

**Adipoz Dokuda Obezite İlişkili Tip 2 Diyabet Sonucu Görülen
Moleküler Değişimlerin Ve Palmitoleik Asitin Bu Değişimler
Üzerindeki Tedavi Edici Etkisinin Fourier Dönüşüm Kızılötesi
Mikrospektroskopisi İle İncelenmesi**

Program Kodu: 1002

Proje No: 115Z702

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Feride SEVERCAN

Araştırmacı:

Arş. Gör. Fatma KÜÇÜK BALOĞLU

AĞUSTOS 2016
ANKARA

ÖNSÖZ

Yüksek yağ oranlı diyetle indüklenmiş obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının subkütan ve viseral adipoz dokularda neden olduğu yapısal, fonksiyonel ve kompozisyonel değişimlerin Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile karakterize edilmesi ve sözkonusu değişimlerin palmitoleik asit tedavisi ile geri çevriminin söz konusu olup olmadığının Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma Ağustos 2015 tarihinde başlamış ve Ağustos 2016 tarihinde tamamlanmıştır. Proje TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında Kimya, Biyoloji Araştırma Grubu tarafından 29.992,2 TL' lik bir bütçe ile desteklenmiştir (KBAG-115Z702).

Prof. Dr. Feride SEVERCAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
PROJE ÖZETİ	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	1
1.2 Proje Önerisinde Tanımlanan Çalışma ile Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Obezite	3
2.2 Obezite, İnsulin Direnci Ve Tip 2 Diyabet	3
2.3 Adipoz Doku'nun Obezite, İnsulin Direnci Ve Tip 2 Diyabetteki Yeri ve Önemi.....	4
2.4 Palmitoleik Asit, Obezite Ve Tip 2 Diyabet	8
2.5 Projede yapısal ve içeriksel çalışmalarda kullanılan Biyofiziksel ve Biyokimyasal Teknikler	9
2.5.1 Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve mikrospektroskopisi	9
2.5.2 Fiziksel ve Biyokimyasal ölçümler.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1 Hayvan Modeli Ve Hayvan Deneyleri	13
3.2 FTIR Mikrospektroskopik Çalışmaları.....	15
3.3 ATR-FTIR Spektroskopisi	17
3.3.1 Spektral Verilerinin Toplanması	17
3.3.2 ATR-FTIR Spektroskopik Çalışmalarında Kullanılan Spektrum Analiz Yöntemleri	17
3.4 Eliza insulin Testi	17
3.5 İstatistiksel Analiz.....	18
4. BULGULAR	18
4.1 Vücut Ağırlıkları	18
4.2 Serum Parametreleri Ve OGTT Sonuçları	20

4.3 FTIR Mikrospektroskopisi Çalışmaları	24
4.4 ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmaları	33
5. TARTIŞMA/SONUÇ	40
KAYNAKÇA	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Adipoz dokunun genel görünümü (https://www.quia.com/jg/2570646list.html).....	5
Şekil 2. (A) Viseral ve subkütan adipoz dokunun insan vücudu içinde gösterimi (B) Viseral ve subkütan adipoz dokudaki serbest yağ asidi dönüşümü	7
Şekil 3. Palmitoleik asitin moleküler yapısı (http://lowcarbsteve.co.uk/ketogenic-fat-chemistry-101).....	8
Şekil 4. FTIR mikrospektroskobu çalışma prensibi (Gazi v.d., 2006).....	12
Şekil 5. Diyet süreci sonrasında kontrol (solda) ve obez (sağda) farelerin fiziksel görünümü ...	15
Şekil 6. Standard diyetle beslenmiş SD ve PSD grupları ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenmiş olan HD ve PHD gruplarının vücut ağırlık değişimleri	19
Şekil 7. Tüm gruplara ait farelerin Palmitoleik asit tedavisi süresince gösterdiği vücut ağırlık değişimleri	20
Şekil 8. Palmitoleik asit uygulaması öncesi OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen glukoz (mg/dl) miktarlarındaki değişimler	21
Şekil 9. Palmitoleik asit uygulaması sonrası OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen glukoz (mg/dl) miktarlarındaki değişimler.	22
Şekil 10. Palmitoleik asit uygulaması öncesi OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen insülin (ng/ml) miktarlarındaki değişimler	23
Şekil 11. Palmitoleik asit uygulaması sonrası OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen insülin (ng/ml) miktarlarındaki değişimler	23
Şekil 12. Örnek bir kontrol adipoz doku kesitinden A) FTIR mikroskobunun ışık mikroskop görüntüsü, B) kırmızı ile işaretlenen bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası, C) spektral haritadan çıkarılan kontrol ve obez fareye ait örnek spektrumlar	25
Şekil 13. Kontrol SD grubuna ait subkütan adipoz dokularınbant alan oranı spektral haritaları.	29
Şekil 14. Kontrol PSD grubuna ait subkütan adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları.	29
Şekil 15. Kontrol SD grubuna ait viseral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. ...	30
Şekil 16. Kontrol PSD grubuna ait viseral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. .	30
Şekil 17. HD grubuna ait subkütan adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları.	31
Şekil 18. PHD grubuna ait subkütan adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları.	31
Şekil 19. HD grubuna ait viseral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları.	32
Şekil 20. PHD grubuna ait viseral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları.	32
Şekil 21. Kontrol ve obez fare adipoz dokularına ait ortalama örnek spektrumlar.....	33

Şekil 22. Subkütan adipoz doku bant alan oranları.	38
Şekil 23. Viserel adipoz doku bant alan oranları.....	39

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Spektral haritalarda gerçekleştirilen bant alanı hesaplamaları için kullanılan bölgeler.	16
Tablo 2. Spektral haritalarda görüntülenen bant alan oranları	16
Tablo 3. Adipoz dokusu IR spektrumundaki başlıca soğurmalar.	34
Tablo 4. Tüm gruplarda subkütan adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı değerleri arasındaki farklılıklar.	35
Tablo 5. Tüm gruplarda viseral adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı değerleri arasındaki farklılıklar.	35

PROJE ÖZETİ

Çağımızın hastalığı olan obezite ve buna bağlı gelişen tip 2 diyabet için geliştirilecek tedavi yöntemleri için bu konuda yapılacak temel araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Bu bilgiler ışığında, projemizde ilk önce obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının adipoz dokuda neden olduğu yapısal ve kompozisyonel değişikliklerin araştırılması amaçlandı. Bu amacı takiben ikinci adımda obezite ilişkili tip 2 diyabet kaynaklı sözkonusu değişimlerin palmitoleik asit tedavisiyle geri döndürülme potansiyelini araştırmayı amaçlayan bir terapötik ön çalışma yapıldı.

Obezite özellikle visceral ve subkütan adipoz dokudaki aşırı kütle artışı ve hücre içi zarar görmüş glukoz ve lipit metabolizmaları gibi değişiklikler ile karakterizedir. Visceral (VAT) ve subkütan (SCAT) adipoz doku kütleindeki bu artış obezitenin ana nedenidir ve çoğu zaman lipit ve glukoz metabolizmasının bozulmasıyla sonuçlanır. Visceral (VAT) ve subkütan (SCAT) adipoz dokunun obezite ilişkili Tip 2 diyabet hastalığındaki bu kritik önemi sebebiyle bu projede bu iki tip adipoz doku üzerinde çalışıldı. Obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının adipoz dokuda meydana getirdiği molekülerin konsantrasyon ve kompozisyonlarındaki değişimler Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) mikrospektroskopisi ve ATR-FTIR spektroskopisi ile incelendi. Bu incelemenin ardından palmitoleik asitin bir anti-obezite ve anti-diyabetik ilaç olma potansiyelini yine aynı teknikle ortaya çıkarmaya yön verecek bir ön çalışma gerçekleştirildi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre obezite ve tip 2 diyabet adipoz dokuya ait moleküler kompozisyonda, örneğin lipit/protein oranı ve karbonil/lipit oranında artma ve doymamış/doymuş yağ oranında azalmaya sebep olmaktadır. Fakat çalışmamız palmitoleik asitin obezite ve tip 2 diyabetin sebep olduğu bu yıkıcı değişimler üstüne iyileştirici etkisinin varlığını göstermiştir. Sonuç olarak sözkonusu çalışma, gelecekte yapılabilecek olan obeziteye bağlı tip 2 diyabet tedavisi üzerine araştırmalar için temel olabilecek niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: obezite, tip 2 diyabet, visceral adipoz doku , subkütan adipoz doku, FTIR mikrospektroskopisi, palmitoleik asit

ABSTRACT

Fundamental investigations on obesity and obesity related type 2 diabetes which are common diseases nowadays are so important for therapeutic studies in future. In the light of this information, it is firstly aimed to investigate the structural and compositional alterations in adipose tissue caused by obesity related type 2 diabetes. Secondly, a preliminary study on the therapeutic effect of palmitoleic acid on these alterations was performed by investigating its potential of reversal effect.

Obesity is especially characterized by adipocyte hypertrophy, the expansion of visceral and subcutaneous adipose tissue mass in the body, and alterations in cellular biology. The increase of the expansion of visceral and subcutaneous adipose tissue mass is the main reason of obesity and mostly this process results in disturbed glucose and lipid metabolism. Since visceral and subcutaneous adipose tissues have a critical role in obesity related type 2 diabetes, we studied with these two types adipose tissues. In this project, we investigated the molecular alterations in the concentration and composition of obesity related type 2 diabetes in adipose tissue by Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy and ATR-FTIR spectroscopy. Afterwards, a preliminary study which gives direction to reveal the potential of palmitoleic acid as an anti-obesity and anti-diabetic drug is carried out by the same technique.

The results of the current study revealed that obesity and type 2 diabetes caused some alterations in molecular composition in adipose tissue as an increased lipid/protein ratio, an increased carbonyl/lipid ratio and a decreased unsaturated/saturated lipid ratio. However, our preliminary studies indicated that the palmitoleic acid have an therapeutic effect on these destructive alterations of obesity and type 2 diabetes. This study could be the basis of the further studies on treatment of obesity related type 2 diabetes mechanism.

Keywords: obesity, type 2 diabetes, visceral adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, FTIR microspectroscopy, palmitoleic acid

1. GİRİŞ

1.1 Çalışmanın Amacı

Obezite prevalansı başta gelişmiş ülkeler olmak üzere bütün dünyada artmaktadır. Özellikle son yıllarda, yol açtığı birçok kronik hastalığın önlenmesinde, yaşam kalitesinin yükseltilmesinde ve mortalitenin azaltılmasında obezitenin tedavi edilmesinin önemi anlaşılmıştır. Obezitenin oluşumunda genetik ve çevresel faktörler birlikte etki ederken, temel olarak bu hastalık alınan ve tüketilen enerji arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Ayrıca insülin direnci, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok metabolik hastalığa da sebebiyet verebilmektedir. Obezite kendisine eşlik eden bu tip hastalıkların tedavisini güçleştirir ve komplikasyonların daha da ilerlemesine sebep olur. Çağımızın hastalığı olan obezite ve buna bağlı gelişen tip 2 diyabet için geliştirilecek tedavi yöntemleri için bu konuda yapılacak araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda çalışmamız obezite ilişkili tip 2 diyabetin adipoz dokuda neden olduğu yapısal değişimleri araştırarak hastalığın etki mekanizmasını daha iyi anlamayı ve klinik çalışmalar için temel teşkil eden bilgiler edinmeyi amaçlamaktadır. Çalışmamızın bu amacını takiben, terapötik bir ön çalışma olarak palmitoleik asitin obezite ilişkili tip 2 diyabet kaynaklı adipoz doku değişimlerini geri çevirebilme niteliğinin olup olmadığı araştırılacaktır. Burada amacımız palmitoleik asitin obezite ilişkili tip 2 diyabet üzerinde olası bir terapötik etki potansiyelini ortaya çıkararak ileride yapılacak detaylı temel ve klinik çalışmalara ışık tutmaktır.

Proje kapsamında belirlenen hedefler,

- 1) Yüksek yağ oranlı diyetle indüklenmiş obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının subkütan ve viseral adipoz dokularda neden olduğu moleküllerin konsantrasyon ve kompozisyonlarındaki değişim gibi yapısal ve fonksiyonel değişimlerin Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) mikrospektroskopisi ile görüntülenmesi ve karakterize edilmesi,
- 2) Bir tedavisel ön çalışma niteliğinde, yüksek yağ oranlı diyetle indüklenmiş obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının subkütan ve viseral adipoz dokularda sebep olduğu adı geçen yapısal, fonksiyonel değişimlerin palmitoleik asit tedavisi ile geri çevriminin söz konusu olup olmadığının Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) mikrospektroskopisi ile görüntülenmesi ve karakterize edilmesi,

3) Deney süreci boyunca belli aralıklarla tüm gruptaki farelerin kan örneklerinden insülin ve glukoz gibi tip 2 diyabet hastalığının teşhisi için metabolizmada kritik önemi olan bileşenlerin biyokimyasal tetkiklerinin yapılması olarak belirlenmiştir.

1.2 Proje Önerisinde Tanımlanan Çalışma ile Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması

Proje önerisinde belirtilen C57BL/6 tipi erkek fareler her grupta 10 fare olmak üzere 4 grup olarak ayrıldı ve özel yüksek yağ içerikli yemlerle 8 ay süre ile beslendi. Diyet süresi 5 ay olarak tahmin edilmişti fakat deney grubu fareleri 5. Ayın sonunda obez olmadığı için diyet süresi fareler tam olarak obez olana kadar uzatıldı. 8 aylık sürenin sonunda HD ve PHD grup fareler obez olarak kabul edildi ve yapılan OGTT ve insulin testi sonuçlarında insulin direncine sahip oldukları saptandı. Diyetle indüklenmiş obezite ilişkili insulin direnci gösteren PHD grubu farelere ve kontrol grubu olan PSD grubu farelere 1 ay süre ile palmitoleik asit gavaj yoluyla verildi. Bu tedavi süresince fareler gruplarına göre belirlenmiş olan diyetlerine devam ettiler ve bu 1 aylık sürenin sonunda bütün gruptaki fareler feda edildiler. Proje başvurusunda SD, PSD, HD ve PSD gruplarından alınan viseral ve subkütan adipoz doku örneklerinin FTIR mikrospektroskopisi ile çalışılması vaadedilmişti fakat FTIR cihazının mikroskop aksamının bozulması ve uzun süre tamir edilememesi sebebiyle FTIR mikrospektroskopisi ile aynı çalışma prensibine dayalı fakat görüntü elde edilemeyen ve B planımızda yer alan ATR-FTIR spektroskopisi ile çalışıldı. ATR-FTIR spektroskopisi ile elde edilen spektrumlardan yapılan analizler sayesinde proteinler, lipitler, karbonhidratlar gibi yapıtaş molekülünün vibrasyonel parmak izleri takip edilerek diyetle indüklenmiş obezite ilişkili insulin direncinin bu dokularda sebep olduğu değişimler ve palmitoleik asitin bu değişimler üzerine etkisi detaylı şekilde incelendi. Proje teslimine yakın bir tarihte tamiri tamamlanan FTIR mikroskop ile kısıtlı süre sebebiyle her grubu temsil edecek şekilde tüm gruptan birer örneğin çekimleri yapıldı ve ATR-FTIR spektroskopisi ile beraber sonuçlar kısmında sunuldu. Obezite ve tip 2 diyabetin metabolik etkilerini saptamada kullanılan rutin parametreler olan kanda glukoz ve insulin tayini ise kontrol ve deney grubu farelere ait serum örneklerinden yapılan biyokimyasal analizler ile saptandı.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Obezite

Obezite, yağ dokusunun vücut ağırlığına oranla patolojik olarak artması şeklinde tanımlanmaktadır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaşam şekli, yeme ve spor alışkanlıklarındaki değişikliklerin sonucunda ortaya çıkan obezite, gün geçtikçe artan görülme sıklıkları ile özellikle batılı yaşam stilini benimseyen ülkelerde insan sağlığını tehdit eden bir boyuta ulaşmıştır (**Gedik, 2003**). Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanır ve başta endokrin sistem olmak üzere vücudun tüm organ ve sistemlerini etkileyerek çeşitli bozukluklara ve hatta ölümlere yol açabilen önemli bir sağlık problemidir.

Obezite, özellikle yüksek miktarda yağ içeren besinlerin tüketilmesi ile fiziksel aktivitenin azalması dolayısı ile alınan ve harcanan enerji arasındaki dengenin bozulması sonucu vücut homeostazının bozulmasından kaynaklanır. Artan vücut yağ kitlesi ve özellikle abdominal bölgede toplanan yağ dokusu vücutta mevcut bulunan viseral ve subkütan adipoz doku kütlelerinin aşırı artışına sebep olur. Endokrin sistem üyesi olan adipoz dokunun aşırı artışı da meydana gelen hormon değişikliklerine bağlı olarak glukoz ve lipit metabolizmalarında bozukluklara yol açmaktadır. Obezite kaynaklı artış gösteren adipozitlerin daha çok serbest yağ asidi salınımına sebep olarak insülin direnci gelişmesine ve ilerleyen safhalarda bu sürecin tip 2 diyabetle sonuçlandığı bilinmektedir. Obezite ve tip 2 diyabet hastalıklarının birlikte görülme sıklığı “diyabezite” teriminin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (**Astrup ve Finer, 2000**).

2.2 Obezite, İnsulin Direnci Ve Tip 2 Diyabet

Obezitenin tip 2 diyabet ile 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**). Daha geniş anlamda insülin direnci, insüline bağlı olarak gerçekleşen glukozun hücreler tarafından alınması, oksidasyonu, depolanması ve glukoz salınımının inhibisyonu aşamalarında direnç görülmesi anlamındadır Obezite gibi kompleks metabolik hastalıkların patolojilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için tüm vücutta insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanması şarttır (**Furler v.d., 1997; Nguyen v.d., 2006**).

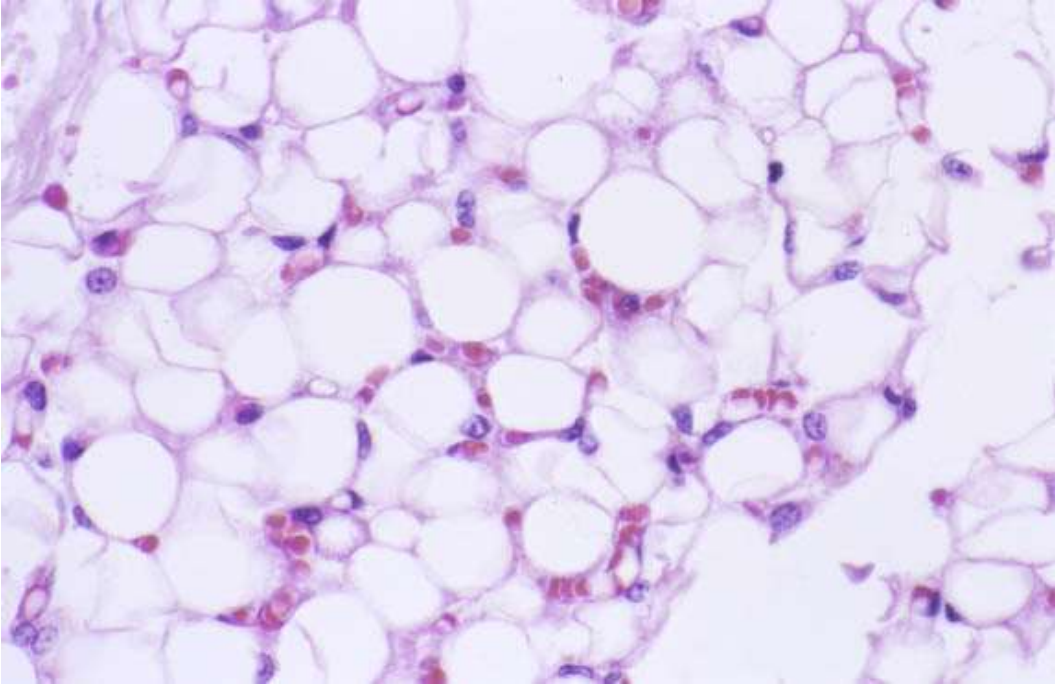
Obezite sonucu abdominal bölgede biriken yağ ile yakın ilişkisi gösterilen en önemli obezite komplikasyonlarından biri tip 2 diyabettir (**Chanvd., 1994**). Abdominal yerleşimli adipositler periferik adipositlere göre daha büyük ve insüline dirençli tip hücrelerdir. Bu hücreler daha çok sayıda adrenerjik reseptörler içerirler. Bu dolaşımda daha çok non-esterifiye yağ asitlerinin bulunmasına neden olur. Sonuçta abdominal obezitede serbest yağ asitlerinin, plazma serbest yağ asidi dönüşümünün ve hepatik glukoz üretiminin periferik tip obeziteye göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (**Jensen vd., 1989**). Bu ise insülin direnci anlamına gelir ve obezitenin komplikasyonlarına yol açan mekanizmalardan bilinen en önemlisidir.

