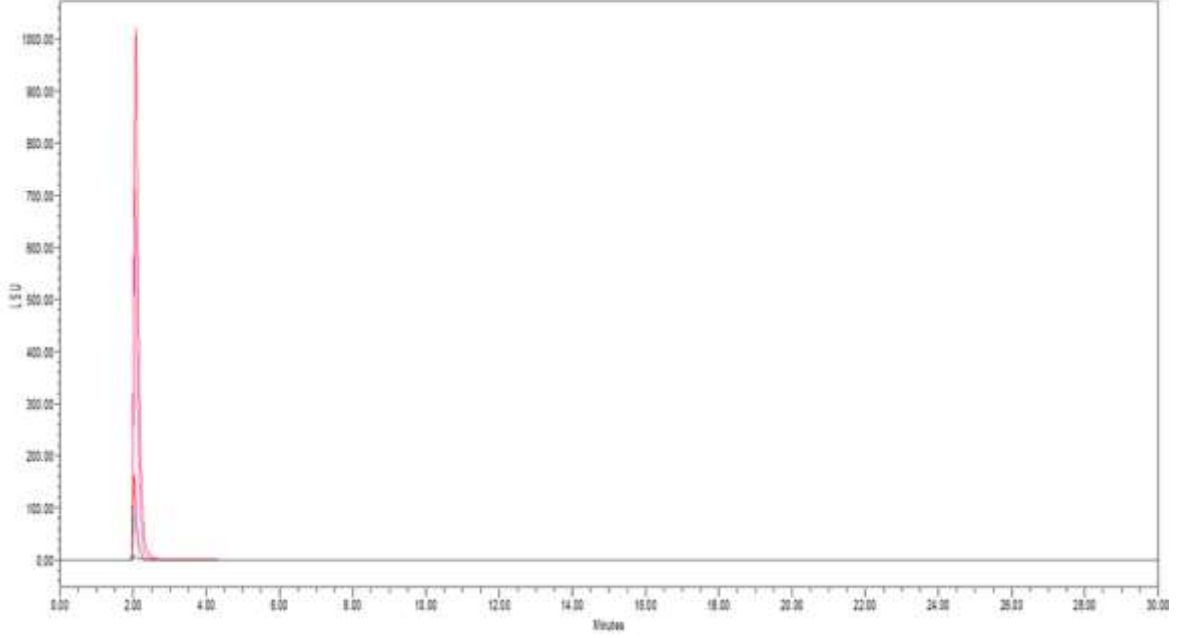
IF Dişi Bant Genişliği	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
CH ₃ Asim. Ger.	11,78 \pm 1,11	11,04 \pm 1,21	8,80 \pm 0,80	11,46 \pm 1,64	10,81 \pm 1,01
CH ₂ Asim. Ger.	19,08 \pm 0,87	18,16 \pm 0,31	19,40 \pm 1,10	20,31 \pm 2,45	18,43 \pm 0,32
CH ₂ Sim. Ger.	11,64 \pm 0,50	10,86 \pm 0,13	11,42 \pm 0,51	11,31 \pm 0,40	10,80 \pm 0,24
Amid I	38,37 \pm 0,09	38,46 \pm 0,15	38,55 \pm 0,06	38,46 \pm 0,42	38,60 \pm 0,15
Amid II	26,27 \pm 0,20	27,76 \pm 0,46	30,20 \pm 1,32	27,92 \pm 1,13	29,54 \pm 1,70

Tablo 8. Erkek farelerde obez ve kontrol grubu IF adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant genişlik değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