Obezite ve insülin direnci arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için pek çok çalışma yürütülmüştür (**El-Haschimi v.d., 2000; Steppan v.d., 2001; Xu v.d., 2003**). Plazma lipit ve yağ asidi oranının 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**). Bununla beraber, obezitede görülen artmış sitokin salgılanması, obeziteye kronik bir enflamasyon durumunun eşlik ettiğini göstermektedir (**Hotamışligil, 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**).

2.3 Adipoz Doku'nun Obezite, İnsülin Direnci Ve Tip 2 Diyabetteki Yeri ve Önemi

Yağ dokusu, karmaşık, önemli ve son derece aktif metabolik ve endokrin bir organdır. Yağ dokusu sadece trigliserit depolanması ile değil aynı zamanda besinsel, sinirsel ve hormonal sinyallere yanıt vererek ve beslenme, termogenez, bağışıklık ve nöroendokrin fonksiyonları kontrol eden adipokinlerin salgılanmasını sağlayarak enerji homeostazında önemli bir rol oynamaktadır (**Cesur ve Gökçimen, 2012**) Adipoz dokusu adipositlerden meydana gelmiştir (Şekil 1) ve normal ağırlıktaki insanlarda, erkeklerde vücut ağırlığının %10-12, kadınlarda ise %15-20'sini oluşturur. Erişkin, fazla kilolu kadınlarda yağ dokusu oranı %28 iken obez kadınlarda bu oran %32 ve üzeri olmaktadır. Normal şartlarda adipoz 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 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; Früchbek, 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).

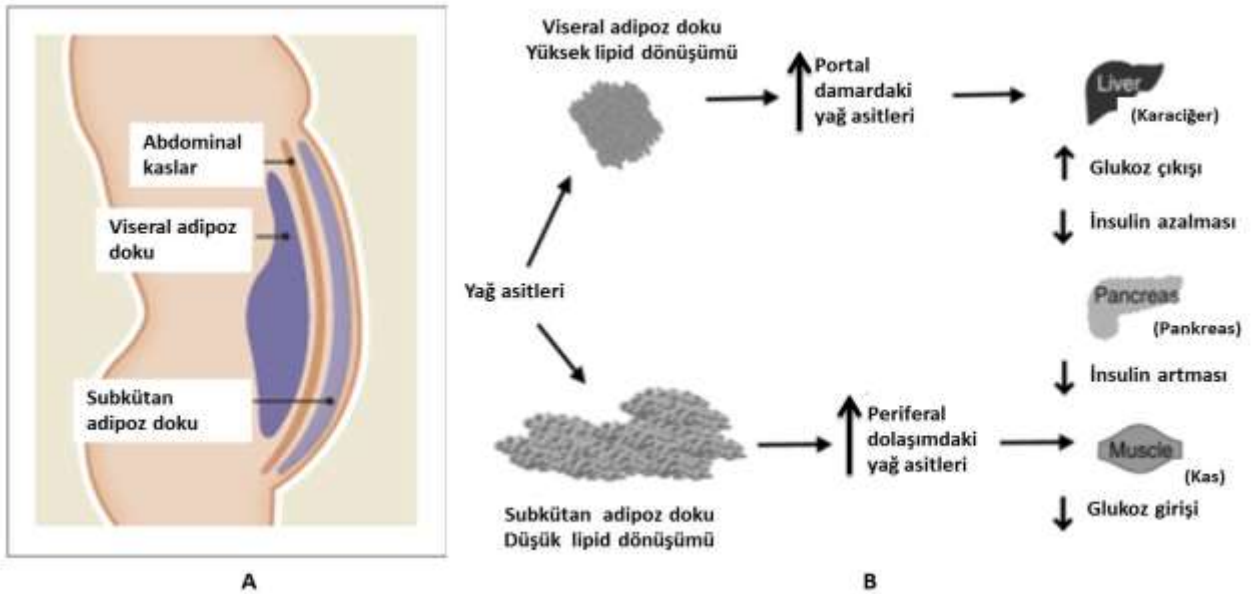


Şekil 1. Adipoz dokunun genel görünümü (<https://www.quia.com/jg/2570646list.html>)

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz visceral ve subkütan adipoz doku kütleindeki artış obezitenin ana nedenidir ve çoğu zaman lipit ve glukoz metabolizmasının bozulmasıyla sonuçlanır (Bays vd., 2008). Adipoz dokunun bir enerji deposu olmak dışında, dolaşıma birçok düzenleyici peptit ve sitokin salgılayan bir endokrin organ görevi gördüğünü bilmek insülin direnci obezite ilişkisini

anlamakta en önemli etkidir. 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; Früchbek, 2006**). 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**). Adipoz 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 hücrel 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 lipotoksisitenin de buna etkisi büyüktür (**Busch v.d., 2005**). Obezitede plazma trigliserit ve NEFA miktarında görülen bu artışın insülin direnci oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Obez ve obez olmayan deney gruplarında, plazma FFA seviyesine bakılmış ve FFA seviyesinin obezitede yükseldiği saptanmıştır. FFA'nın, glukoz taşınması ve/veya fosforilasyonu seviyesinde, insülinle stimüle edilmiş glukoz alımı, glikojen sentezi ve glikoz oksidasyonunu engellediği bulunmuştur, böylelikle serbest yağ asitlerinin, obezitede, insülin direncinin patogeneze sebep olan önemli katkısı gösterilmiştir (**Boden, 2001**). Adipoz dokuda lipit birikimi, sirküle eden FFA alımına bağlıdır (**Zechner v.d., 2009**). Viseral adipoz

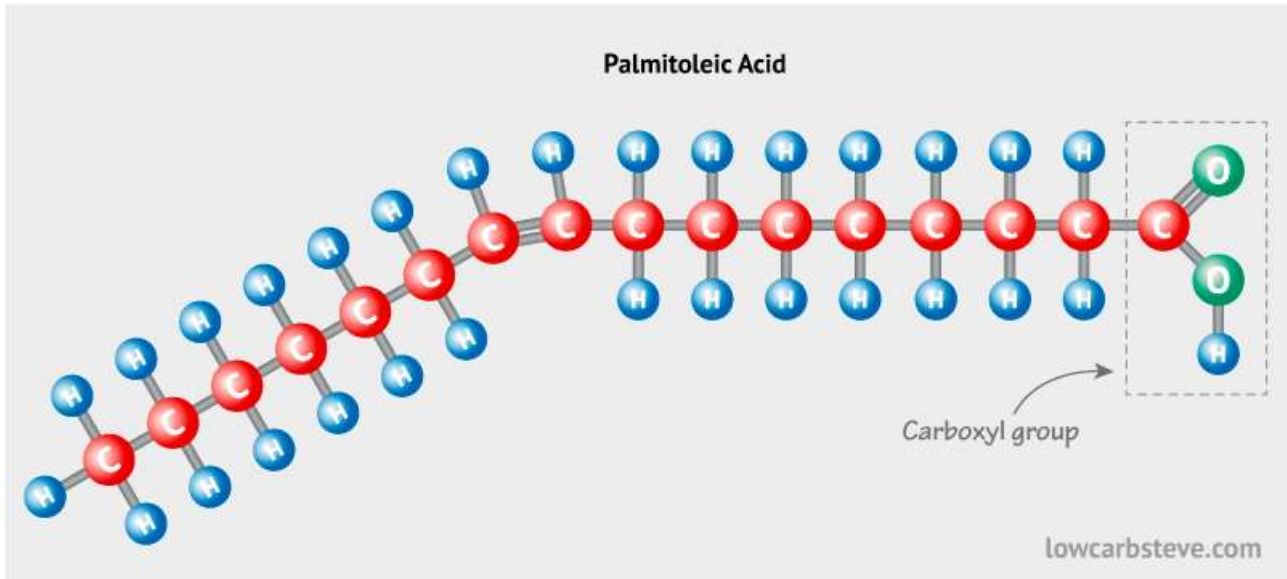
doku trigliseritlerin fazlaca yıkımına dolayısıyla serbest yağ asitlerinin aşırı salınımına ve böylece kan şekerin yükselmesine sebep olabilir (Klein, 2004). Çoğunlukla subkütan adipoz dokuda görülen büyük adipozitler, küçük adipozitlerin oluşturduğu viseral adipoz dokudan daha fazla trigliserit sentezler (Edens vd., 1993; Farnier vd., 2003). Çalışmamızda bahsi geçen iki farklı dokuyu analiz etmek adına subkütan adipoz doku olarak inguinal adipoz doku; viseral adipoz doku olarak da gonadal adipoz doku kullanılmıştır. Trigliseritlerin ve lipitlerin adipoz dokularda depo edilmesinin insülin direnci ile pozitif ilişkili olduğu obez fare ırklarında gösterilmiştir (Pan vd., 1997; Phillips vd., 1996). Serbest yağ asitlerinin aşırı salınımı, trigliseritlerin yoğun şekilde yıkıma uğramasından kaynaklanmaktadır. İnsülin direnci gelişiminde, genişlemiş adipozitlerce salgılanmış yüksek miktarlardaki serbest yağ asitleri önemli bir rol oynamaktadır (Hotamisligil vd., 1995). Kanda yüksek oranda bulunan serbest yağ asitlerinin, uzun süreli glukoz tolerans bozukluğu gelişimi ve tip 2 diyabet gelişimi için bir risk işareti olduğu gösterilmiştir (Charles vd., 1997). Tip 2 diyabetli hastaların büyük çoğunluğu obez ve yüksek oranlarda plazma serbest yağ asidine sahip bireylerdir. Buradan yola çıkılarak serbest yağ asitlerinin obezite ve tip 2 diyabet arasında önemli bir bağlantı olduğu söylenebilir (Arner, 2001). Şekil 2'de viseral ve subkütan adipoz dokudaki serbest yağ asidi dönüşümü görülmektedir.



Şekil 2. (A) Viseral ve subkütan adipoz dokunun insan vücudu içinde gösterimi (B) Viseral ve subkütan adipoz dokudaki serbest yağ asidi dönüşümü

2.4 Palmitoleik Asit, Obezite Ve Tip 2 Diyabet

Palmitoleik asit, insan adipoz dokusundaki gliseritlerin bileşeni olan omega-7-monosature yağ asididir (Şekil 3). Yapılan analizlerde, palmitoleik asitin karaciğer yağ depolama ve üretimi, insülin faaliyetleri, palmitat ve yağ asidi sentezinde etkisi olması nedeniyle, hormon benzeri etkiye sahip bir lipokin olarak tanımlanmasına sebep olmuştur (Hodson ve Karpe, 2013). Palmitoleik asitin kas insulin aksiyonunu uyarabilen ve hepatosteatozu baskılayabilen adipoz doku kaynaklı bir lipit hormon olabileceği gösterilmiştir (Cao vd., 2008). İnsülin duyarlılığını değiştiren bir etki olarak, proinflamatuvar gen ekspresyonunu baskılayarak ve hepatik lipit metabolizmasını iyileştirerek, diyabetik farelerde insülin duyarlılığını arttıran palmitoleik asitin hiperglisemi ve hipertrigliseridemiye zayıflattığı gösterilmiştir (Yang vd., 2011). Palmitoleik asitin vücut ağırlığını etkileyen bir sinyal molekülü olabileceğini yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Zelkowitz, 2008), başka bir çalışmada ise palmitoleik asitin yağ oksidasyonunu etkileyen enzimlerce kullanıldığını belirtmiştir (Power vd., 1997). Tüm bu bilgiler ışığında, palmitoleik asit uygulamasının olası lipokin etkisinin kullanarak insülin duyarlılığını artırma yoluyla tip 2 diyabet tedavisinin araştırılması ve ve sözkonusu incelemelerin palmitoleik asitin etkin rol aldığı adipoz dokuda (Viseral ve subkütan adipoz doku) incelenmesi projemizin temelini oluşturmaktadır.



Şekil 3. Palmitoleik asitin moleküler yapısı (<http://lowcarbsteve.co.uk/ketogenic-fat-chemistry-101>)

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 mikroçevresi 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 (**Özek 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. Elde edilen söz konusu parmak izi özelliği taşıyan bilgiler, moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesine ve dolayısıyla farklı yapıların ayırt edilmesine olanak sağlar. Bu bilgiler, öncelikle doğru bant tanımlamalarının yapılması, sonrasında ise ilgilenilen bantların konumu, bant şiddetleri ya da bantların altında kalan alan ve bant genişliği değerlerinin hesaplanması ile elde edilebilir. Genel olarak FTIR spektroskopisinde kullanılan değişkenler bant şiddeti / bantın altında kalan alan, bant konumu (frekans değeri) ve bant genişliğidir. Bant şiddeti ve alanı maddenin konsantrasyonu hakkında bilgi verirken, bant konumu düzen/düzensizlik hakkında, bant genişliği ise dinamik hakkında bilgi verir (**Cameron ve Charette, 1981; Cakmak v.d., 2003; Toyran ve Severcan, 2003**). Dolayısıyla, FTIR spektrumlarından bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısı ile sistemde mevcut moleküllerin belirlenmesi, bunların konsantrasyonu gibi pek çok bilgi elde etmek mümkündür. Özellikle biyolojik çalışmalarda, biyolojik sistemlere zarar vermeden moleküler düzeyde inceleyebilmesi nedeniyle FTIR spektroskopisi tekniği daha da önem kazanmaktadır (**Boyar ve Severcan, 1997; Melin v.d., 2000; Severcan v.d., 2000; Melin v.d., 2001; Cakmak v.d., 2006; Gorgulu v.d., 2007; Ozek v.d., 2010; Bozkurt v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Bu teknik kullanılarak çok düşük konsantrasyondaki örnekler hem in vivo hem in vitro koşullarda incelenebilmekte; protein, lipit, DNA, kolesterol, karbohidrat gibi hücrelerin yapıtaşı moleküllerinin 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., 2005; Cakmak v.d., 2006; Toyran v.d. 2006; Dogan v.d., 2007; Bozkurt v.d., 2007; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). FTIR spektroskopisi biyolojik çalışmalar açısından lipitlerin diğer biyomoleküllerle etkileşimleri, proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi, kanser, diyabet gibi patolojik durumların doku ve membran düzeyinde tanım ve teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (**Mantsch , 1984; Boyar ve Severcan, 1997; Fukuyama v.d., 1999; Severcan v.d., 2000; Liu v.d., 1996; 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**). Bu nedenlerle, projemizde yüksek yağ oranlı diyetle indüklenmiş obezite ilişkili tip 2 diyabet hastası farelere ait subkütan ve viseral adipoz dokularda meydana gelen değişimlerin tespitinde bu teknik kullanılmıştır.

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. 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 ZnSe in üzerine elmas Di/ZnSe (elmas/çinko-selenit) kristali kullanılmıştır. Bu kristal birleşimi, orta-IR bölgesinde kuru, ıslak veya sulu örnekleri analiz etmek için idealdir.

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'te gösterilmektedir. FTIR mikrospektroskopi yönteminin avantajları şöyle sıralanabilir:

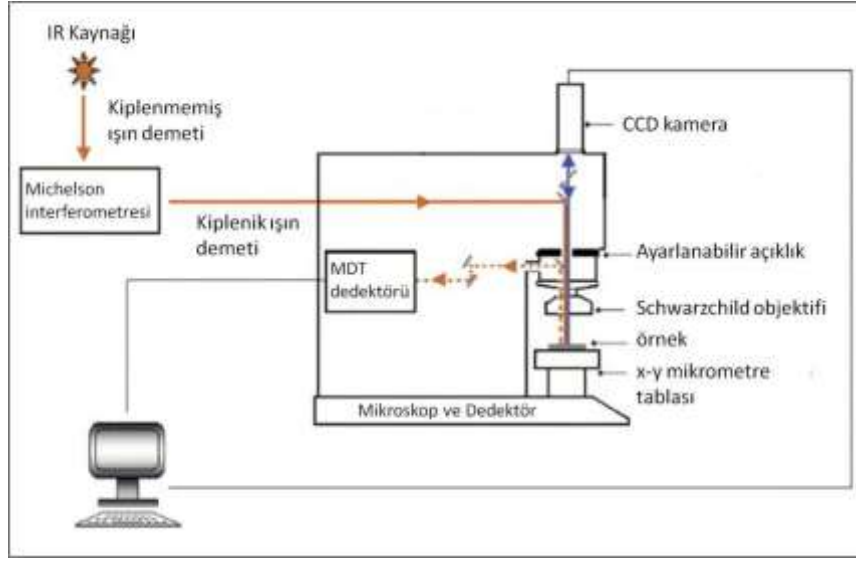
□ FTIR mikrospektroskopi ile toplanan görsel haritalar her bir pikselinde örneğin o bölgesine ait yüksek kaliteli spektrumlar içerir, böylelikle görsel bilgi ile eş zamanlı örneğin belirli bölgesindeki spektrumlar da elde edilebilir.

□ Analizler için çok küçük miktarlarda örnek kullanımı yeterlidir.

□ FTIR görüntüleme örnek içindeki makromoleküler titreşimlerin karakteristik absorpsiyonlarına dayandığı için örneklerin, herhangi bir ön işleme tabi tutulmasına, değişik tekniklerle boyanmasına veya işaretlenmesine gerek yoktur. Bu yönüyle FTIR mikrospektroskopi yöntemi örneğe zarar vermeyen bir metottur (**Kazarian ve Chan, 2006; Kretlow v.d., 2008**).

□ Örneğin kimyasal haritaları yüksek çözünürlükle elde edilir (**Jackson v.d., 1998**).

Bu nedenlerle, 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; Lın v.d., 2007; Toyran v.d., 2007; Boskey Ve Camacho, 2007; Toyran v.d., 2008, Cakmak v.d., 2012**). Bu sayede doku örneklerinden alınan kesitler direk olarak FTIR mikroskopu ile çok daha hassas bir şekilde incelenerek dokuların bütünselliği tahrip edilmeden çeşitli bölgelerindeki değişiklikler araştırılabilmekte ve patolojik bölgeler tespit edilebilmektedir. Bu nedenlerle FTIR mikrospektroskopisi kanser (**Yano v.d., 2003; Meyer v.d., 2011**), diyabet (**Toyran v.d., 2006; Toyran v.d., 2007, Severcan v.d., 2010; Bozkurt v.d., 2010; Bozkurt v.d., 2012**), Alzheimer hastalığı (**Griebe v.d., 2007; Leskovjan v.d., 2010**), artirit (**Boskey ve Camacho, 2007**) gibi pek çok hastalığın karakterizasyonu ve moleküler incelenmesinde ayrıca radyasyonun etkilerinin belirlenmesi gibi konularda (**Cakmak v.d., 2012**) etkin bir biçimde kullanılmaktadır.



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

2.5.2 Fiziksel ve Biyokimyasal ölçümler

Kontrol ve deney grubu fare modellerimiz kendilerine ait özel diyetlere başladıktan sonra her hafta aynı gün ve saatte düzenli olarak ağırlıkları tartıldı ve not edildi. Obezite oluşumu hem bu şekilde ölçüldü hem de farelerdeki fiziksel değişimler gözlemlendi.

Düzenli uygulanan diyet sonucu 8 ay sonunda obez olan fareler, tip 2 diyabet varlığının araştırılabilmesi için Oral glukoz tolerans testi (OGTT) yapılmıştır. OGTT testi tip 2 diyabete yatkınlık tanısının konması ve insülin direncinin var olup olmadığının anlaşılması için yapılması gereken testlerdendir. Testten önce hastanın en az 8 saat aç kalması gereklidir. Bu süre genelde 10-16 saat arasında değişmektedir. Testte hastaya vücut ağırlığı ile orantılı olarak belirlenen miktarda glukoz verilir ve kandaki glukoz oranı belirli aralıklarla (0, 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda) kontrol edilir. OGTT testi sonucu glukoz seviyesi 2. saatin sonunda 7.8 mmol/L (140 mg/dl)'nin altında olmalıdır. Bu değer ve 11.1 mmol/L (200 mg/dl) arasındaki değerler bozulmuş glukoz toleransı olarak kabul edilir. 11.1 mmol/L (200 mg/dl)'nin üstündeki değerler ise tip 2 diyabet varlığını doğrular.

OGTT testinde ayrıca insulin bakılması bu testin güvenilirliğini artıracaktır, insülin hormonunda yükselmeler olursa o kişide insülin direnci olduğu kabul edilir. İnsülin direncinin olması, diyabete yatkınlık olarak kabul edilir. Çalışmamızda güvenilirliği artırmak adına OGTT testi sırasında 0, 15,

30, 60, 90 ve 120. dakikalarda tüm farelerin kuyruklarında kan alındı ve elde edilen serumlar ELISA testinde kullanılarak, insulin hormonunun bu 2 saat süresince değişimi saptandı. Aç bir farede insulin seviyesi 0.4-0.6ug/L arasında değişebilmekte iken diyabet bir farede bu değer 3-6ug/L arasındadır. Bu standartlara göre değerlendirilen çalışmamıza ait farelerin insulin değerleri tip 2 diyabet teşhisi koyulabilmesi için büyük önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hayvan Modeli Ve Hayvan Deneyleri

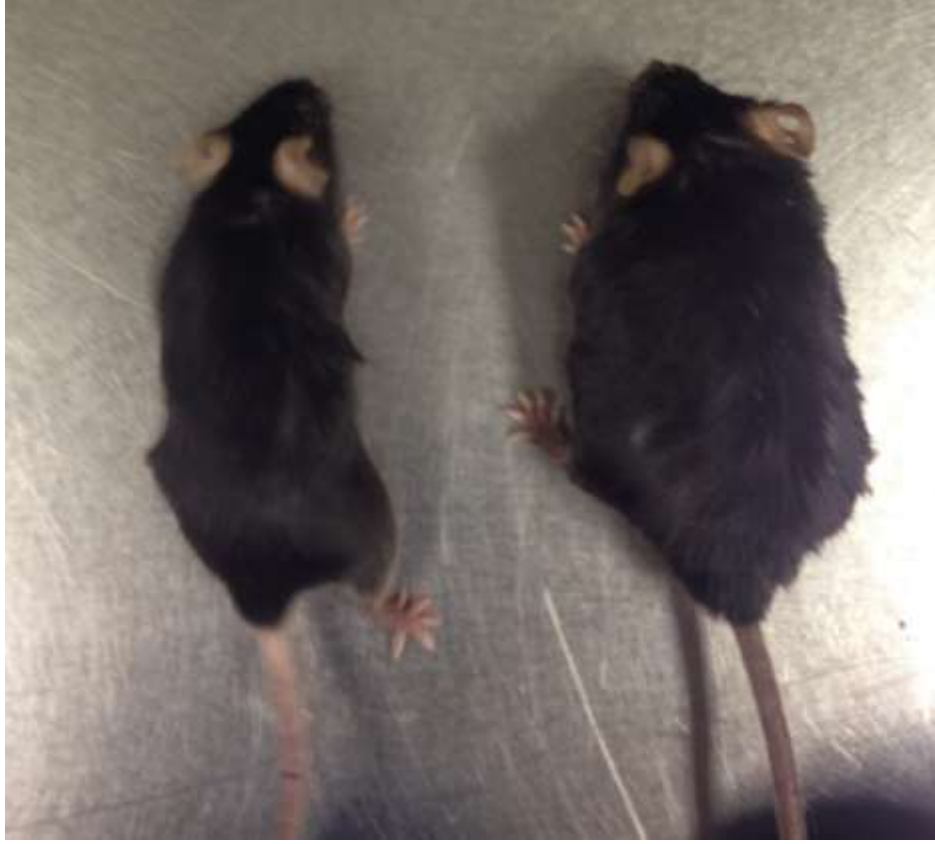
Projemizde kullanılan fare modelleri Bilkent Üniversitesi, Deney Hayvanları Araştırma ünitesinde yetiştirildi ve hayvan deneyleri çalışmalarının tamamı burada tamamlandı. Çalışmamızda obezite ilişkili tip 2 diyabetin adipoz dokuda neden olduğu yapısal değişimleri ve palmitoleik asitin bu sözkonusu değişimlere olan etkisini araştırabilmek üzere C57BL/6 tipi erkek fareler her grupta 10 fare olmak üzere (n=10) 4 gruba ayrıldı:

- A) Kontrol grup, (standart diyetle beslenen C57BL/6 ırkı fareler) (SD)
- B) Yüksek kalorili diyet grubu, (yüksek yağ içerikli diyetle beslenen C57BL/6 ırkı fareler) (HD)
- C) Palmitoleik asit uygulanan kontrol grup, (standart diyetle beslenen ve palmitoleik asit uygulanan C57BL/6 ırkı fareler) (PSD)
- D) Palmitoleik asit uygulanan yüksek kalorili diyet grubu, (yüksek yağ içerikli diyetle beslenen palmitoleik asit uygulanan C57BL/6 ırkı fareler) (PHD)

Hayvanlar 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde 22 ± 2 °C oda sıcaklığında ve %65 nemlilikte yiyecek ve suya istedikleri zaman ulaşabilecek şekilde barındırıldı. 10-11 haftalık olan farelerden SD ve PSD grupları standart beslenme diyeti (SBD) ile; HD ve PHD grupları ise yüksek yağ içerikli diyetle 8 ay boyunca beslendi. Deney gruplarımız olan HD ve PHD grupları için kullanılan yem hem obezite hem de diyabet geliştirme amacı için hazırlanmış özel bir yemdir (Altromin C1080 Obesity and Diabetes), kontrol gruplarımız olan SD ve PSD grupları ise bu yeme özel olarak standardize edilmiş olan özel bir yemle (Altromin C1080 Control) beslendi.

Farelerin vücut ağırlıkları her hafta belli gün ve saatte düzenli olarak ölçüldü ve kaydedildi. 8 aylık diyet sürecinin sonunda obez olarak tanımlanabilecek ağırlığa ve görünümüne ulaşan deney grubu fareleri saptandı (Şekil 5). Obez farelerin aynı zamanda diyabet olup olmadıklarının belirlenmesi için açlık glukoz ve insülin serum parametreleri ölçümleri yapıldı. Fareler ölçümlerden önce yaklaşık 12 saat aç bırakıldıktan sonra OGTT testi yapıldı. Testte tüm farelere vücut ağırlığı ile orantılı olarak belirlenen miktarda glukoz verildi. Ağırlıkları 25 ile 45 gr arası değişen farelere %40 lık glukoz çözeltisi $10 \times \text{vücut ağırlığı (gr)}$ oranına göre gavaj yoluyla verildi. 0, 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda farelerin kuyruklarına kesi atılarak elde edilen kan özel strip ve kan şekeri ölçüm cihazı (Roche Accu Chek Performa Nano) ile kandaki glukoz oranı tayin edildi. Çalışmamızda OGTT testinin güvenilirliği artırmak adına test sırasında 0, 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda tüm farelerin kuyruklarında kan alındı, alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 1 saat süreyle bekletildi ve sonrasında 4000rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek serum elde edildi. Elde edilen serumlar ELISA testinde kullanıma kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Serumdan insulin seviyesi tespit edebilen hassas kitlerle insulin hormonunun bu 2 saat süresince değişimi saptandı.

Obez ve diyabet oldukları saptanan ve deney grubunda olan PHD ile kontrolü olan PSD grupları 5 hafta süre ile palmitoleik asit uygulaması gerçekleştirilirken diğer gruplara ise aynı uygulama ile aynı miktarda su verildi. 5 hafta boyunca her gün aynı saatte belirlenen dozda (300 mg/kg/gün) **(Yang vd., 2011; Camila vd., 2014)** palmitoleik asit farelere oral gavaj yoluyla verildi ve sözkonusu 1 ay sürecinde tüm gruplar kendilerine ait olan diyetlere devam etti. 1 aylık bu süreç bittiğinde ise tüm fareler yüksek doz anestezi ile feda edildi ve hemen ardından kan örnekleri, viseral ve subkütan adipoz dokuları disekte edilip çıkarıldı. Toplanan doku ve kan örnekleri yapılacak araştırmalarda kullanılmaya kadar -80°C 'de saklandı.



Şekil 5. Diyet süreci sonrasında kontrol (solda) ve obez (sağda) farelerin fiziksel görünümü

3.2 FTIR Mikrospektroskopik Çalışmaları

Viseral ve subkütan adipoz dokular -80°C derin dondurucudan çıkartılıp sıvı nitrojen ile dolu tank içinde taşınarak dokuların sıcaktan etkilenmesi engellendi. Adipoz dokuları özel matrisler içinde dondurularak kesim için hazır hale getirildi. -20°C 'ye ayarlanmış olan soğutmalı mikrotom kullanılarak $7\ \mu\text{m}$ kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler kızılötesi ışığı geçiren özel BaF_2 camları üzerine yerleştirildi ve soğuk odada bulunan desikatör içinde 1 gün boyunca 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 üçer spektral harita toplandı. Elde edilen spektral haritalar Isys 3.0 (Spektral Dimensions, USA) görüntü analiz programı kullanılarak incelendi. Spektral haritalardaki spektrumlar öncelikle bir taban çizgisine oturtuldu. 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
C-H gerilim bölgesi	2986-2775 cm^{-1}
Olefinik (HC=CH)	3030-2988 cm^{-1}
CH ₂ antisimetrik gerilim	2945-2900 cm^{-1}
CH ₃ antisimetrik gerilim	2987-2945 cm^{-1}
Karbonil (C=O) gerilim	1800-1700 cm^{-1}
Amid 1	1700-1590 cm^{-1}
Amid 2	1590-1495 cm^{-1}

Tablo 2. Spektral haritalarda görüntülenen bant alan oranları

Bant Alan Oranı	Açıklama
C-H gerilim bölge alanı/ Amid I bant alanı	Lipit miktarının protein miktarına oranı hakkında bilgi verir
Olefinik (HC=CH) bant alanı/ CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı	Doymamış lipit içeriğinin doymuş lipit içeriğine oranı hakkında bilgi verir
CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı/ CH ₃ antisimetrik gerilim bant alanı	Lipit hidrokarbon zincir uzunluğu hakkındabilgi verir
Karbonil (C=O) gerilim bant alanı/ C-H gerilim bölge alanı	Lipit içeriğindeki karbonil grubu miktarı hakkında bilgi verir
Amid I/ Amid II	Proteinlerin yapısındaki değişimler hakkında bilgi verir

3.3 ATR-FTIR Spektroskopisi

3.3.1 Spektral Verilerinin Toplanması

Adipoz 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 64 çekim sayısı kullanılarak incelendi. Çekimler $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında Perkin Elmer Spektrum 100 FTIR Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki adipoz dokuda da her bir bireye ait örneklerden 3 ayrı parça adipoz dokusunun ATR-FTIR spektrumları elde edildi (3 ayrı replike çekimi). Bu replike spektrumların ortalamaları detaylı analizler için kullanıldı.

Atmosferdeki CO_2 ve H_2O '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.

3.3.2 ATR-FTIR Spektroskopik Çalışmalarında Kullanılan Spektrum Analiz Yöntemleri

Viseral ve subkütan adipoz doku spektrumlarına ait bant alanlarının tayinini içeren detaylı spektral analizler, örnekler üzerinde herhangi bir su çıkarma işlemi uygulanmayan normalize edilmemiş ham spektrumlar kullanılarak Perkin Elmer Spektrum One analiz programı ile yapıldı. FTIR spektrumunda yer alan bantlardan pek çok bilgi elde edilebilir. Sinyal şiddeti ve/veya alan değerinin artması, adı geçen grubun konsantrasyonunun artması, veya alan değerinin azalması da o grubun konsantrasyonunun azalması anlamına gelmektedir (**Alo v.d., 1998; Frefelder v.d., 1982**).

3.4 Eliza insulin Testi

Çalışmamızda fare serum örneklerinden insülin miktarı ölçmek amacıyla hassas eliza testleri (CrystalChem Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit) kullanıldı.

Protokol:

Kit içinden çıkan özel solüsyonlar oda sıcaklığına getirilerek kullanıma hazırlandı. 50 µl örnek seyreltici çözelti ile yine 50 µl fare insulin stok solüsyonu karıştırıldı, bu karışımdan yarı yarıya seyreltilerek 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1ng/mLlik çözeltiler ve sadece örnek seyreltici çözelti içeren 0ng/mLlik bir çözelti daha standard olarak hazırlandı. Antiködi içeren özel kuyuların her birine 95 µl örnek seyreltici çözelti koyuldu ve ardından hazırlanan standardlar ve serum örnekleri 5er µl olarak kuyulara eklendi. Bu şekilde +4°C'de 2 saat bekletildi. Ardından 5 kere yıkama tampon çöçeltisi ile yıkanan kuyuların üzerine 100er µl anti-insulin enzim bileşimi eklendi. Bu şekilde oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Ardından 7 kere yıkama çöçeltisi ile yıkanan kuyuların üzerine bu sefer enzim substrat solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında ve ışısız ortamda 40 dakika bekletildi. Ardından her kuyuya 100er µl stop solüsyonu eklendi ve tepkime sonlandırıldı. Bu aşamanın ardından örnekler 450 ve 630 nm optik dansitede (OD) plate reader cihazında okutuldu. Cihazın verdiği değerler ile standartların eğrisi çıkartıldı ve buradan yola çıkarak örneklere ait insülin seviyeleri hesaplandı.

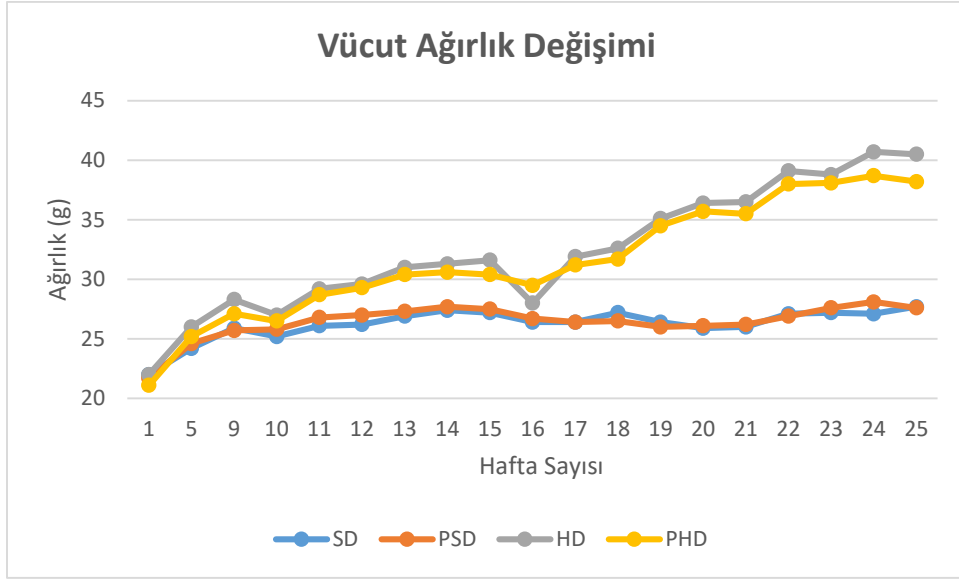
3.5 İstatistiksel Analiz

SD, PSD, HD ve PHD grupları arasındaki değışimler ve bu değışimlerin istatistiksel anlamlılığın hesaplanması için One way ANOVA yöntemi ve art analiz olarak Tukey's testi kullanılarak tüm gruplar kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 şeklinde belirlendi.

4. BULGULAR

4.1 Vücut Ağırlıkları

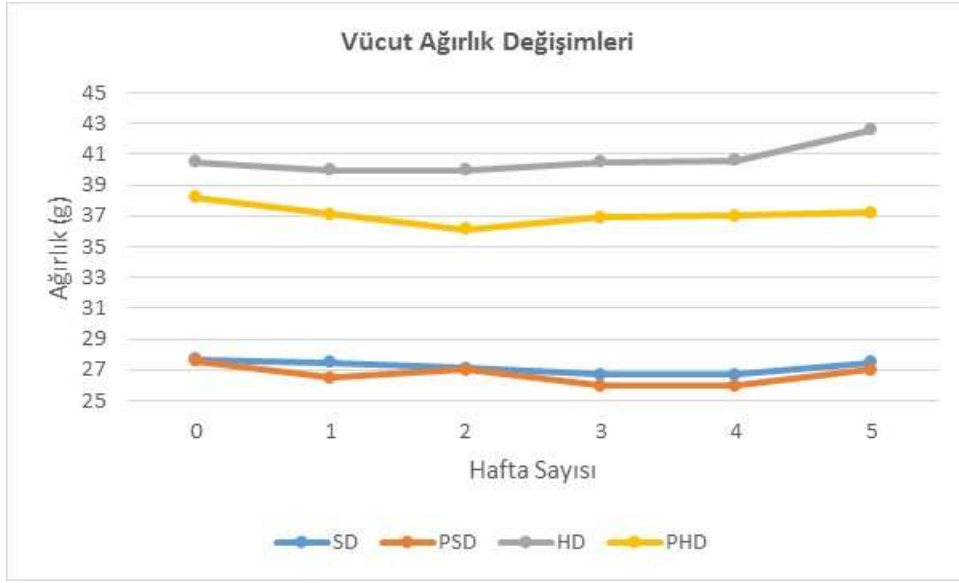
8 ay süreyle standard diyetle beslenmiş SD ve PSD gruplarını ve yüksek yağ içerkli diyetle beslenmiş olan HD ve PHD gruplarının vücut ağırlık değışimleri Şekil 6'da gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü üzere, HD ve PHD gruplarındaki farelerin vücut ağırlıkları SD ve PSD gruplarındaki farelere göre oldukça yüksektir.



Şekil 6. Standard diyetle beslenmiş SD ve PSD grupları ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenmiş olan HD ve PHD gruplarının vücut ağırlık değişimleri

25. hafta sonunda obez olan ve yaptığımız OGTT testleri sonucunda tip 2 diyabet olduğunu saptadığımız farelerden kontrol grubu olan PSD ve deney grubu olan PHD gruplarına 5 hafta boyunca palmitoleik asit uygulaması yapılırken, diğer gruplara ise aynı miktarda su verildi. SD ve PSD gruplarında arasında bir karşılaştırma yapıldığında, PSD grubunun vücut ağırlığının SD grubuna göre daha az olduğu görüldü. 5. Haftanın sonunda ise iki grup arasında önemli sayılabilecek bir farkın olmadığı saptandı. Yüzde olarak hesaplandığında SD grubundaki toplam vücut ağırlığı % 0,7 oranında azalırken PSD grubunda ise % 2,2 oranında azaldığı görüldü. SD grubunda görülen söz konusu kilo kaybının vücuda alınan sudan ya da gavaj uygulamasının stresinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan PSD grubunda görülen kilo kaybının SD grubuna nazaran daha fazla olmasının sebebinin palmitoleik asit uygulaması olması kuvvetle muhtemeldir. Asıl fark görmeyi beklediğimiz HD ve PHD gruplarını karşılaştırdığımızda ise HD grubunun ilk haftalar vücuda alınan sudan ya da gavaj uygulamasının stresinden kaynaklandığını düşündüğümüz bir azalma gösterse de 2. haftanın sonunda vücut ağırlığının artmaya başladığı rahatlıkla gözlenmektedir. Sonuç olarak 5 haftanın sonunda HD grubunda toplam vücut ağırlığı % 5,2 oranında arttığı saptandı. PHD gruplarında ise ilk 2 haftada çarpıcı bir ağırlık kaybı gözlemlendi ve kalan 3 haftada farelerin vücut ağırlığı stabil kaldı. Sonuç olarak 5 haftalık palmitoleik asit uygulaması sonucunda PHD grubunda toplam vücut ağırlığının % 2,6 oranında azaldığı görüldü. Özet olarak, palmitoleik asit uygulaması süresince yüksek yağ içerikli diyetle beslenen HD ve PHD

gruplarından HD grubu bu süreyi ağırlık artımı ile tamamlarken, PHD grubu bu süreci ağırlık kaybı ile tamamladı. Bu sonuçlar palmitoleik asitin kilo alımını engelleyici ve önleyici bir etkisi olduğunu göstermektedir. Tüm gruplar için vücut ağırlık değişimleri şekil 7’de verilmiştir.