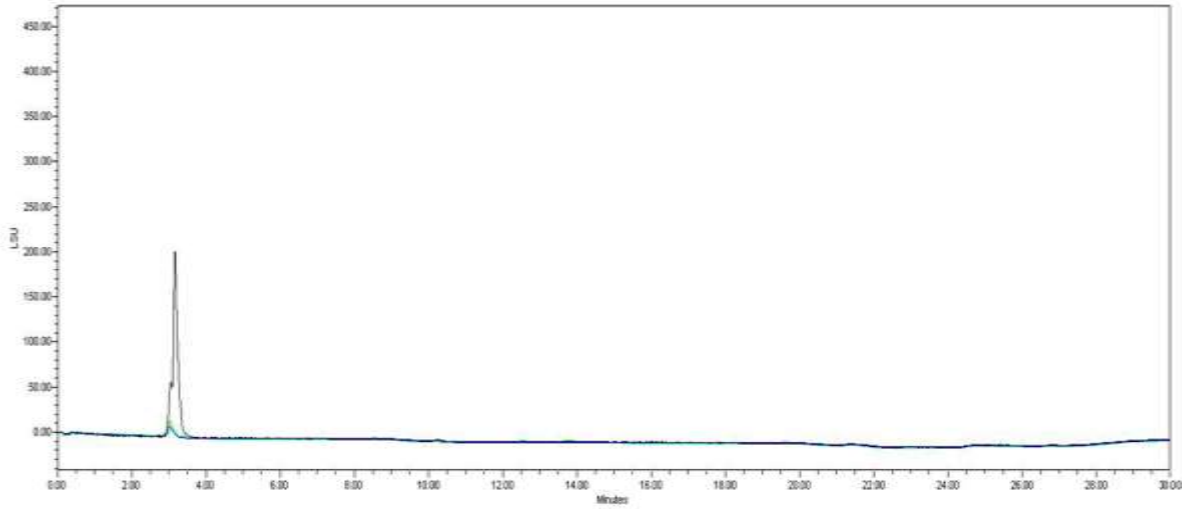
IF Erkek Bant Genişliği	Kontrol	BFMI 852	BFMI 856	BFMI 860	BFMI 861
CH ₃ Asim. Ger.	10,56 \pm 1,86	9,89 \pm 1,43	14,00 \pm 1,99	13,20 \pm 1,34	12,18 \pm 1,06
CH ₂ Asim. Ger.	18,05 \pm 0,77	19,33 \pm 1,10	19,23 \pm 1,00	17,85 \pm 0,42	18,15 \pm 0,52
CH ₂ Sim. Ger.	10,85 \pm 0,32	11,30 \pm 0,30	12,15 \pm 0,82	10,82 \pm 0,16	10,74 \pm 0,24
Amid I	38,87 \pm 0,31	39,04 \pm 0,16	38,86 \pm 0,22	38,89 \pm 0,21	38,71 \pm 0,21
Amid II	26,60 \pm 0,60	27,05 \pm 0,40	27,54 \pm 0,93	27,25 \pm 0,76	30,00 \pm 1,04* \uparrow

Ek 3. HPLC standartları ve kalibrasyonu

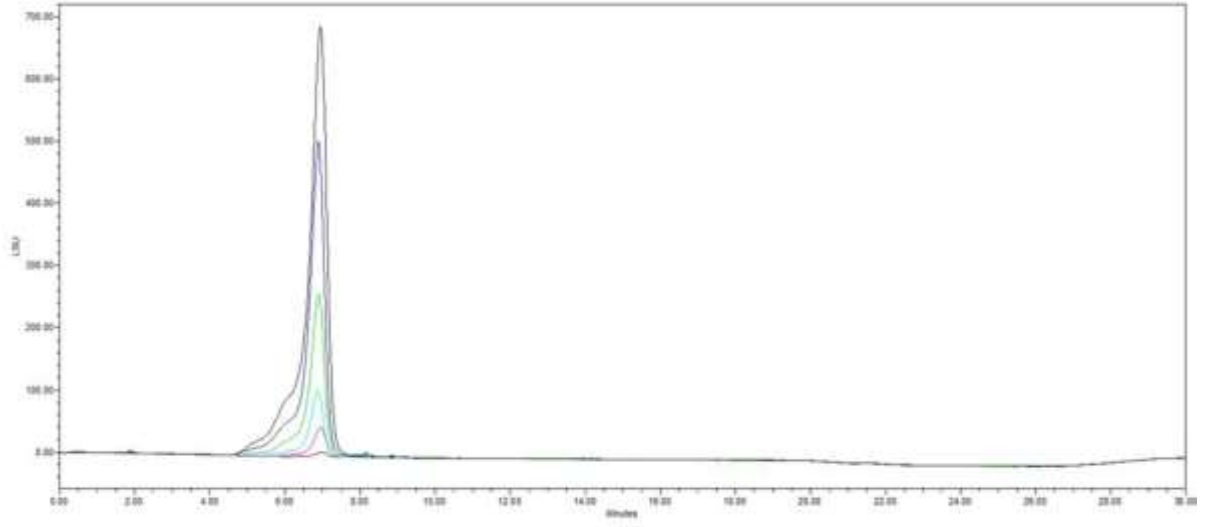
HPLC deneylerde kullanılan standartların elde edilen kromatogramları Ek 3 Şekil 1-5'te görülmektedir.