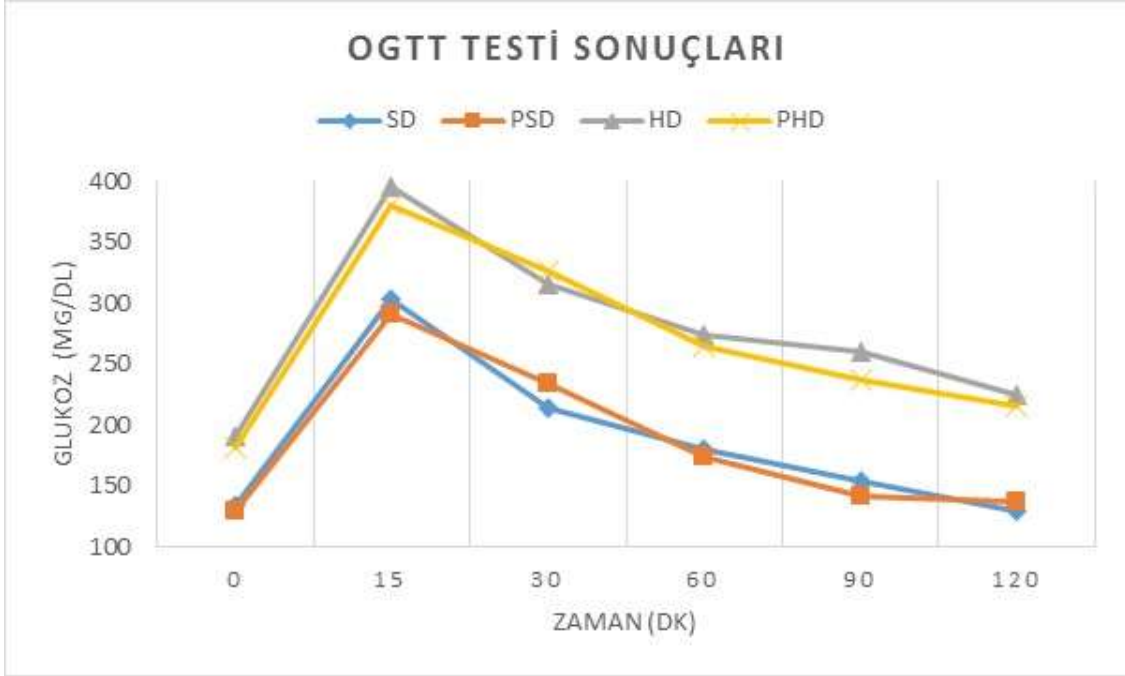
Şekil 7. Tüm gruplara ait farelerin Palmitoleik asit tedavisi süresince gösterdiği vücut ağırlık değişimleri

4.2 Serum Parametreleri Ve OGTT Sonuçları

OGTT testi tip 2 diyabete tanısının konması ve insülin direncinin var olup olmadığının anlaşılması için yapılan rutin testlerdendir. Çalışmamızda ilk olarak HD ve PHD grubu farelerin özel diyet uygulaması sonucu tip 2 diyabet gelişip gelişmediğini saptamak amacıyla, ikinci olarak da palmitoleik asit tedavisinin tip 2 diyabet üzerindeki etkisini incelemek amacıyla OGTT testi yapıldı. OGTT testi sırasında farelerin kuyruklarından 0,15,30,60,90 ve 120. dakikalarda alınan kan örneklerinden kan şekeri (glukoz) ve insülin seviyeleri ölçüldü ve gereken hesaplamalar yapıldı.

Şekil 8, palmitoleik asit uygulaması öncesi OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen glukoz (mg/dl) miktarlarındaki değişimleri göstermektedir ve grafikte x ekseninde gösterilen zaman glukozun gavaj yoluyla verilmesinden sonra ölçüm alınan zamanı göstermektedir. Şekilden görülebileceği üzere incelenen SD ve PSD grupları 8 aylık standart diyet sürecinden sonra OGTT

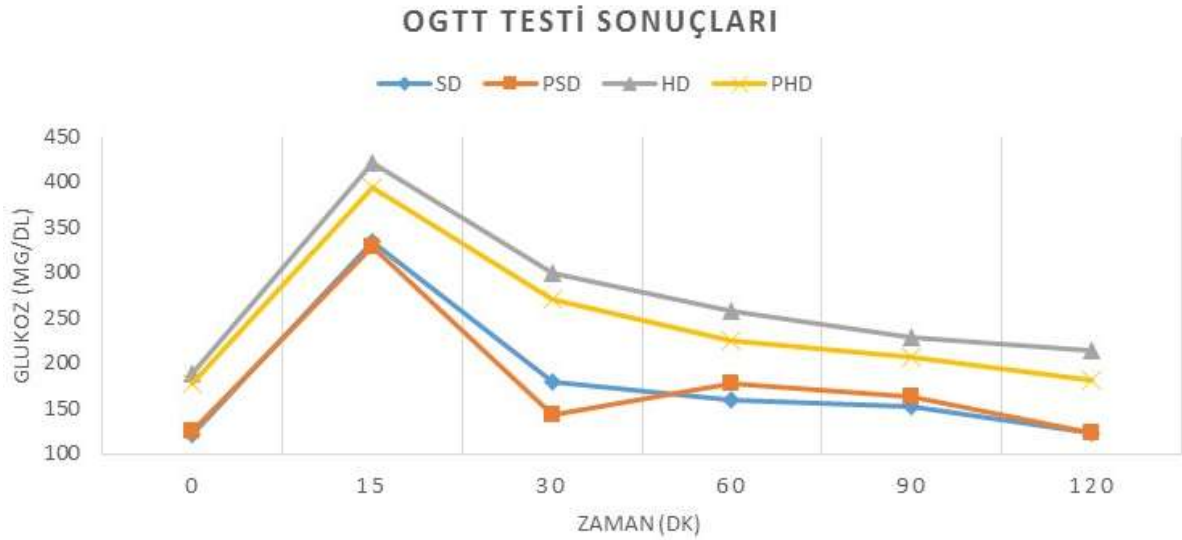
testinde benzer glukoz değişimleri gösterirken, elde edilen bu seviyelerin 2 saatin sonunda normal kabul edilen aralık içerisinde (< 140 mg/dl) olduğu görüldü. Diğer yandan yüksek yağ içerikli diyetle beslenmiş olan HD ve PHD gruplarında standart diyetle beslenmiş SD ve PSD gruplarına göre oldukça artış göstermiş glukoz değerleri kaydedildi. OGTT testi sonucu 2 saatin sonunda glukoz değerleri 200 mg/dl'nin üstünde olan HD ve PHD grupları tip 2 diyabet kabul edildi.



Şekil 8. Palmitoleik asit uygulaması öncesi OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen glukoz (mg/dl) miktarlarındaki değişimler

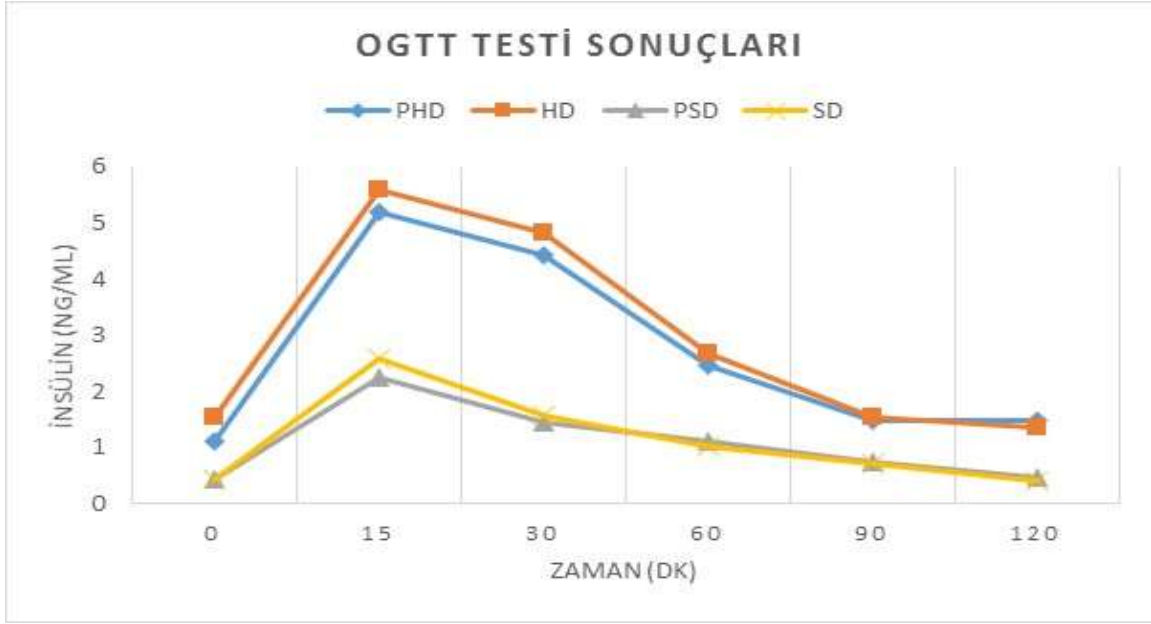
Şekil 9, palmitoleik asit uygulaması sonrası OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen glukoz (mg/dl) miktarlarındaki değişimleri göstermektedir. 5 haftalık palmitoleik asit uygulaması sırasında gavaj yoluyla su alan ve kontrol grubu olan SD grubu OGTT testi sonuçlarında palmitoleik asit uygulaması öncesine göre anlamlı bir değişiklik görülmüdü. Bu grubun palmitoleik asit almış versiyonu olan PSD grubunda ise 30. dakikada bir azalma, 60 ve 90. dakikalarda ise bir artış görülmüdüne rağmen, OGTT testinde 120. dakikanın sonundaki glukoz değerleri SD grubuyla çok yakın olarak saptandı. Bu sonuçlardan palmitoleik asitin normal bireylerde olumlu ya da olumsuz bir etkisi olmadığı sonucu çıkarıldı.

Tip 2 diyabet teşhisi koyduğumuz ve 5 hafta süreyle gavaj yoluyla su alan HD grubunun genel glukoz değerleri ve 2. Saatin sonundaki glukoz değerinin bir önceki OGTT testinden daha yüksek olduğu görüldü. Sözkonusu 5 hafta sürede yüksek yağ içerikli özel diyeti devam ettiği için obezite ve tip diyabet derecesinin artmış olduğunu tahmin ettiğimiz bu grup için glukoz seviyesinin artış göstermiş olması olumlu bir sonuçtur. Aynı grubun palmitoleik asit almış versiyonu olan PHD grubunda ise hem genel glukoz seviyesinin çarpıcı şekilde düştüğü saptandı. Bizim için en önemli kıstas olan 2. saatin sonundaki glukoz seviyesi ise 140-200 mg/dl arasında olup artık tip 2 diyabet aralığında olmayıp bozulmuş glukoz toleransı aralığına indiği tespit edildi. Bu sonuçlar palmitoleik asitin tip 2 diyabet üzerinde iyileştirici bir etkisi olduğunu göstermektedir.

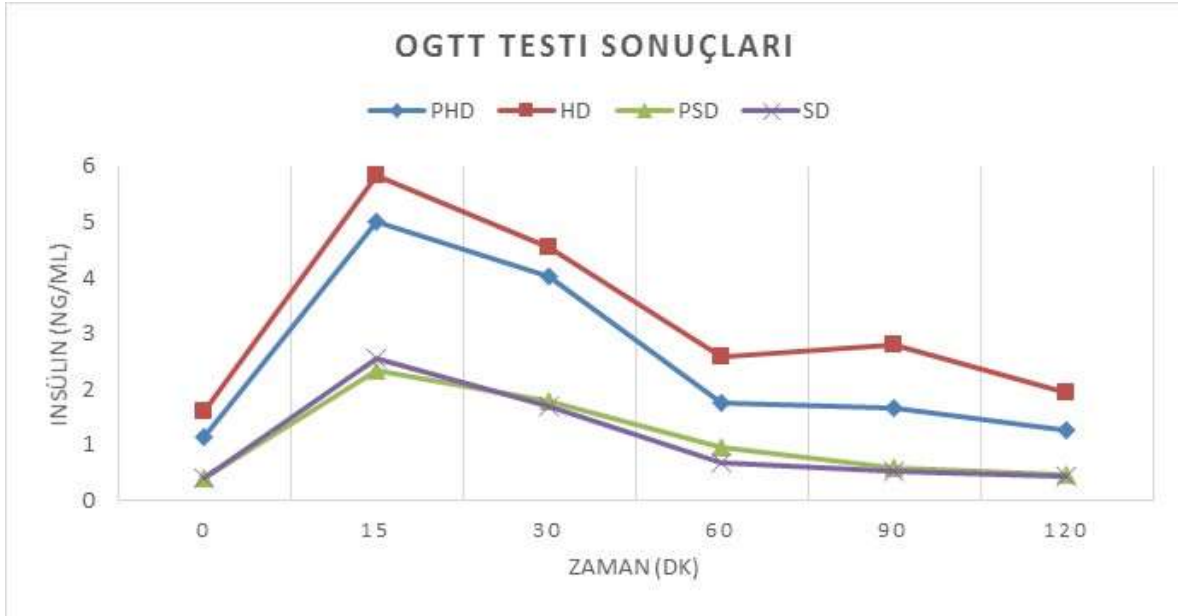


Şekil 9. Palmitoleik asit uygulaması sonrası OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen glukoz (mg/dl) miktarlarındaki değişimler.

Yapılan palmitoleik asit uygulamasının hem öncesi hem de sonrasında yapılan OGTT testi sırasında farelerin kuyruklarından 0,15,30,60,90 ve 120. dakikalarda alınmış kan örneklerinden elde edilen serumlardan hem glukoz seviyesi sonuçları doğrulamak hem de desteklemek amacıyla insülin seviyesi tayini yapıldı. Palmitoleik asit uygulamasından önce ve sonrasında elde edilen tüm gruplara ait sonuçlar sırasıyla şekil 10 ve 11'de gösterilmiştir.



Şekil 10. Palmitoleik asit uygulaması öncesi OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen insülin (ng/ml) miktarlarındaki değişimler.



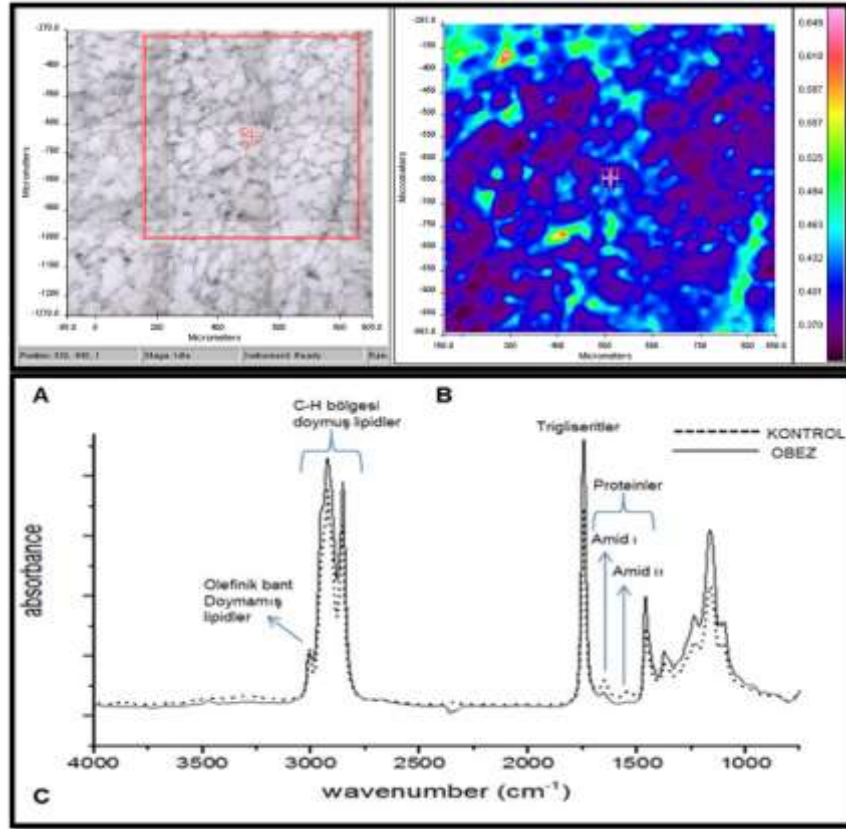
Şekil 11. Palmitoleik asit uygulaması sonrası OGTT testi sırasında toplanan kan örneklerinden elde edilen insülin (ng/ml) miktarlarındaki değişimler.

Palmitoleik asit uygulaması öncesinde SD ve PSD gruplarına ait insulin seviyeleri neredeyse aynı olmakla beraber yüksek yağ içerikli diyetle beslenen HD ve PHD gruplarına göre oldukça düşük bir seviyede oldukları tespit edildi. Yüksek insulin seviyesine sahip HD ve PHD gruplarında glukoz seviyeleri de yüksek çıktığı için, hem kan şekeri (glukoz) hem de insülin seviyelerinin bu gruplarda yüksek olması, bu grupların insülin direnci geliştirmiş olabileceğini gösterdi ve tip 2 diyabet tanısını güçlendirdi.

Palmitoleik asit uygulaması sonrasında kontrol grubu olan SD grubuna ait insulin seviyelerinde önemli bir değişiklik görülmedi. Bu gruptan farklı olarak gavaj yoluyla 5 hafta süreyle su yerine palmitoleik asit almış olan PSD grubu insulin seviyesi 15. dakikada hafif bir artış ve 60. dakikada hafif bir azalma göstermiş olsa da genel itibariyle SD grubuna nazaran anlamlı bir değişiklik göstermedi. Bu da palmitoleik asitin sağlıklı bireyler üzerinde anlamlı bir etki göstermediği sonucumuzu destekler niteliktedir. Fakat tip 2 diyabet olan HD ve PHD gruplarımızda farklı sonuçlar elde edilerek iki grup arasındaki insulin seviyeleri farkının açılmış olduğu ilgili grafikte açıkça görülmektedir. PHD grubuna ait insulin seviyesinde hem 0. Dakika dediğimiz test başlangıcında, hem genel olarak test boyunca hem de 2. saatin sonunda HD grubuna göre anlamlı olarak düşmüş insülin seviyeleri tespit edildi. Azalmış insulin seviyesi insülin direncinin düşmüş olduğunu göstermektedir ve bu sonuç palmitoleik asitin tip 2 diyabet sürecinde tedavi edici etkisinin olabileceğini gösteren bir işaret olarak kabul edilmektedir.

4.3 FTIR Mikrospektroskopisi Çalışmaları

Çalışmamızda SD, PSD, HD ve PHD subkütan ve viseral adipoz doku içeriğindeki makromoleküllerin, özellikle lipidlerin ve proteinlerin dağılımının ve farklı özellikte makromoleküllerin buldukları yerleri tespit etmek için FTIR mikrospektroskopisi tekniği kullanılmıştır. Şekil 12'de FTIR mikroskobunun, (A) ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilen kesit görüntüsü, (B) seçilen bir bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası ve (C) elde edilen spektral haritadan çıkarılan örnek bir adipoz doku spektrumu görülmektedir.