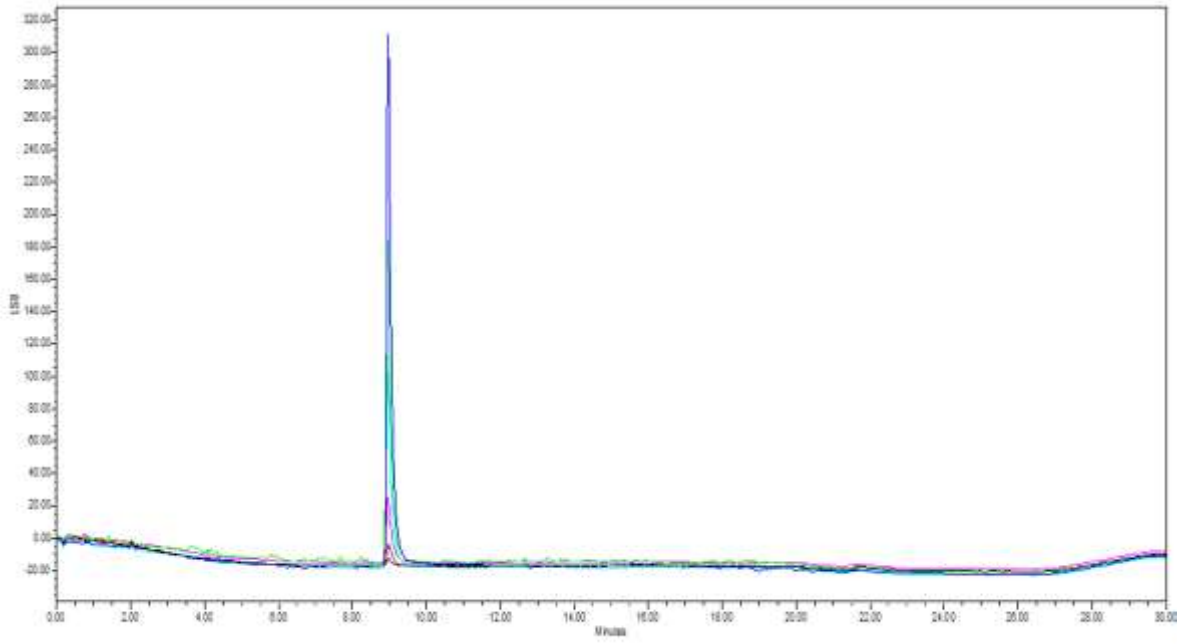
Ek3. Şekil 1. HPLC-ELSD gliseril trioleat kromatogram sonucu (Trigliserit, TG)