Şekil 12. Örnek bir kontrol adipoz doku kesitinden A) FTIR mikroskopunun ışık mikroskop görüntüsü, B) kırmızı ile işaretlenen bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası, C) kontrol ve obez fareye ait örnek spektrumlar.

Lipitler ve proteinlere ait önemli spektral bantlarda bulunan farklılıkların daha detaylı olarak incelenmesi için haritalar üzerinde daha evvel bahsedilen (Tablo 2) bazı bant alanları oranlandı. Buna göre, kesitlerdeki lipit/protein dağılımı (C-H/amid 1), doymamış/doymuş lipitlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim), lipitlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim), lipitlerdeki karbonil grubu dağılımı (C=O simetrik gerilim/C-H) ve proteinlerin yapısındaki değişim (amid 1/amid 2) bilgisi veren oranlar hesaplandı. Şekil 13-20'de SD, PSD, HD ve PHD gruplarına ait sırasıyla subkütan ve viseral adipoz doku kesitlerinde hesaplanan bu bant alanları oran sonuçları görülmektedir. Söz konusu şekillerden A kısmındaki spektral haritalar sadece amid 1 bandına göre oranlanmış olanlardır. Protein kaynaklı amid I bandı %80 oranında C=O gerilme, %10 oranında C-N gerilme e %10 oranında N-H bükülme titreşimlerinden kaynaklandığı için bu spektral haritalar adipoz doku kesitine ait protein dağılımını göstermektedir. Bu tip spektral haritalarda kırmızı-turuncu tonlarda renkler yüksek

derecede konsantrasyonu, sarı tonlarda renkler orta derecede konsantrasyonu, mavi-mor tonlarda renkler ise düşük konsantrasyonu temsil etmektedir. İlgili şekillerin A kısmı incelendiğinde hem subkütan hem de viseral doku için SD ve PSD grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir. HD grubu bu gruplarla karşılaştırıldığında mavi renk tonunun arttığı yani protein içeriğinin azaldığı görülmektedir. HD ve PHD grupları karşılaştırıldığında ise PHD gruplarında HD'ye göre sarı tonların arttığı yani palmitoleik asit uygulaması ile protein kaybının geri çevriminin sözkonusu olduğu söylenebilir.

Bu şekillerden B kısmında sunulan spektral haritalar lipid/ protein oranını temsil etmektedir. Standart diyet beslenmiş SD ve PSD ile yüksek yağ içerikli diyet ile beslenmiş HD ve PHD gruplarına ait adipoz doku kesitlerinde C-H toplam alanının amid I bant alanına oranlanması ile elde edilen lipid/protein spektral parametresinin dağılımı görülmektedir. Şekilden görülebileceği üzere, konsantrasyonun arttığını gösteren kırmızı renk HD ve PHD gruplarında, SD ve PSD'ye göre oldukça yoğun görülmektedir. Bunun yanında HD ve PHD obez gruplarında görülen hücre boyutlarının kontrol grupları olan SD ve PSD'ye göre artış gösterdiği bu haritalarda net bir şekilde görülmektedir. Obez gruplarda bu şekilde lipid miktarı artarken protein miktarının azalması bu gruplarda en yüksek lipid/protein oranı görmemizin sebebi olabilir ve bu artışlar fazla trigliseritlerin ilk depo yeri olması sebebiyle subkütan adipoz dokuda viseral adipoz dokuya göre daha yoğun olarak görülmekte olabilir. HD ve PHD grupları karşılaştırıldığında ise PHD gruplarında bu oran daha az olarak saptandı. Bunun sebebi ise PHD grubundaki kilo artımının HD grubu kadar olmaması dolayısıyla PHD grubunun daha az lipid yoğunluğuna sahip olmasıdır.

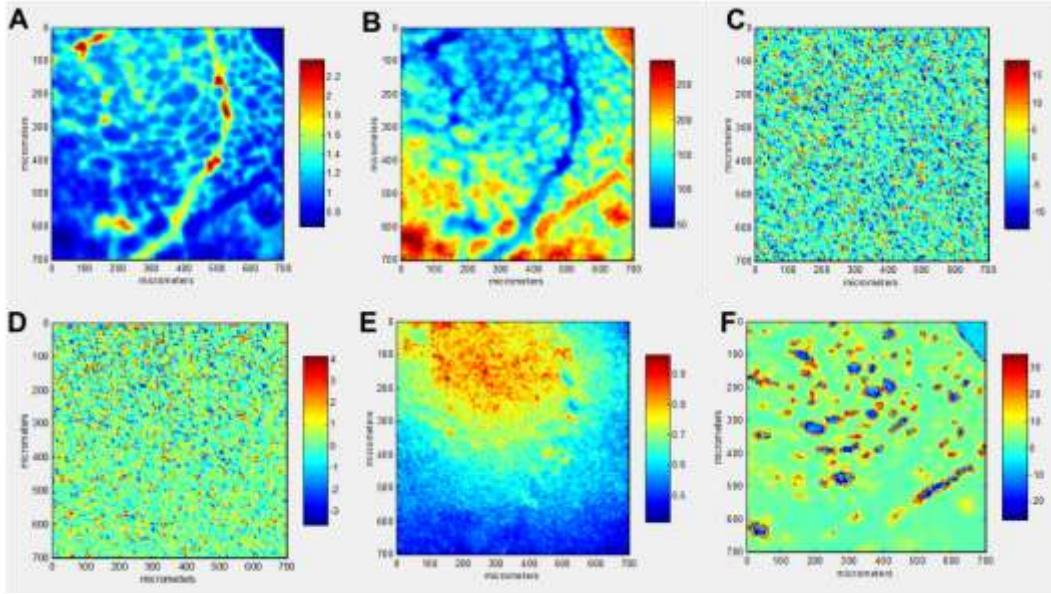
Doymamış/doymuş lipidlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim) ilgili şekillerin C kısmında görülmektedir. Subkütan ve viseral adipoz kesitlerinde olefinik bant alanının CH₂ antisimetrik bant alanına oranlanması ile elde edilen ve doymamış lipid içeriği indeksi olarak kullanılabilecek parametrenin dağılımı tüm gruplar için hesaplandı. SD ve PSD gruplarında yeşil tonlarda görülen bu haritalar, HD ve PHD gruplarında daha düşük konsantrasyonu gösteren mavi renk olarak görülmektedir. Bunun nedeni yüksek yağ içerikli diyet ile beslenmede doku içerisine diğer lipid çeşitlerinde görülen artımla paralel olarak daha fazla doymuş lipid alınması olabilir. PHD grubunda HD grubuna göre yeşil rengin artmış olması doymamış yağ asidinin arttığını göstermektedir. Kendisi de bir doymamış yağ olan palmitoleik asitin vücuda alımı PHD grubundaki doymamış yağ oranı artımının sebebi olabilir, ayrıca alınan bu yağın hücrede yapısal komponentler için kullanıldığının bir göstergesidir.

Lipitlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımları (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim) ilgili şekillerin D kısmında görölmektedir. Şekilden de göröldüğü üzere bu oran HD ve PHD obez gruplarda SD ve PSD kontrol gruplarına nazaran yüksek olarak tespit edildi. Bu oranın yüksek olması bu ırklarda daha uzun hidrokarbon zincirli lipitlerin yer aldığını göstermektedir. PHD ile HD karşılaştırıldığında ise hem subkütan hem de viseral adipoz dokuda bu oran daha düşük bir seviyede gözlemlendi. Bu sonuç, PHD grubu farelerde kontrol gruplarına benzer olarak daha kısa hidrokarbon zincirli lipitler bulunduğunu göstermektedir.

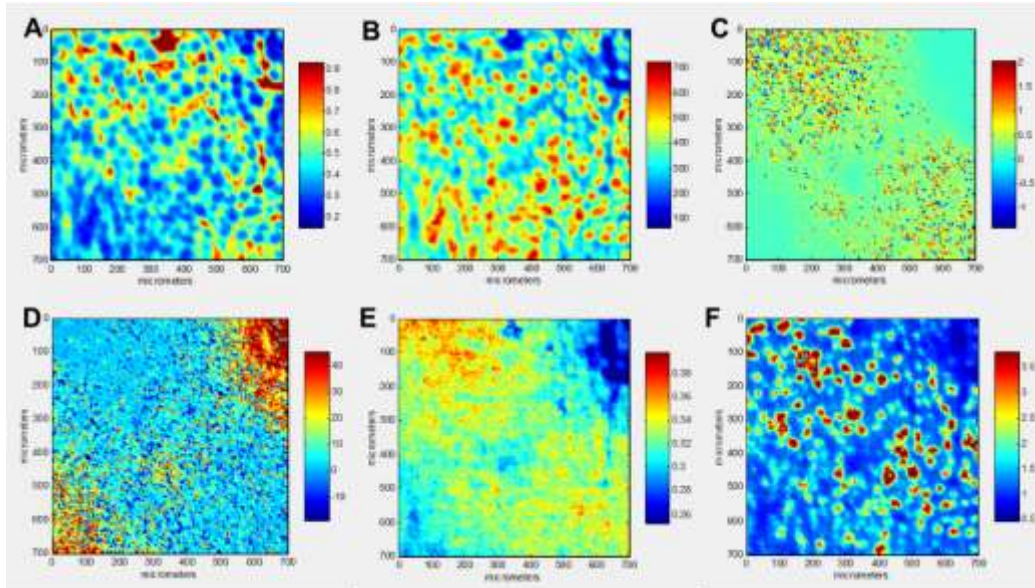
Subkütan ve viseral adipoz doku kesitlerinde C=O ester gerilim bant alanının CH toplam alanına oranlanması ile elde edilen ve trigliserit, kolesterol ester miktarının görüntülenmesini sağlayan spektral parametre değerinin dağılımını (C=O simetrik gerilim/C-H) ilgili şekillerin E kısmında görölmektedir. Şekilden de göröleceği gibi obez HD ve PHD gruplarında trigliserit ve kolesterol ester miktarı kontrol grupları SD ve PSD'ye nazaran daha yüksektir. Yüksek yağ içerikli diyet ile beslenmiş obez HD ve PHD gruplarında trigliserit ve kolesterol miktarı daha da fazla olarak gözlenmesi normal kabul edilirken PHD gruplarında bu konsantrasyon daha düşük olarak saptandı. Bunun sebebi palmitoleik asitin daha önce de belirtilen kilo alımını yani hücrelerde trigliserit depolanmasını engelleyici bir anti-obezite etkisinin olması olabilir. Ayrıca hücrelerde obezite sonucunda depolanan fazla trigliseritin insulin direncine sebep olduğu bilinmektedir, Palmitoleik asitin bu aşırı depolamayı engellemesi bu yolla insulin direncini de kırarak tip 2 diyabet için de iyileştirici etkisi olduğunu göstermektedir.

Proteinlerin yapısındaki değişimleri gösteren amid 1/ amid 2 oranı ilgili şekillerin F kısmında yer almaktadır. Obez HD ve PHD gruplarında bu oranın kontrol SD ve PSD gruplarına göre daha düşük değerler gösterdiği göröldü. Bu azalmanın protein ikincil yapılarında bir değişimin olabileceğini göstermektedir. PHD grubunun HD grubuna göre daha yüksek değerlere sahip olduğu ve kontrol gruplarına daha benzer bir dağılım gösterdiği saptandı. HD grubunda meydana gelen obezite ve tip 2 diyabet kaynaklı protein ikincil yapısı değişimlerinin PHD grubunda daha az görölmesinin sebebi palmitoleik asitin sözkonusu iyileştirici etkisinden kaynaklı olabilir. Tüm gruplar için genel olarak subkütan ve viseral adipoz dokulara ait oranlarda önemli bir farklılık görölmedi.

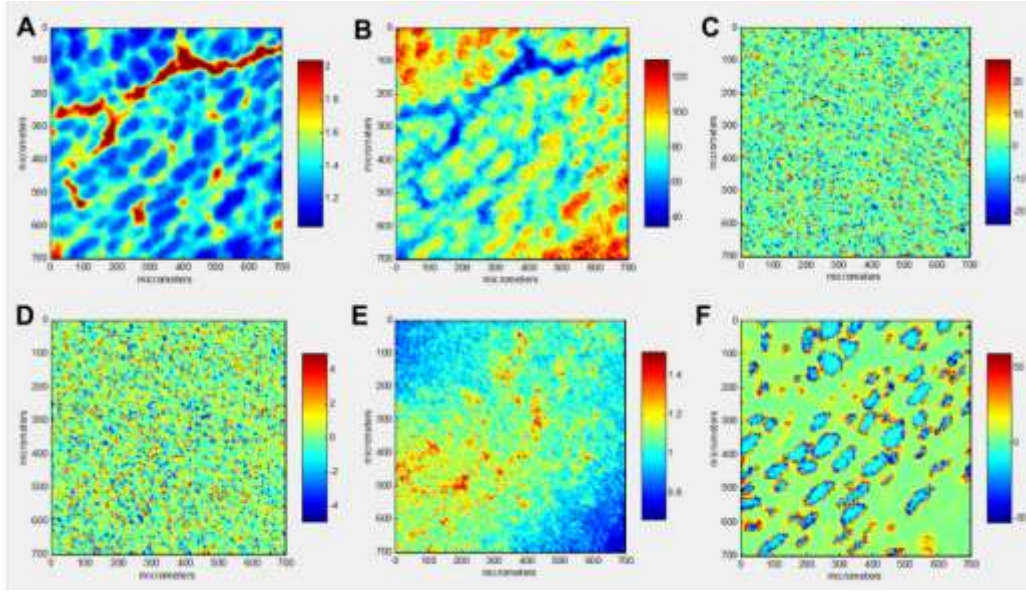
Çalışmamızda verilen FTIR mikrospektroskopi sonuçları, bir sonraki kısım olan ATR-FTIR spektroskopisi kısmında daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Böylece iki tip çalışma birbirini hem doğrulayıcı hem de tamamlayıcı nitelik kazanmıştır.



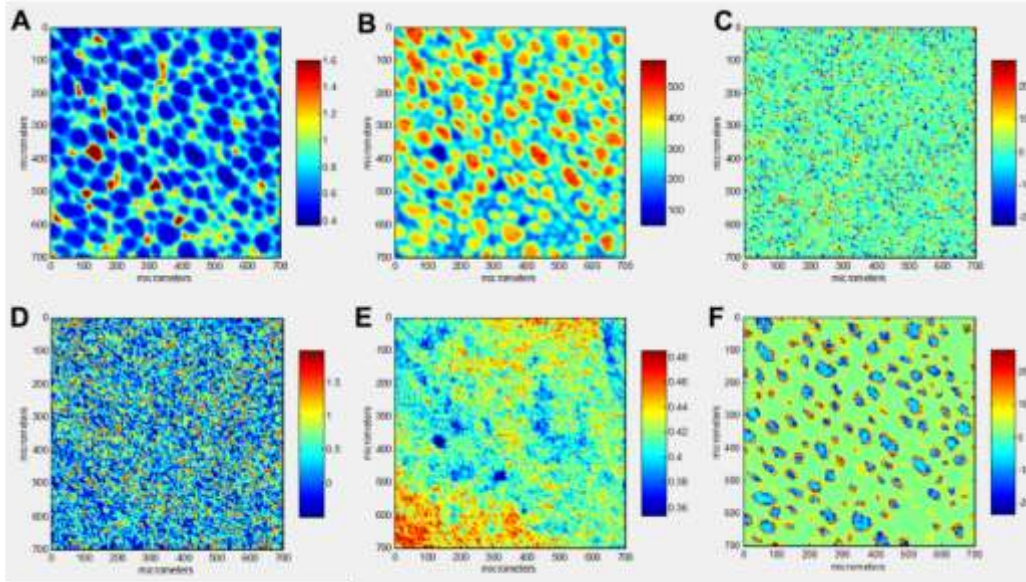
Şekil 13. Kontrol SD grubuna ait subkütan adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH2 antisimetrik gerilim, D) CH2 antisimetrik gerilim/CH3 antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi, ve F) Amid 1/ amide 2.



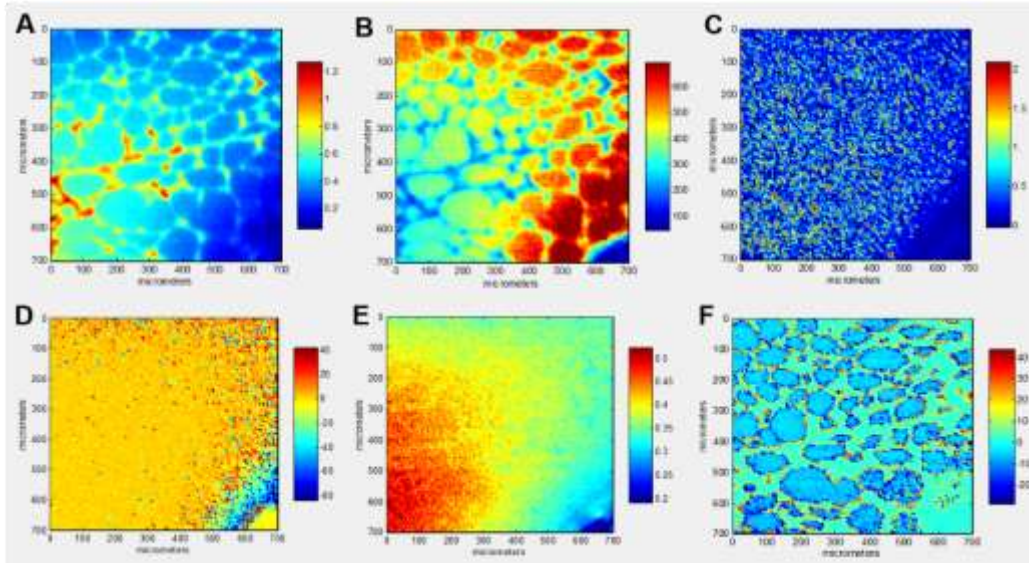
Şekil 14. Kontrol PSD grubuna ait subkütan adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH2 antisimetrik gerilim, D) CH2 antisimetrik gerilim/CH3 antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi, ve F) Amid 1/ amide 2.



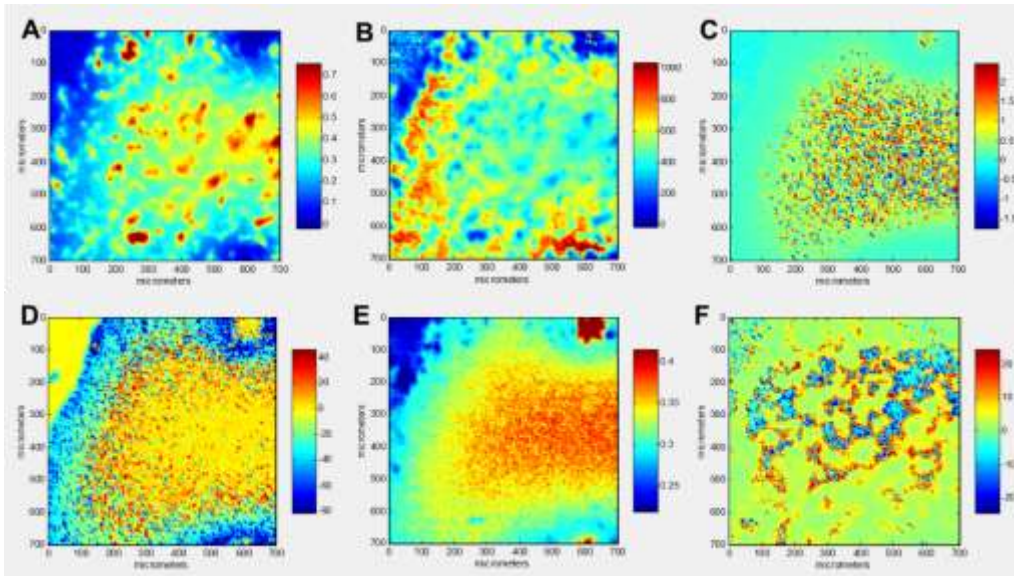
Şekil 15. Kontrol SD grubuna ait visceral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim, D) CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi F) Amid 1/ amide 2.