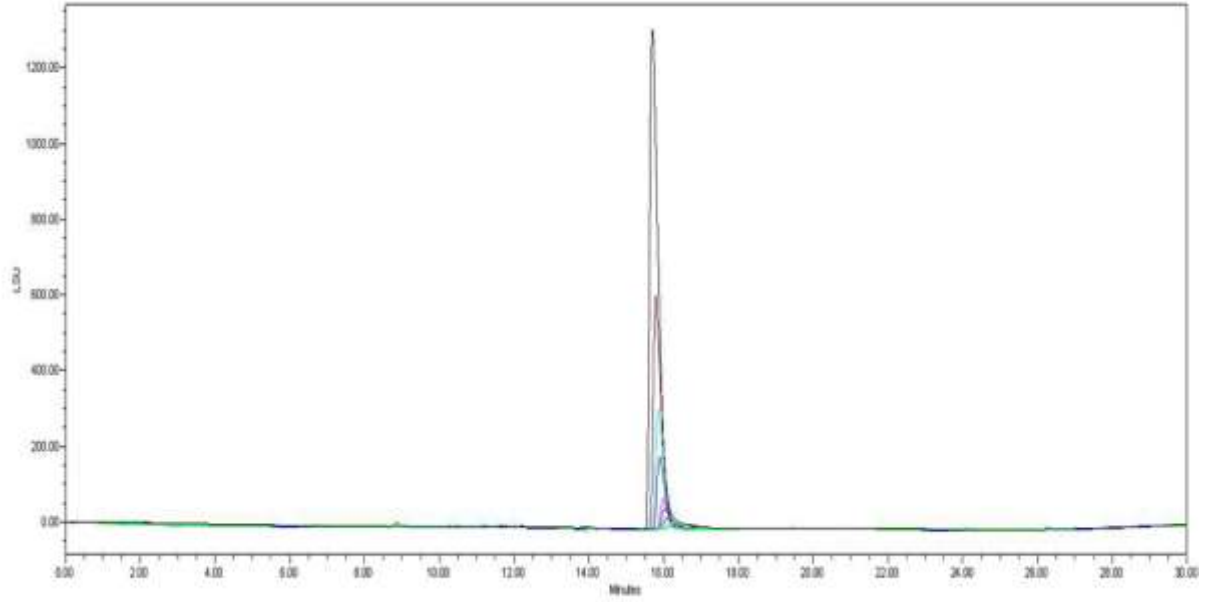
Şekil 2. HPLC-ELSD 1,2-dioleoil-sn-gliseroil kromatogram sonucu (Digliseroil, DG)



Şekil 3. HPLC-ELSD kolesterol kromatogram sonucu (C)



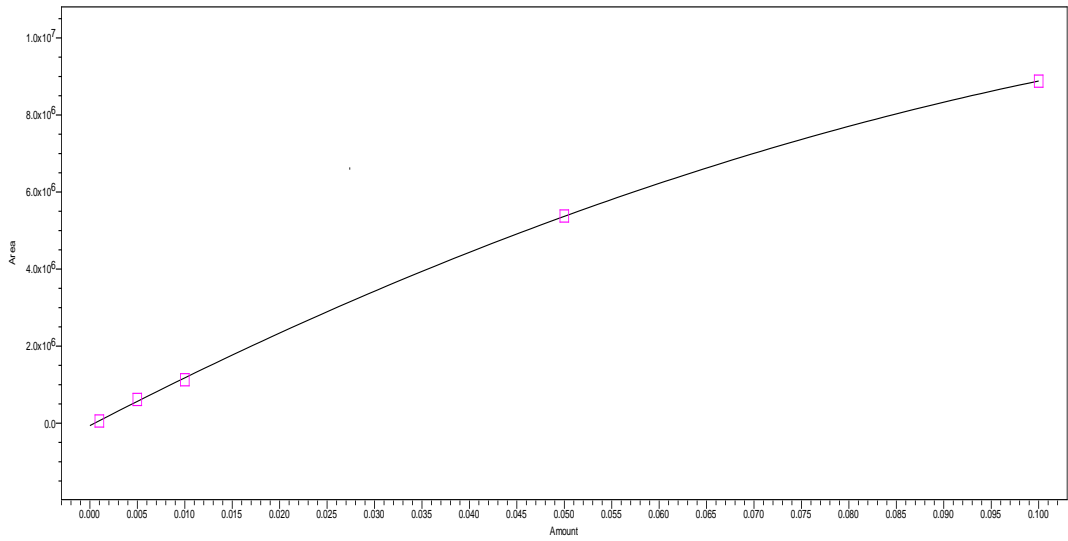
Şekil 4. HPLC-ELSD 1-oleil-rak-gliserol kromatogram sonucu (Monogliserit, MG)



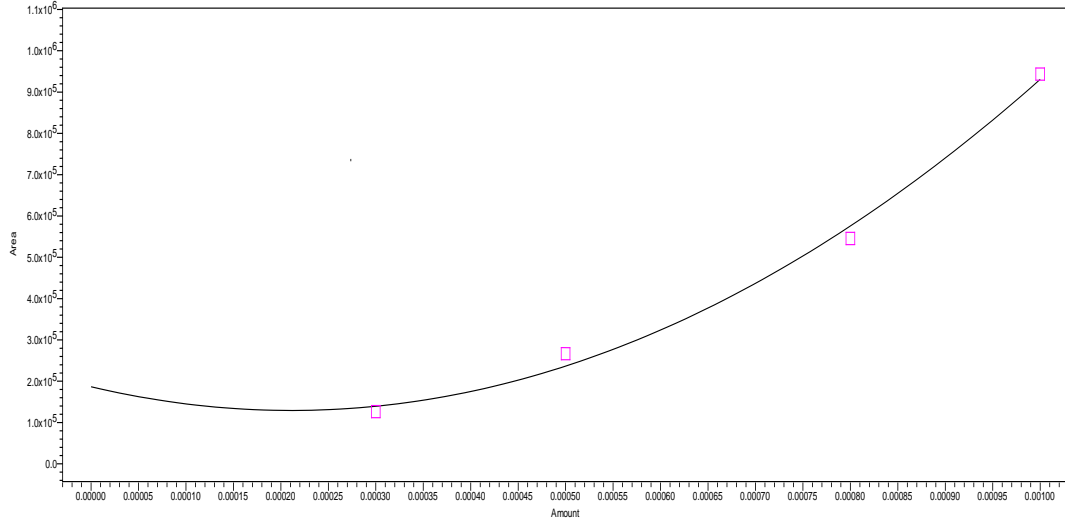
Şekil 5. HPLC-ELSD 90 fosfatidilkolin kromatogram sonucu (PC)

Kontrol ve BFMI inbred fare ırklarının dokularından elde edilen lipitlerin miktarını tayin edebilmek için, farklı konsantrasyonlarda yürütülen her bir standardın kalibrasyon eğrisi Waters Empower Pro adlı bilgisayar programı kullanılarak çizilmiştir.

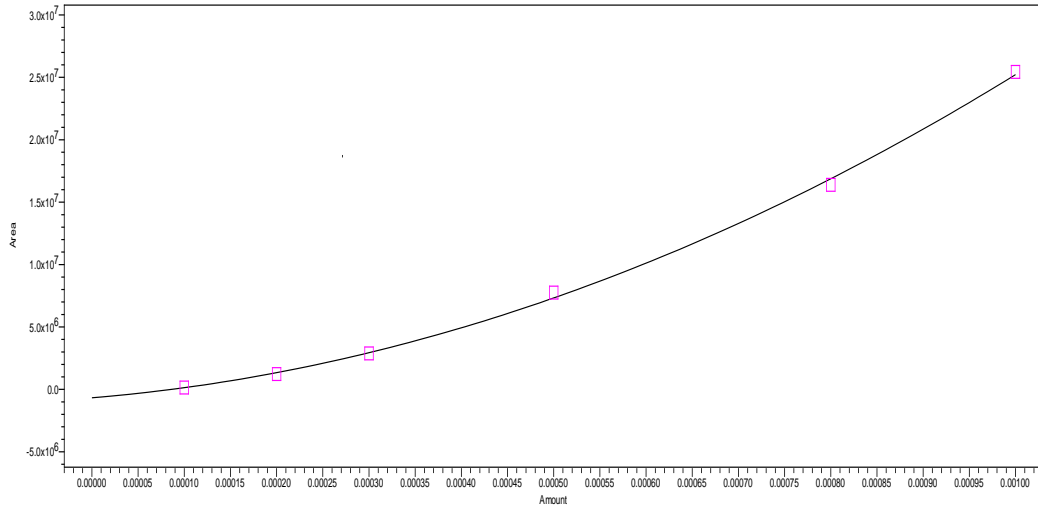
Deneylerde kullanılan bütün standartların belirleme katsayısı (R^2), uygun sınır değer olan 0.99'dan büyük çıkmıştır. Bu kalibrasyonun uyumluluğunu göstermektedir.