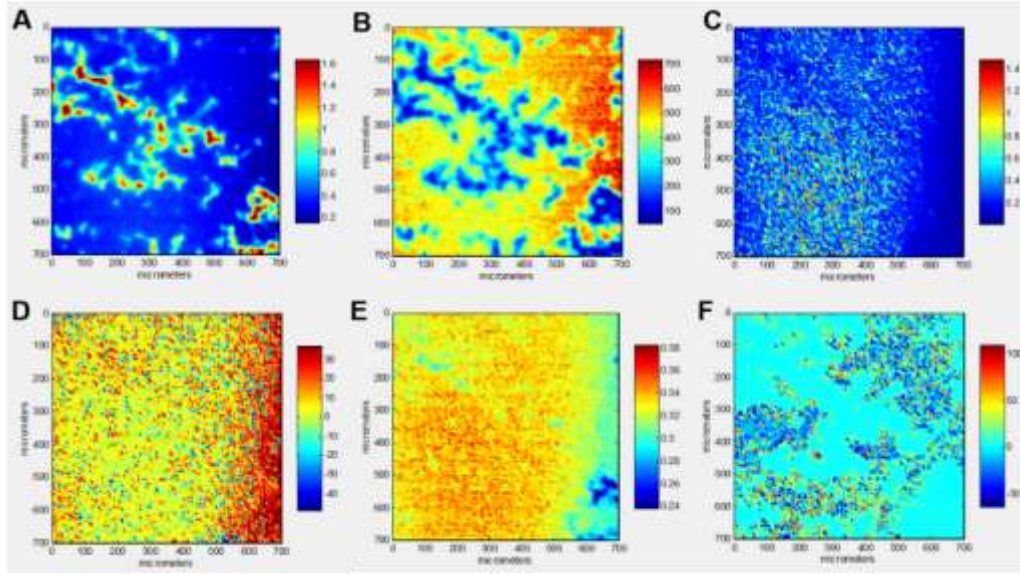
Şekil 16. Kontrol PSD grubuna ait visceral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim, D) CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi F) Amid 1/ amide 2.



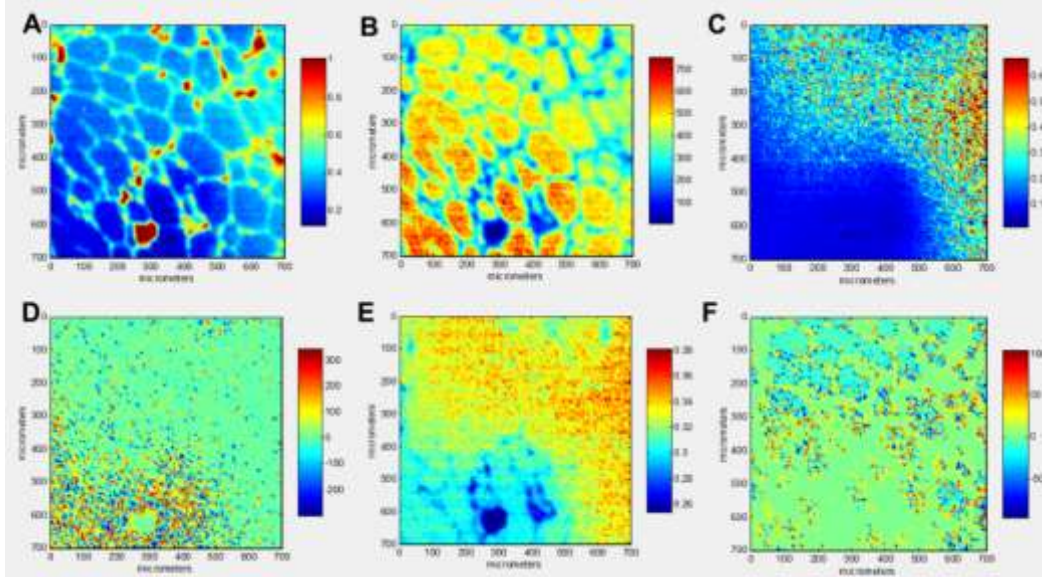
Şekil 17. HD grubuna ait subkütan adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH2 antisimetrik gerilim, D) CH2 antisimetrik gerilim/CH3 antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi F) Amid 1/ amide 2.



Şekil 18. PHD grubuna ait subkütan adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH2 antisimetrik gerilim, D) CH2 antisimetrik gerilim/CH3 antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi F) Amid 1/ amide 2.



Şekil 19. HD grubuna ait visceral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH2 antisimetrik gerilim, D) CH2 antisimetrik gerilim/CH3 antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi F) Amid 1/ amide 2.

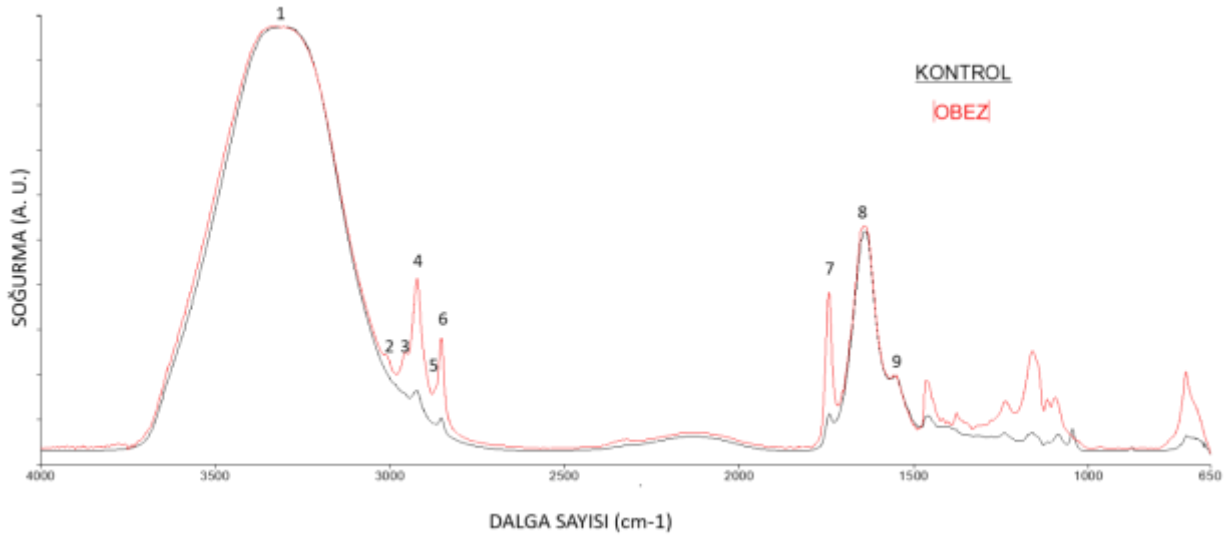


Şekil 20. PHD grubuna ait visceral adipoz dokuların bant alan oranı spektral haritaları. A) amid 1, B) C-H bölgesi/amid 1, C) olefinik/CH2 antisimetrik gerilim, D) CH2 antisimetrik gerilim/CH3 antisimetrik gerilim, E) C=O simetrik gerilim/C-H bölgesi F) Amid 1/ amide 2.

4.4 ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmaları

Moleküllerin değişik dalga boylarındaki titreşim gruplarını görüntüleyerek bu moleküllerin yapısal, fonksiyonel ve dinamik özelliklerinin karakterize edilmesini sağlayan bir teknik olan ATR-FTIR spektroskopik tekniği, projemizde kontrol grubu SD, PSD ve deney grubu olan HD ve PHD'ye ait subkütan ve viseral adipoz dokudaki makromoleküllerin, özellikle lipitlerin ve proteinlerin, relatif miktarlarının ve yapısal özelliklerinin araştırması amacıyla kullanılmıştır.

Şekil 21'de bir adipoz dokunun ham spektrumunun 4000-650 cm^{-1} frekans aralığındaki 3307 cm^{-1} 'de lokalize olan Amid A bandına göre normalize edilen ortalama soğurma bantları gösterilmektedir. Moleküllerdeki değişik fonksiyonel gruplar FTIR spektrumunda karakteristik soğurma bantları oluşturmaktadır (Mantsch, 1984; Diem, 1999; Cakmak v.d., 2006; Ozek v.d., 2009; Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010). Şekil 21'de numaralandırılmış bantların tanımları literatüre göre Tablo 3 (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).’te belirtilmektedir.



Şekil 21. Kontrol ve obez fare adipoz dokularına ait ortalama örnek spektrumlar.

Tablo 3. Adipoz dokusu IR spektrumundaki başlıca soğurmalar.

Bant No	Frekans (cm-1)	Tanım
1	3307	Amid A: N-H gerilme, protein
2	3009	Olefinik HC=CH gerilme: doymamış lipit,
3	2957	CH ₃ antisimetrik gerilme: lipit ve protein
4	2925	CH ₂ antisimetrik gerilme: çoğunlukla lipit
5	2873	CH ₃ simetrik gerilme: başlıca protein
6	2854	CH ₂ simetrik gerilme: başlıca lipit
7	1743	Kolesterol-Ester C=O gerilme: lipit
8	1642	Amid I:protein (80% C=O gerilme, 10% N-H bükülme, 10% C-N gerilme)
9	1551	Amid II: protein (60% N-H bükülme, 40% C-N gerilme)

IR bandlarının sinyal şiddetleri ve bu bandların altında kalan alanlar, adı geçen fonksiyonel grubun konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir (**Freifelder v.d., 1982; Takahashi v.d., 1991; Liu v.d., 2002; Severcan v.d.; 2005; Cakmak v.d., 2006**). Yapılan analizler sonucu elde edilen başlıca fonksiyonel grupların bant alanı değerlerindeki değişimler Tablo 4-5'de gösterilmektedir.

Şekil 21'de görülen ve çalışmamızda incelenecek olan bantlar, olefinik HC=CH gruplarındaki C-H gerilmelerinin titreşimlerinden (2 nolu band), CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinden (band 3), CH₂ antisimetrik gerilme titreşimlerinden (band 4) 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 ve CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinin bant şiddetleri veya bant alanları olarak sistemdeki lipit miktarı hakkında bilgi vermektedir (**Mantsch, 1984; Severcan v.d., 2000, Cakmak v.d., 2011**). Protein kaynaklı amid I bandı %80 oranında C=O gerilme, %10 oranında C-N gerilme ve %10 oranında N-H bükülme titreşimlerinden ve yine protein kaynaklı bir başka band olan 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**). Bahsi geçen tüm bantlarının alan değerleri Tablo 4 ve 5'de gösterilmektedir.

Tablo 4. Tüm gruplarda subkütan adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı değerleri arasındaki farklılıklar.

Subkütan Adipoz Doku Bant Alan Değerleri	SD	PSD	HD	PHD
Olefinik	0.68±0,13	0.65±0,09	0.51±0,08**	0.64±0,07**§§
C-H Bölgesi	11.14±2.12	11.40±1.21	15.53±2.20**	14.62±1.30**
CH ₃ antisimetrik	1.59±0.27	1.54±0.16	0.78±0.30**	1.08±0.16*§
CH ₂ antisimetrik	5.62±1.10	5.78±0.59	6.80±1.06**	6.28±0.64*§
Karbonil (Ester)	4.50±0.98	4.93±0.59	8.00±0.96***	6.84±0.60**§§
Amid I	2.23±0.89	2.08±0.67	1.76±0.64**	1.98±0.54*§
Amid II	0.79±0.36	0.84±0.28	1.06±0.49*	0.94±0.37*§

Tablo 5. Tüm gruplarda visceral adipoz dokularının spektrumlarında görülen bant alanı değerleri arasındaki farklılıklar.

Viseral Adipoz Doku Bant Alan Değerleri	SD	PSD	HD	PHD
Olefinik	0.75±0.10	0.72±0.09	0.66±0.13**	0.68±0.12*§
C-H Bölgesi	12.13±1.99	12.08±1.54	13.00±0.97*	12.45±1.12*§
CH ₃ antisimetrik	1.78±0.14	1.77±0.15	0.87±0.27**	1.13±0.20*§
CH ₂ antisimetrik	5.54±0.96	5.57±0.75	6.98±0.47*	5.91±0.56*
Karbonil (Ester)	4.64±0.89	4.74±0.71	6.12±0.46**	5.58±0.56**§§
Amid I	2.50±0.92	2.75±1.14	1.83±0.77*	2.24±1.07*§
Amid II	1.22±0.58	1.40±0.68	1.91±0.42*	1.56±0.60*§

C-H toplam alanının amid I bant alanına oranlanması ile elde edilen lipid/protein oranı şekil 22-23'de görülmektedir. Bu oran obez HD ve PHD gruplarında istatistiksel anlamda daha yüksek, kontrol grupları SD ve PSD'de ise daha düşük olarak tespit edildi. Subkütan dokuda bu orandaki

artış viseral dokuya oranla daha fazladır. PHD grubundaki artış HD grubuna göre daha azdır yani palmitoleik asit uygulaması sonucunda beklendiği gibi kontrole yaklaşmış bir seviyede bulunmuştur. Bu sonuçlar FTIR mikrospektroskopi sonuçlarımızla uyum içindedir.

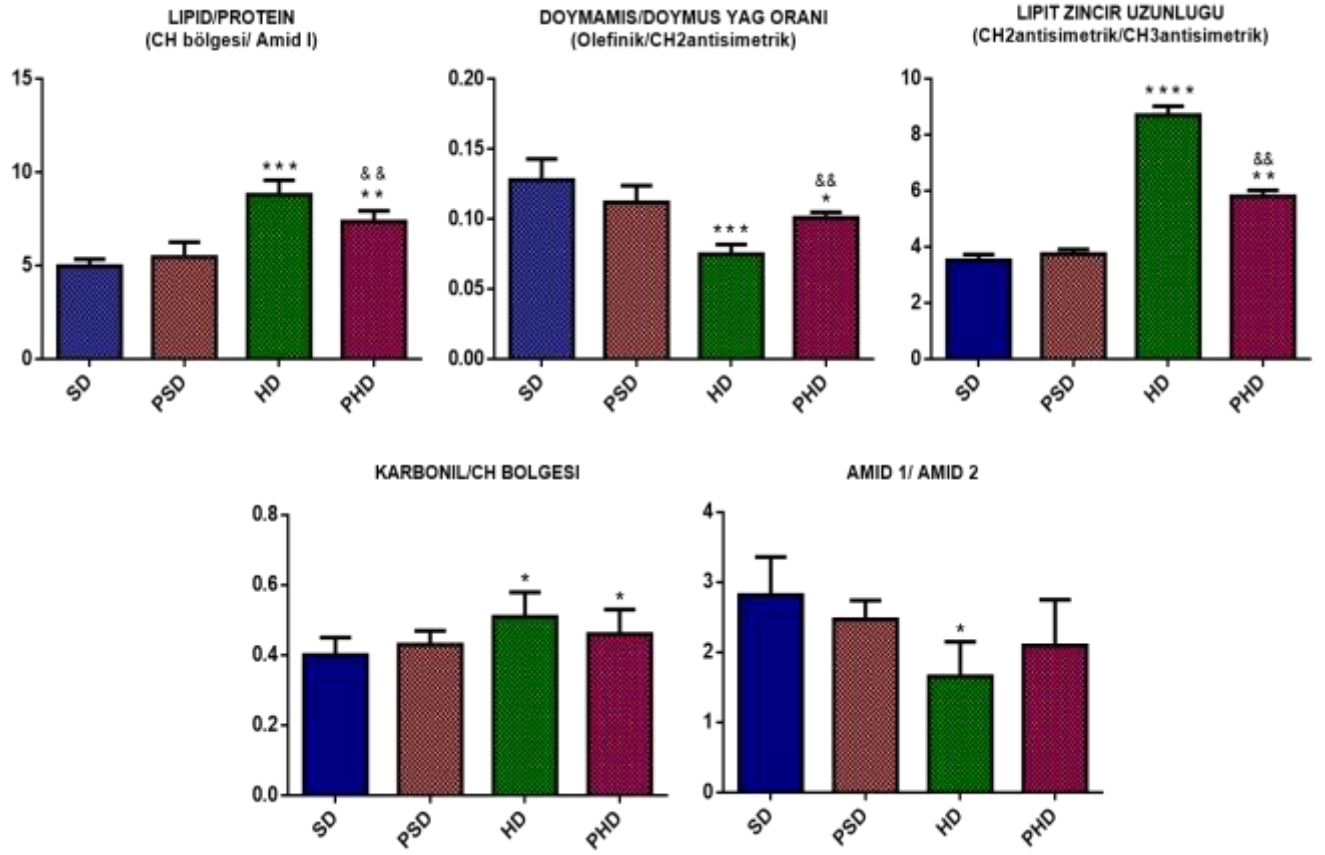
3010 cm^{-1} konumunda gözlenen ve doymamış yağ asitlerinde bulunan HC=CH gruplarının C-H bağlarındaki gerilme titreşimlerinden kaynaklanan bandın şiddeti veya altındaki alan hidrokarbon zincirlerinin doymamışlığı hakkında bilgi vermektedir (**Takahashi v.d., 1991; Melin v.d., 2000; Cakmak v.d., 2003; Severcan v.d., 2005a, Bozkurt v.d., 2010; Ozek v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Olefinik/C-H bölgesi gerilim oranı ise doymamış/doymuş yağ oranı hakkında bilgi vermektedir. Bu bandın alan değerlerine göre, doymamış yağ miktarında obez HD ve PHD gruplarında kontrol grubu olan SD ve PSD grubuna göre anlamlı bir şekilde azalma tespit edildi (Şekil 22-23). Söz konusu azalmalar subkütan dokuda viseral dokuya oranla çok daha anlamlı olarak saptandı. PHD grubunda HD grubuna göre kontrole göre yaklaşma olarak kabul edilebilecek bir artış görüldü.

CH_2 antisimetrik/ CH_3 antisimetrik bant alan oranları lipit açıl zincir uzunluğu hakkında bilgi verir ve bu değer düşük olması lipitlerin açıl zincirlerinin daha kısa olduğunun bir işaretidir (**Bozkurt v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Kontrol grupları ile kıyaslandığında obez gruplar olan HD ve PHD grubunda hem subkütan hem de viseral adipoz doku için istatistiksel anlamda oldukça anlamlı artış görüldü (Şekil 22-23). Bu artış, lipitlerin açıl zincirlerinin bu gruplarda daha uzun olduğunu göstermektedir. HD ve PHD grupları karşılaştırıldığında ise PHD grubunda bu oranın HD'ye oranla daha düşük olduğu yani kontrol gruplarına ait değerlere daha yakın olduğu saptandı.