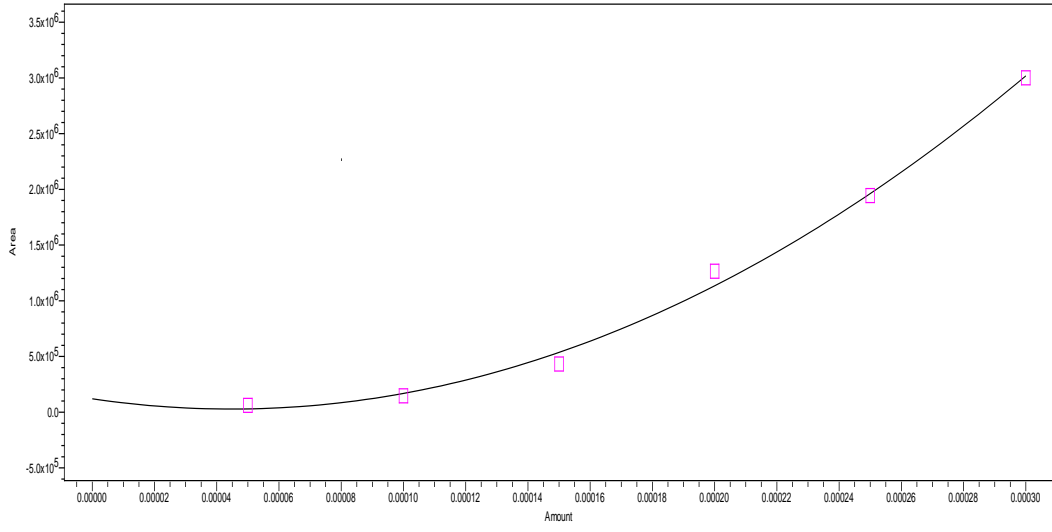
Şekil 6. Trigliserit'e ait kalibrasyon eğrisi ($R^2=0.999916$)



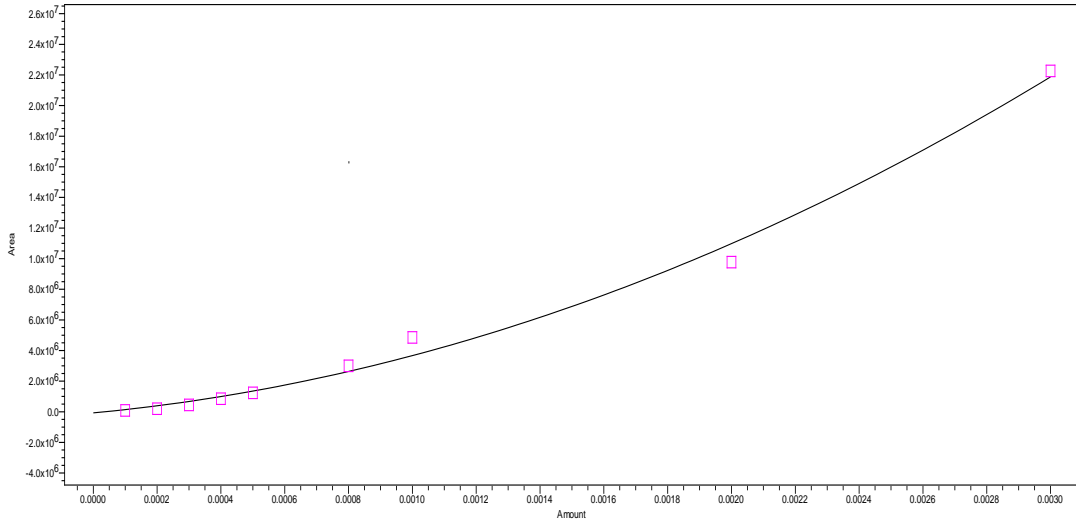
Şekil 7. Digliserit'e ait kalibrasyon eğrisi ($R^2=0.994517$)



Şekil 8. Kolesterol'e ait kalibrasyon eğrisi ($R^2=0.999048$)



Şekil 9. Monogliserit'e ait kalibrasyon eğrisi ($R^2=0.995599$)



Şekil 10. 90 Fosfatidilkolin'e ait kalibrasyon eğrisi ($R^2=0.992231$)

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. FERİDE SEVERCAN
Proje No:	110S235
Proje Başlığı:	İnbred obez fare modellerindeki değişik adipoz dokuların yapı, fonksiyon ve içeriğinin karakterizasyonu
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	SREEPARNA BANERJEE, METE SEVERCAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ODTÜ. FEN EDEBİYAT F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/02/2011 - 01/08/2013
Onaylanan Bütçe:	303670.0
Harcanan Bütçe:	279170.58
Öz:	<p>Obezitenin doku, hücre ve membran moleküllerinin yapısal ve fonksiyonel bozukluklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışma, obeziteye bağlı inguinal (IF) ve gonadal adipoz (GF) doku moleküllerinde yapısal ve içeriksel anlamda meydana gelen değişimleri incelemeyi ve böylece BFMI fare ırklarını karakterize ederek kendiliğinden oluşan obeziteyi daha iyi anlamayı amaçlamıştır. Bu amaç doğrultusunda, Azaltılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüşüm infrared (ATR-FTIR) spektroskopi ve FTIR mikrospektroskopi (FTIRM) teknikleri kullanılarak BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 (BFMI) ve kontrol (DBAJ) farelerinin IF ve GF dokularındaki moleküllerin yapı ve içeriği karakterize edilmiştir. Adipoz dokularda, özellikle IF dokusunda doymamış lipid oranı BFMI860 ve 861 ırklarında en düşük bulunmuştur; bu parametre lipid peroksidasyonunun varlığını göstermektedir. En yüksek lipid/protein oranı da bu ırklarda elde edilmiştir. Spektral değişimleri baz alarak kemometrik metodlarla bu ırklar kontrol (DBAJ) ve BMFI 852 ve 856 dan başarı ile ayrılmıştır. HPLC tekniği ile BFMI 860 ve 861 ırklarının diğer BFMI ırklarına göre daha fazla lipid, özellikle trigliserit, kolesterol ve monogliserit içerdiğini göstermiştir. Adipoz doku proteinlerinde ikincil yapıdaki değişimler araştırılmış ve BMFI ırklarında, en belirgin olarak da 860 ırkında, protein bozunmasına karşılık gelen düzensiz halka miktarında artış bulunmuştur.</p> <p>Histokimyasal ve FTIRM çalışmaları BFMI ırklarda kontrole göre kahverengi adipoz doku (BAT) oranının azaldığı ve yerini beyaz adipoz doku (WAT) ya bıraktığını göstermiştir. GF?de BAT miktarı IF'e oranla daha fazla gözlenirken, IF?de ise yoğun olarak WAT?a rastlanmıştır. Erkek bireylerde dişilere nazaran daha fazla BAT oranı gözlenmiştir. Genel olarak BFMI860 ve BFMI861 ırklarına ait GF ve IF dokularda daha fazla WAT olduğu ve çok az miktarda BAT olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, BFMI861 ırkında leptin direncinin en fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, kendiliğinden gelişen obeziteye model oluşturan inbred fare ırklarından BFMI860 ve BFMI861 farelerinin obezite çalışmalarına daha uygun oldukları belirlenmiştir.</p> <p>Sonuç olarak, adipoz dokuda obeziteden kaynaklanan etkinin cinsiyete, adipoz doku tipine ve ırklarda görülen farklılıklara bağlı olarak değiştiği saptanmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Obezite, Adipoz Doku , Inguinal, Gonadal, BFMI, WAT, BAT, FTIR, HPLC, UCP1, Leptin
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- İnbred obez fare modelleri adipoz dokularında C-H bölgesinin karakterizasyonu: ATR-FTIR spektroskopi çalışması (Bildiri), 2- Effect of obesity on different adipose tissues in inbred obese mouse models: An ATR-FTIR study (Bildiri), 3- İnbred obez fare modellerinde farklı adipoz dokuların karakterizasyonu (Bildiri), 4- OBESITY INDUCED ALTERATIONS ON STRUCTURE AND CONTENT OF LIPIDS IN ADIPOSE AND SKELETAL MUSCLE TISSUES IN INBRED OBESE MOUSE MODELS: A NOVEL ATR-FTIR STUDY (Bildiri)