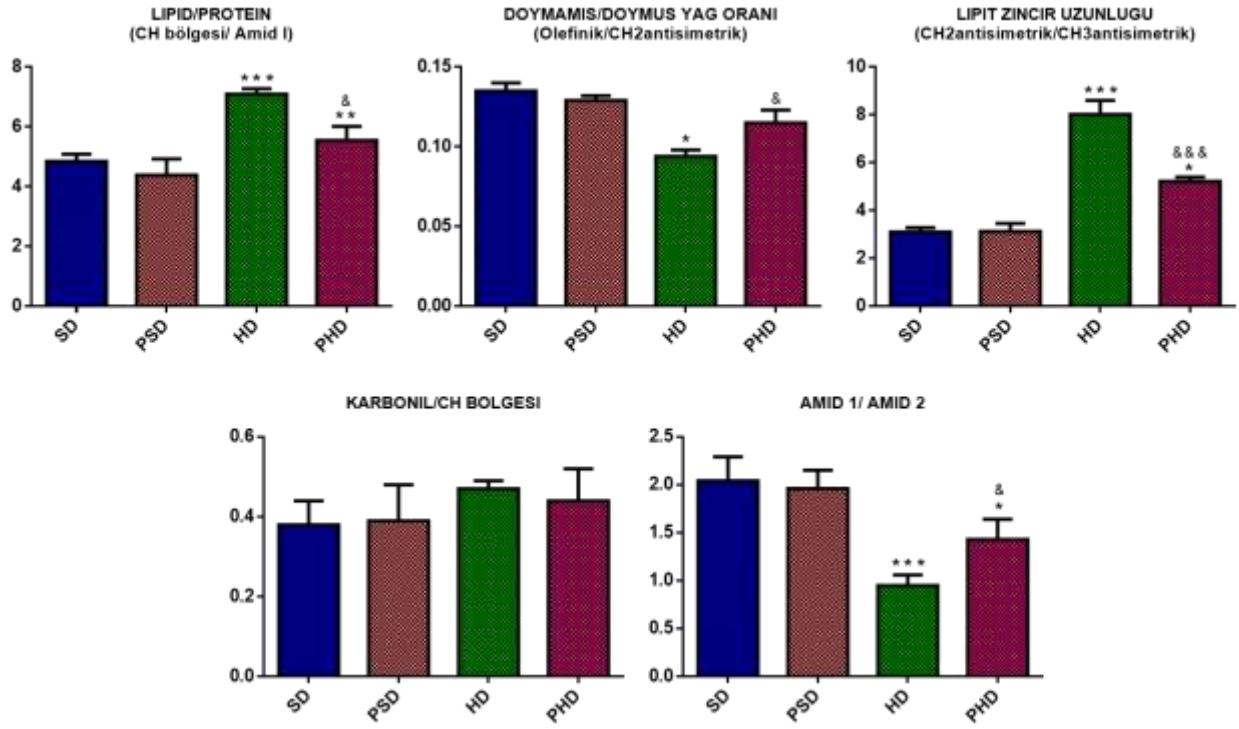
1800-1700 cm^{-1} aralığında görülen C=O gerilme titreşim bandı trigliserit ve kolesterol esterlerinden kaynaklanır. Her iki tip adipoz dokuda da, özellikle subkütan adipoz dokuda trigliserit ve kolesterol ester miktarı viseral adipoz dokuya nazaran daha yüksektir. Bu bant alanında, obez gruplar olan HD ve PHD gruplarında trigliserit ve kolesterol miktarı kontrol grubu olan SD ve PSD gruplarına göre daha da artmış bulunmaktadır. Şekil 22-23'de ester C=O gerilme titreşiminden kaynaklanan bant alanının C-H bölgesine (toplam lipit miktarına) bölünmesi ile elde edilen ve tüm lipitlerin içerisindeki karbonil miktarını gösteren oran görülmektedir. Her iki adipoz dokuda da HD ve PHD gruplarına ait karbonil/C-H bölgesi oranının yüksek olması lipit içeriklerinin büyük bir bölümünün trigliserit ve kolesterol esterlerden oluştuğuna işaret etmektedir. PHD grubundaki

artışın HD grubundaki kadar olmamasının sebebi ise palmitoleik asit uygulamasının trigliserit depolanmasına engel olması olabilir.

Amid 1 ve amid 2 bandları titreşim frekansları protein ikincil yapılarındaki olası değişimleri hakkında bilgi verir (**Haris ve Severcan, 1999; Jackson v.d., 1998, Lyman v.d., 1999**). İncelenen ırklarda amid I bant frekansı 1645 cm^{-1} civarında tespit edilirken amid II bant frekans değeri yaklaşık 1543 cm^{-1} civarında gözlemlendi. Protein yapılarında bir farklılık olup olmadığı hakkında bilgi edinebilmek için birbirinden farklı oranlarda C=O, N-H ve C-N titreşimlerinden kaynaklanan amid I bant alanı, amid II bant alanına oranlandı ve elde edilen sonuçlar subkütan ve viseral dokular için sırasıyla Şekil 22 ve 23'de gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, bu oranın özellikle viseral adipoz dokuda olmak üzere her iki dokuda da obez HD ve PHD gruplarında azalma gösterdiği saptandı. Bu sonuçlar, obez gruplara ait adipoz dokularda protein ikincil yapılarında bir değişimin olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca PHD grubu HD grubu ile karşılaştırıldığında artış göstermesi yine palmitoleik asit etkisini akla getiren bir unsurdur.



Şekil 22. Tüm gruplara ait subkütan adipoz doku bant alan oranları.



Şekil 23. Tüm gruplara ait viseral adipoz doku bant alan oranları.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

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 asimetrik dağılımını değiştirdiğini, bunun da çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Örneğin doymamış/doymuş lipit ve lipit/protein oranlarındaki değişimin membran kalınlığını ve lipit düzeni diğer bir deyimle membran yapısını değiştirdiğini ve bunun da membran akışkanlığı ile ilgili olduğu ve iyon akımları kinetiği ve fonksiyonunu altüst ettiği 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 diğer 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)**.

ATR-FTIR spektroskopisi çalışmalarında. standart diyet ile beslenmiş SD ve PSD kontrol grupları ile yüksek yağ içerikli diyet ile beslenmiş HD ve PHD deney gruplarına ait adipoz doku kesitlerinde C-H toplam alanının amid 1 bant alanına oranlanması ile elde edilen lipit/protein spektral parametresinin dağılımı hesaplandı. Obez ve tip 2 diyabet olan deney gruplarımızda bu oran kontrol gruplarına nazaran istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olarak saptandı. Lipit/protein oranında gözlenen artış obezite sonucu adiposit sayı ve hacmindeki artış ile birlikte lipit miktarındaki artımın oldukça fazla olmasından kaynaklanabilir. Adipoz doku miktarının artması, adipozitlerin hiperplazisi (hücrelerin anormal çoğalması) ve hipertrofinine (aşırı büyüme) yoluyla oluşmakta ve obezitenin başlıca nedenini oluşturmaktadır **(Rodeheffer v.d., 2008)**.

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**). Obez gruplarımız olan HD ve PHD gruplarında bu banda ait alanın kontrol grubu olan SD ve PSD'ye göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu saptandı. Olefinik bant alanında görülen bu azalmanın nedeninin, artan lipit peroksidasyonu sonucu dokudaki doymamış yağ asitlerinin azalmasına bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Doymuş ve doymamış yağ miktarlarında meydana gelen bu değişimler, doymamış açil zincirlerin çift bağlarının bozulmasından kaynaklanmakta olup lipit peroksidasyonundaki artışı göstermektedir (**Bruch v.d., 1983; Curtis v.d., 1984; Bozkurt v.d., 2010; Severcan v.d., 2010; Cakmak v.d., 2011**). Hem ATR-FTIR spektroskopi hem de FTIR mikrospektroskopi sonuçları band alan oranı analizlerinde sözkonusu sonuçlarla uyumlu olarak doymamış/ doymuş yağ oranının (Olefinik/ CH₂ antisimetrik) obez gruplarda kontrole göre azalmış olduğu tespit edildi. PHD grubunda görülen olefinik bant alanı ve doymamışlık indeksinin HD grubundaki kadar düşük olmaması ve hatta aralarında anlamlı bir fark görülmesi ise palmitoleik asitin sözkonusu lipit peroksidasyona karşı koruyucu bir etkisi olabileceğini göstermektedir.

Lipit yapılarındaki hidrokarbon zincir uzunluğunun dağılımı hakkında bilgi veren CH₂ antisimetrik bant alanının CH₃ antisimetrik bant alanına oranının dağılımı ATR-FTIR çalışmaları ile hesaplanan bir başka band alan oranıdır. Deney gruplarımız olan HD ve PHD gruplarında artmış olduğunu saptadığımız bu oranın yüksek olması bu grup farelere ait adipoz dokularda daha uzun hidrokarbon zincirli lipitlerin sentezinin daha yoğun yer aldığını göstermektedir (**Wang vd., 2005; Cakmak vd., 2012**). Obezite sebebiyle yüksek miktarda yağ birikimi olan hücrelerde bu oranın artması beklenen bir sonuç olmakla beraber artan lipit hidrokarbon zincir uzunluğu özellikle hücre membranının kalınlığını değiştirerek yapısını bozmakta ve pek çok metabolizmal giriş çıkışı kontrol eden hücre membran sistemine zarar vermektedir.

Kontrol ve deney gruplarına ait subkütan ve viseral adipoz dokularındaki protein yapılarında bir farklılık olup olmadığı hakkında bilgi edinebilmek için birbirinden farklı oranlarda C=O, N-H ve C-N titreşimlerinden kaynaklanan amid I bant alanı, amid II bant alanına oranlanmıştır. Obez gruplarımız olan HD ve PHD gruplarında bu oranın kontrol grubu olan SD ve PSD'ye göre daha

düşük olduğu saptandı. Bu sonuçlar, deney gruplarında kontrol gruplara göre protein ikincil yapılarında bir değişimin olabileceğine işaret etmektedir **(Kucuk Baloglu vd., 2015)**.

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 trigliserit 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)**. Trigliseritlerin 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)**. Bu bilgilerden yola çıkarak adipoz doku spektrumları parmak izi bölgesinde yer alan, trigliseritler ve kolesterol esterlerinden kaynaklanan 1745 cm^{-1} bandı alanı analizleri ve karbonil/lipit band alanı oranları sonucunda, HD ve PHD gruplarının trigliserit konsantrasyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. Trigliseritlerin ve lipitlerin obez farelere ait adipoz dokularda bu şekilde yoğun depo edilmesinin insülin direnci ile pozitif ilişkili olduğu bilinmektedir **(Pan vd., 1997; Phillips vd., 1996)**. Adipoz doku miktarının artması, adipozitlerin hiperplazisi (hücrelerin anormal çoğalması) ve hipertrofinine (aşırı büyüme) sebep olur ve bu durum obezitenin oluşması ile ilişkilendirilmektedir **(Rodeheffer v.d., 2008)**. Uyumlu olarak FTIR mikrospektroskopisi sonuçlarında SD ve PSD kontrol gruplarında görülen küçük yapıli adipositlerin HD ve PHD obez gruplarında yerini daha büyük adipositlere bırakmış olduğu görüldü. Bu şekilde genişlemiş adipozitlerce salgılanmış yüksek miktarlardaki serbest yağ asitleri insülin direnci gelişiminde önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir **(Hotamışlıgil vd., 1995)**.

Söz konusu insülin direncinin varlığı tip 2 diyabetin en büyük göstergesidir. Çalışmamızda yüksek yağ içerikli diyetle beslenerek obez olan HD ve PHD grubu farelerin bu süre sonunda tip 2 diyabet oldukları yapılan OGGT testi sonucunda hem glukoz hem de insülin seviyeleri ile gösterildi. Palmitoleik asit uygulaması gören PHD grubu fareler ile görmeyen HD grupları bu süre sonunda tekrar OGTT testine sokulduğunda PHD grubu farelerin hem glukoz hem de insülin seviyelerinde düşüş yani düzelme olduğu saptandı. Ayrıca yapılan vücut ağırlığı ölçümlerinde HD ve PHD grubu fareler kontrol gruplarına göre sürekli bir artış gösterirken palmitoleik asit uygulaması sürecinde yüksek yağ içerikli diyetle devam etmesine rağmen PHD grubunda kilo artımının durduğu ve stabil

hale geldiği görüldü. Böylece palmitoleik asitin hem obezite hem de tip 2 diyabet üzerinde iyileştirici etkisinin varlığı fiziksel ve fizyolojik açıdan gösterildi.

Projemizde yer alan band alan oranları hem FTIR mikroskopisi hem de ATR-FTIR spektroskopisi ile çalışılmış ve analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Birbirini destekler ve doğrular nitelikte olan tüm bu sonuçlar palmitoleik asitin obezite ve tip 2 diyabet kaynaklı moleküler değişimler üzerine iyileştirici etkisini kanıtlar niteliktedir. Yukarıda anlatılan ATR-FTIR spektroskopisi çalışmaları haricinde yapılan FTIR mikroskopisi çalışmaları dahilinde, SD ve PSD kontrol grupları ve HD ve PHD obez gruplara ait visceral ve subkütan adipoz doku kesitlerden lipid/protein dağılımı (C-H/amid 1), lipidlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim), doymamış/doymuş lipidlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim), lipid içeriğindeki karbonil grubu miktarı (Karbonil (C=O) gerilim bant alanı/C-H gerilim bölge alanı) ve amid1/ amid2 dağılımı oranları hesaplandı. Genel olarak obez gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek lipid/protein dağılımı, yüksek miktarda trigliserit içeriği (karbonil, C=O) ile daha uzun zincirli lipid yapıları bulunduğu tespit edildi. Fakat PHD gruplarında dikkat çeken nokta obezitenin ve tip 2 diyabet kaynaklı olabilecek yukarıda saydığımız negatif faktörlerden HD grubu kadar etkilenmemiş olduğudur. Hatta çoğu band alanı oranında PHD grubu ile HD grubu arasında istatistiksel bir fark olduğu ve PHD grubuna ait değerlerin kontrol grubu değerlerine yaklaştığı saptanmıştır. Tüm bu bulgular palmitoleik asitin hem obezite hem de tip 2 diyabet kaynaklı moleküler değişimler üzerinde geri çevirici yani iyileştirici etkisini göstermektedir. İlgili literatür incelendiğinde palmitoleik asitin İnsülin duyarlılığını değiştiren bir etki olarak, proinflamatuvar gen ekspresyonunu baskılayarak ve hepatik lipid metabolizmasını iyileştirerek, diyabetik farelerde insülin duyarlılığını arttırarak hiperglisemi ve hipertrigliseridemiye zayıflattığı görüldü (**Yang vd., 2011**). Palmitoleik asit karaciğer yağ depolama ve üretimi, insülin faaliyetleri, palmitat ve yağ asidi sentezinde etkisi olması sebebiyle hormon benzeri etkiye sahip bir lipokin olarak ifade edilmektedir (**Hodson and Karpe, 2013**). Yapılan çalışmalarda palmitoleik asitin kas insulin aksiyonunu uyarabilen ve hepatosteatozu baskılayabilen adipoz doku kaynaklı bir lipid hormon olabileceği gösterilmiştir (**Cao vd., 2008**). Yapılan diğer çalışmalarda ise palmitoleik asitin vücut ağırlığını etkileyen bir sinyal molekülü olabileceğini gösterilmiş (**Zelkowitz, 2008**), ve palmitoleik asitin yağ oksidasyonunu etkileyen enzimlerce kullanıldığını belirtilmiştir (**Power vd., 1997**).

Obezite kaynaklı tip 2 diyabet hastalığının lipid ve glukoz metabolizması üzerinde önemli etkisi olması sebebiyle diyetle indüklenmiş obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığı üstünde yapılmış bu

biyofiziksel araştırma bu hastalıkların tedavi sürecine ışık tutma potansiyeline sahiptir. Bu sebeple çalışmamız obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının adipoz dokudaki moleküler kompozisyon üzerindeki etkilerini ve palmitoleik asitin bu söz konusu etkiler üzerine var olan terapötik etkisini ortaya çıkarmıştır. Bu alışma, gelecekte palmitoleik asitin bir anti-obezite ve anti-diyabetik ilaç olma potansiyeli üzerine yapılabilecek araştırmalar için temel olabilecek niteliktedir. Ayrıca projemiz dahilinde yapılan ön çalışmalar, palmitoleik asitin terapötik etkisinin ortaya çıkarılması konusunda ileride yapılacak detaylı temel ve klinik düzeyde çalışmalara yön verecek olması nedeniyle de önemlidir.

Palmitoleik asitin anti-obezite ve anti-diyabetik etkisinin kesinlik kazanması ve tedavi sürecinde kullanılabilmesi için,

- Palmitoleik asitin adipoz doku haricinde obezite ve tip 2 diyabet için kritik önemi olan karaciğer, pankreas gibi organlarda olan etkisi de aynı yöntemlerle incelenebilir.
- Palmitoleik asitin adipoz doku üzerindeki söz konusu etkisi farklı prensiplere dayalı tekniklerle (konfokal mikroskop, atomik kuvvet mikroskop) de incelenerek söz konusu terapötik etkisi bu sonuçlarla desteklenebilir.
- İleri çalışmalarda daha fazla sayıda hayvanla ve sonrasında insan çalışmalarının yapılmasıyla klinik faz çalışmaları tamamlanarak palmitoleik asitin anti-obezite ve anti-diyabetik etkisi kesinlik kazanabilir ve palmitoleik asit ilaç sanayinde bir etken madde olarak kullanılacaktır.

KAYNAKÇA

- Adipoz dokunun genel görünümü <https://www.quia.com/jg/2570646list.html>. Son erişim tarihi:09.10.2016.
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F. 2000. "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.
- Alo, F., Brun, P., Cont, C., Gorgini, E., Rubi, C., Tosi, G. 1998. "Fourier Transform Spectroscopy, : 11th International Conference", The American Institute of Physics.
- Arner, P. 2001. "Free fatty acids - do they play a central role in type 2 diabetes?", *Diabetes Obes. Metab.*, 1 (3), 11-19.
- Astrup, A., Finer, N. 2000. "Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'?", *Obes. Rev.*, 1(2), 57-9.
- Awayda, M.S., Shao W., Guo F., Zeidel M., Hill W.G. 2004. "ENaC-membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order", *J. Gen. Physiol.*, 123, 709–727.
- Azain, M.J. 2004. "Role of fatty acids in adipocyte growth and development", *J. Anim. Sci.*, 82, 916–924.
- Bays, H. E., Gonzalez-Campoy, J. M., Bray, G. A., Kitabchi, A. E., Bergman, D. A., Schorr, A. B., Rodbard, H. W., Henry, R. R. 2008. "Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity" *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, 6 (3), 343–368.
- Bell, C.G., Walley, A.J., Froguel, P. 2005. "The genetics of human obesity", *Nat. Rev. Genet.*, 6, 221–234.
- Berg, A.H., Scherer, P.E. 2005. "Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease", *Circ. Res.*, 96, 939–949.
- Blake, G.J., Ridker, P.M. 2002. "Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction", *J. Intern. Med.*, 252, 283–294.
- Boden, G. 2001. "Free Fatty Acids The Link Between Obesity And Insulin Resistance", *Endocrine Practice*, 7, 44-51.
- Boskey, A., Camacho, N.P. 2007. "FT-IR Imaging of Native and Tissue Engineered Bone and Cartilage", *Biomaterials*, 28, 2465-2478.
- Boyar, H., Severcan, F. 1997. "Tamoxifen-Phospholipid Model Membrane Interactions: An FT-IR Study", *J. Molecular Structure*, 408 (409), 265-268.

- Bozkurt, O., Severcan, M., Severcan, F. 2010. "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.
- Bozkurt, O., Bayari, S. H., Severcan, M., Krafft, C., Popp, J., Severcan, F. 2012. "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).
- Bozkurt, O., Bilgin, M.D., Severcan, F. 2007. "The effect of diabetes mellitus on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue: An FTIR study.", *Spectroscopy an Int J.*, 21 (3), 151-160.
- Bruch, R.C., Thayer, W.S. 1983. "Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes", *Biochim. Biophys. Acta*, 733, 216-222.
- Busch, A.K., Gurisik, E., Cordery, D.V., Sudlow, M., Denyer, G.S., Laybutt, D.R., Hughes, W.E., Biden, T.J. 2005. "Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis" , *Diabetes*, 54, 2917–2924.
- Cakmak, G., Zorlu, F., Severcan, M., Severcan, F. 2011. "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.**
- Cakmak, G., Togan, I., Severcan, F. 2006. "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.
- Cakmak, G., Miller, L.M., Zorlu, F., Severcan, F. 2012. "Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: An FTIR microspectroscopic imaging study.", *Arch Biochem Biophys.*, 520, 67-73.
- Cakmak, G., Togan, I., Severcan, F. 2003. "FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol", *Applied Spectroscopy*, 57 (7), 835-841.
- Camacho, N. P., Rinnerthaler, S., Paschalis, E.P., Mendelsohn, R., Boskey, A.L., Fratzl, P. 1999. "Complementary Information on Bone Ultrastructure from Scanning Small Angle X-ray Scattering and Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy", *Bone*, 25, 287-293.
- Cameron, P.G., Charette, G.M. 1981. "Automation of Fourier Transform Infrared of Temperature-Induced Phenomena", *Appl. Spectrosc.*, 35, 224.

- Camila, O.S., Alexandre A.S.T., Edson A.L. 2014. "Palmitoleic Acid (N-7) Attenuates the Immunometabolic Disturbances Caused by a High-Fat Diet Independently of PPAR α ," Mediators of Inflammation, 2014, 12 sayfa.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., Hotamisligil, G. S. 2008. "Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism.," Cell, 134 (6), 933-44.
- Cesur, G., Gökçimen, A. 2012. "Yağ dokusunun işlevsel sınırları.," Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,13(2), 47-53.
- Chan, J. M., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C. 1994. "Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men.," Diabetes Care,17(9), 961-9.
- Charles, M. A., Eschwege, E., Thibault, N., Claude, J. R., Warnet, J. M., Rosselin G. E., Girard, J., Balkau, B. 1997. "The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study.," Diabetologia, 40, 1101-1106.
- Curtis, M.T., Gilfor, D., Farber, J.L. 1984. "Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes," Arch. Biochem.Biophys., 35, 644–649.
- Diem, M., Boydston-White, S., Chiriboga, L. 1999. "Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject.," Applied Spectroscopy, 53, 148A-161A.
- Dogan, A., Ergen, K., Budak, F., Severcan, F. 2007. "Evaluation of Disseminated Candidiasis on an Experimental Animal Model: An FTIR Study.," Applied Spectroscopy, 61,2, 199-203.
- Edens, N. K., Fried, S. K., Kral, J. G., Hirsch, J., Leibel, R. L. 1993. "In vitro lipid synthesis in human adipose tissue from three abdominal sites.," Am. J. Physiol., 265, E374-379.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjorbaek, C., Flier, J.S. 2000. "Two Defects Contribute to Hypothalamic Leptin Resistance in Mice with Diet-induced Obesity.," J. Clin. Invest., 105,1827–1832.
- Fantuzzi, G. 2005. "Adipose tissue, adipokines, and inflammation.," J Allergy Clin. Immunol., 115, 911–919.
- Farnier, S., Krief, M., Blache, F., Diot-Dupuy, G., Mory, P., Ferre, R., Bazin, R. 2003. "Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway", Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord., 27, 1178- 1186.
- Fernandez, D.C., Bhargava, R., Hewitt, S.M., Levin, I.W. 2005. "Infrared spectroscopic imaging for histopathological recognition.," Nat. Biotechnol., 23(4), 469-474.

- Ferranti, S., Mozaffarian, D. 2008. "The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences.", *Clinical Chemistry*, 54,6 945–955.
- Freifelder, D. 1982. *Applications to biochemistry and molecular biology*. New York: Physical Chemistry, Freeman Press.
- Fruchbeck, G. 2008. "Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders.", *Methods Mol Biol.*,456,1-22.
- Furler, S.M., Oakes, N.D., Watkinson, A.L., Kraegen, E.W. 1997. "A high-fat diet influences insulin-stimulated posttransport muscle glucose metabolism in rats.", *Metabolism*, 46, 1101–1106.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. 2004. "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J. Clin. Invest.*,114(12), 1752-61.
- Garip, S., Gozen, A.C., Severcan, F. 2009. "Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates.", *Food Chemistry*, 113(4), 1301-1307.
- Gedik, O. 2003. "Obezite ve Çevresel Faktörler.", *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, Suppl. 2*, 1-4.
- Gerich, J.E. 2003. "Contributions of Insulin-Resistance and Insulin-Secretory Defects to the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus.", *Mayo Clin. Proc.*, 78, 447–456.
- Gorgulu, T. S., Dogan, M., Severcan, F. 2007. "A Novel Method In The Characterization of Higher Plants: FTIR Spectroscopic Study of *Ranunculus*, *Acantholimon* and *Astragalus*.", *Applied Spectroscopy*, 61(3), 300-308.
- Griebe, M., Daffertshofer, M., Stroick, M., Syren, M., Ahmad-Nejad, P., Neumaier, M., Backhaus, J., Hennerici, M.G., Fatar, M. 2007. "Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease", *Neurosci. Lett.*, 420(1), 29-33.
- Haris, P., Severcan, F. 1999. "FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media.", *J. Molecular Catalysis: B (Enzymatic)*, 7, 207-221.
- Hodson, L., Karpe, F. 2013. "Is there something special about palmitoleate?", *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 16 (2), 225–231.
- Hotamisligil G.S. 2003. "Inflammatory pathways and insulin action.", *International Journal of Obesity*, 27, 53–55.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., Spiegelman, B.M. 1996. "IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α and Obesity-Induced Insulin Resistance", *Science* 271,665– 668.

- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M. 1993. "Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance", *Science*, 259, 87–91.
- Ivkovic-Lazar, T. 2003. "Development and differentiation of adipose tissue.", *Med. Pregl.*, 56, 3-4,142-5.
- Jackson, M., Ramjiawan, B., Hewko, M., Mantsch, H.H. 1998. "Infrared microscopic functional group mapping and spectral clustering analysis of hypercholesterolemia rabbit liver.", *Cell. Mol. Biol.*, 44(1), 89-98.
- Jensen, M. D., Haymond, M. W., Rizza, R. A., Cryer, P. E., Miles, J. M. 1989. "Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity.", *Clin. Invest.*, 83(4), 1168-73.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M. 2006. "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.", *Nature*, 444,840–846.
- Kanety, H., Hemi, R., Papa, M.Z., Karasik, A. 1996. "Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1.", *J. Biol. Chem.*, 271, 9895–9897.
- Kazarian, S., Chan, K. 2006. "Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples.", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(7), 858-867.
- Kidder, R., Ziegler, C., Wessels, J.M. 1997. " γ -Irradiation and UV-C light-induced lipid peroxidation: A Fourier transform-infrared absorption spectroscopic study.", *Int. J. Radiat. Biol.*, 71(5), 561-571.
- Klein, S. 2004. "The case of visceral fat: argument for the defense.", *J. Clin. Invest.*, 113 (11), 1530-2.
- Kneipp, J., Beekes, M., Lasch, P., Naumann, D. 2002. "Molecular changes of preclinical scrapie can be detected by infrared spectroscopy.", *J. Neurosci.*, 22, 2989-2997.
- Krafft, C., Sergo, V. 2006. "Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues.", *Spectroscopy*, 20, 195–218.
- Kretlow, A., Wang, Q., Beekes, M., Naumann, D., Miller, L.M. 2008. "Changes in protein structure and distribution observed at pre-clinical stages of scrapie pathogenesis.", *Biochimica et biophysica acta*, 1782(10) , 559-565.
- Kucuk Baloglu, F., Garip, S., Heise, S., Brockmann, G., Severcan, F. 2015. "FTIR imaging of structural changes in visceral and subcutaneous adiposity and brown to white adipocyte transdifferentiation", *Analyst*, 140, 2205-14.

- Leskovjan, A.C., Kretlow, A., Miller, L.M. 2010. "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.
- 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. 2005 "The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species", *J. Biol. Chem.* 280(6), 4617-26.
- 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. 2007. "Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: Role of augmented plasma cholesterol.", *Pathophysiology*, 14, 41–46.
- Lyman, D.J., Murray-Wijelath, J. 1999. "Vacular 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.
- Mantsch, H.H. 1984. "Biological application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A study of phase transitions in biomembranes.", *J. Mol. Structure*, 113, 201-212.
- Marette, A. 2002. "Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings.", *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5, 377–383.
- Melin, A.M., Perromat, A., Gerard, D. 2001. "Sensitivity of deinococcus radiodurans to γ irradiation: A novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy.", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394, 265-274.
- Melin, A. M., Perromat, A., Deleris, G. 2000. "Pharmacologic application of fourier transform IR spectroscopy: in vivo toxicity of carbon tetrachloride on rat liver", *Biopolymers*, 57, 160-168.
- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J.H., Coppack, S.W. 1998. "Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ, *Int J Obes Relat Metab Disord.*", 22, 12, 1145-58.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U. 2008. "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues.", *Appl Spectrosc Rev*, 43, 134-179.
- Murdolo, G., Smith, U. 2006. "The dysregulated adipose tissue: A connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis.", *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(1), 35-38.
- Nawrocki, A.R., Scherer, P.E. 2005. "Adipose tissue, adipokines, and inflammation.", *Drug Discovery Today*, 10, 1219–1230.

- Nguyen, L.L., Kriketos, A.D., Hancock, D.P., Caterson, I.D., Denyer, G.S. 2006. "Insulin Resistance Does Not Influence Gene Expression in Skeletal Muscle.", *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39, 457-463.
- Ozek, N.S., Sara, Y., Onur, R., Severcan, F. 2009. "Low dose Simvastatin induces compositional structural and dynamical changes on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue.", *Bioscience Reports*, 30(1), 41-50.
- Ozek, N.S., Tuna, S., Erson-Bensan, A.E., Severcan, F. 2010. "Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy.", *Analyst*, 135(12), 3094-3102.
- Palmitoleik asitin moleküler yapısı. <http://lowcarbsteve.co.uk/ketogenic-fat-chemistry-101>. Son erişim tarihi:10.10.2016.
- Pan, D. A., Lillioja, S., Kriketos, A. D., Milner, M. R., Baur, L. A., Bogardus, C., Jenkins, A. B., Storlien, L. H. 1997. "Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action", *Diabetes*, 46, 983-988.
- Perona, J. S., Portillo, M.P., Macarulla, M.T., Tueros, A.I., Ruiz-Gutierrez, V. 2000. "Influence of dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue.", *Br. J. Nutr.*, 84, 765–774.
- Phillips, D. I., Caddy, S., Ilic, V., Fielding, B. A., Frayn, K. N., Borthwick, A. C., Taylor, R. 1996. "Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects", *Metabolism*, 45, 947-950.
- Pinnick, K.E., Collins, S.C., Londos, C., Gauguier, D., Clark, A., Fielding, B.A. 2008. "Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition.", *Obesity (Silver Spring)*, 16, 3, 522-30.
- Power, G. W., Cake, M. H., Newsholme, E. A. 1997. "The influence of diet on the activity of carnitine palmitoyltransferase 1 toward a range of acyl CoA esters", *Lipids*, 32, 31-37.
- Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K.G., Broedl, U.C. 2008. "Adipokines and insulin resistance.", *Mol Med.*, 14(11-12), 741-51.
- Raclot, T., Oudart, H. 2000. "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.
- Raclot, T. 1997. "Selective mobilization of fatty acids from white fat cells: evidence for a relationship to the polarity of triacylglycerols.", *Biochem. J.*, 322, 483–489.
- Ramesh, J., Kapelushnik, J., Mordehai, J., Moser, A., Huleihel, M., Erukhimovitch, V. 2002. "Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy.", *Journal of biochemical and biophysical methods*, 51, 251-261.

- Rask-Madsen, C., King G.L. 2007. "Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes.", *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3(1), 46–56.
- Rigas, B., Morgellot, S., Goldman, I.S., Wong, P.T.T. 1990. "Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra.", *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 87, 8140-8144.
- Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., Friedman, J.M. 2008. "Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo", *Cell.*, 17,135, 2, 240-9.
- Ros, D.P., Vona-Davis, L. 2007. "Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression.", *Endocrine-Related Cancer*, 14(2), 189-206.
- Schulman, G.I. 2000. "Cellular mechanisms of insulin resistance.", *J. Clin. Invest.*, 106, 171-176.
- Severcan, F., Bozkurt, O., Gurbanov, R., Gorgulu, G. 2010. "FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model", *Journal of Biophotonics*, 3, 621-631.
- Severcan, F., Gorgulu, G., Gorgulu, T. S., Guray, T. 2005. "Rapid monitoring of Diabetes-Induced Lipid peroxidation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *Analytical Biochemistry*, 339, 36-40.
- Severcan, F., Haris, P. I. 2012. *Applications of Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening*. Amsterdam, Netherlands: IOS Press.
- Severcan, F., Kaptan, N., Turan, B. 2003. "FTIR spectroscopic investigation of diabetic rat heart crude membranes", *Spectroscopy*, 17, 569-577.
- Severcan, F., Toyran, N., Kaptan, N., Turan, B. 2000. "Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C-H region", *Talanta*, 53, 55-59.
- 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. 2001. "The hormone resistin links obesity to diabetes.", *Nature*, 18;409(6818), 307-12.
- Storlien, L.H., Hulbert, A.J., Else, P.L. 1998. "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.
- Stuart, B. 1997. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. England: John Wiley and Sons, Ltd.
- Summers, L.K., Barnes, S.C., Fielding, B.A., Beysen, C., Ilic, V., Humphreys, S.M. & Frayn, K.N. 2000. "Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet.", *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1470–1477.
- Szalontai, B., Nishiyama, Y., Gombos, Z., Murata, N. 2000. "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.
- Takahashi, H., French, S.W., Wong, P.T.T. 1991. ”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.
- Tanabe, A., Matsuda, M., Fukuhara, A., Miyata, Y., Komuro, R., Shimomura, I., Tojo, H. 2009. “Obesity causes a shift in metabolic flow of gangliosides in adipose tissues.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 547–552.
- Toyran, N., Severcan, F. 2003. “Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: An FTIR study.”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 123, 165-176.
- Toyran, N., Lasch, P., Naumann, D., Turan, B., Severcan, F. 2006. “Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study.”, *Biochem J.*, 397, 427-436.
- Toyran, N., Severcan, F., Severcan, M., Turan, B. 2007. “Investigation of diabetes-induced effect on apex of rat heart myocardium by using cluster analysis and neural network approach: An FTIR study”, *Spectroscopy an Int J.*, 21 (5-6), 269-278.
- Toyran, N., Zorlu, F., Donmez, G., Oge, K., Severcan, F. 2004. “Chronic hypoperfusion alters the content and structure of proteins and lipids of rat brain homogenates: a Fourier transform infrared spectroscopy study.”, *Eur Biophys J Biophys.*, 33, 549-554.
- Trayhum, P. 2005. “Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat.”, *Acta Physiol Scand*, 184, 285–293.
- Trayhum, P., Wood, I.S. 2004. “Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose Tissue.”, *Br. J. Nutr.*, 92, 347–355.
- Wang, J., Zhang, G.J. 2005. “Influence of membrane physical state on lysosomal potassium ion permeability.”, *Cell Biology International*, 29, 393-401.
- Watts, A., De Pont, J.J.H.H.M., 1986. *Progress in protein–lipid interactions*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.
- Wong, P.T.T., Wong, R.K., Caputo, T.A., Godwin, T.A., Rigas, B. 1991. “Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis.”, *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 88, 10988-10992.

- 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. 2003. "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.", *J. Clin. Invest.*, 112,1821–1830.
- Yang, Z. H., Miyahara, H., Hatanaka, A. 2011. "Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes", *Lipids in Health and Disease*, 10, 120.
- Yano, K., Sakamoto, Y., Hirose, N., Tonooka, S., Katayama, H., Kumaido, K., Satomi, A. 2003. "Applications of Fourier transform infrared spectroscopy, Fourier transform infrared microscopy and near-infrared spectroscopy to cancer research.", *Spectroscopy*, 17(2-3), 315-321.
- Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., Lass, A. 2009. "Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores.", *Journal of Lipid Research*, Volume 50.
- Zelkowitz, R. "Fat Molecule Fights Weight Gain". *Sciencemagazine*. <http://www.sciencemag.org/news/2008/09/fat-molecule-fights-weight-gain> Son erişim tarihi: 12.102016.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. FERİDE SEVERCAN
Proje No:	115Z702
Proje Başlığı:	Adipoz Dokuda Obezite İlişkili Tip 2 Diyabet Sonucu Görülen Moleküler Değişimlerin ve Palmitoleik Asitin Bu Değişimler Üzerindeki Tedavi Edici Etkisinin Fourier Dönüşüm Kızılötesi Mikrospektroskopisi İle İncelenmesi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	FATMA KÜÇÜK BALOĞLU
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/08/2015 - 15/08/2016
Onaylanan Bütçe:	29992.0
Harcanan Bütçe:	29991.26
Öz:	<p>Obezite çağımızda tüm dünyada halk sağlığını tehdit eden ve her geçen gün prevalansı artan bir sağlık problemi haline gelmiştir. Obezite heterojen yapılı bir hastalıktır ve tip 2 diyabet ile birlikte daha birçok metabolik hastalık için risk faktörüdür ayrıca obezitenin adipoz dokunun metabolik ve endokrin fonksiyonunun lipit değişmesine ve normalden fazla yağ depolanmasına sebebiyet vermektedir. Adipoz doku vücudun enerji deposu olma görevinin yanında bir aktif endokrin organ olarak da kabul edilmiştir. Salgıladığı adipokinler ile homeostaz, kan basıncının regülasyonu, lipit ve glikoz metabolizması ve enflamasyonda görev alan adipoz doku, son zamanlarda bir endokrin organ olarak tanımlanmakta ve obezite ile birlikte görülen insülin direnci oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, adipoz dokunun hem normal hem de hastalık koşullarında tüm vücut glukoz homeostasisini düzenlemede rol aldığı ortaya çıkmıştır. Obezite kaynaklı adipozitlerde aşırı yağ birikiminin, dolaşıma katılan serbest yağ asitlerini artırdığı ve bu olayın insülin hassasiyetini değiştirerek tip 2 diyabete sebep olduğu bilinmektedir. Çağımızın hastalığı olan obezite ve buna bağlı gelişen tip 2 diyabet için geliştirilecek tedavi yöntemleri için bu konuda yapılacak temel araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Bu bilgiler ışığında, projemizde ilk önce obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının adipoz dokuda neden olduğu yapısal ve kompozisyonel değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amacı takiben ikinci adımda obezite ilişkili tip 2 diyabet kaynaklı sözkonusu değişimlerin palmitoleik asit tedavisiyle geri döndürülme potansiyelini araştırmayı amaçlayan bir terapötik ön çalışma yapılmıştır. Obezite kaynaklı tip 2 diyabet hastalığının lipit ve glukoz metabolizması üzerinde önemli etkisi olması sebebiyle diyetle indüklenmiş obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığı üstünde yapılacak yapısal ve kompozisyonel bir biyofiziksel araştırma olarak bu çalışma sözkonusu hastalıkların tedavi sürecine ışık tutabilecek niteliktedir. Bu sebeple çalışmamız obezite ilişkili tip 2 diyabet hastalığının adipoz dokuda meydana getirdiği değişimleri moleküler düzeyde inceleyip bilgi verebilen Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) mikrospektroskopisi ve spektroskopisi ile incelemeyi içermektedir. Bu incelemenin ardından palmitoleik asitin bir anti-obezite ve anti-diyabetik ilaç olma potansiyelini yine aynı teknikle ortaya çıkarmaya yön verecek bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir.</p> <p>Çalışmamızın sonuçlarına göre obezite ve tip 2 diyabet adipoz dokuya ait moleküler kompozisyonda, örneğin lipit/protein oranı ve karbonil/lipit oranında artma ve doymamış/doymuş yağ oranında azalmaya sebep olmaktadır. Fakat çalışmamız palmitoleik asitin obezite ve tip 2 diyabetin sebep olduğu bu yıkıcı değişimler üstüne iyileştirici etkisinin varlığını hem kan testlerinde hem de spektroskopik çalışmalarda göstermiştir. Sonuç olarak çalışmamız, gelecekte yapılabilecek olan obeziteye bağlı tip 2 diyabet tedavisi üzerine araştırmalar için temel olabilecek niteliktedir. Ayrıca projemiz dahilinde ilaç-diyabet etkileşimleri konusunda yapacağımız ön çalışmalar, palmitoleik asitin terapötik etkisinin ortaya çıkarılması konusunda ileride yapılacak detaylı temel ve klinik düzeyde çalışmalara yön verecek olması nedeniyle de önemlidir. Böylece bu çalışma hem ön çalışma olarak kabul edilebilecek, hem de palmitoleik asit ilaç sanayinde bir etken madde olarak kullanılabilir.</p>

Anahtar Kelimeler:	obezite, tip 2 diyabet, viseral , subkütan, adipoz doku, FTIR mikrospektroskopi, palmitoleik asit
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK