



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENERVE EDİLMİŞ SIÇAN YAĞ DOKUSUNDA
KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN GEN
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

Hülya KILIÇ YILMAZ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2022

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

.../.../2022

Hülya KILIÇ YILMAZ



İthaf

Prof. Dr. Ahmet ALVER'e...

O olmasaydı, bu tez bitmezdi. İnceldiği yerde ipin iki ucundan tuttu birleştirdi.

Motive etti. Sabırla bekledi.

Çok kıymetli hocam, benim gibi yoran bir doktora öğrencisine ihtiyacınız yoktu ama tahammülünüz neredeyse sınırsızdı. Tüm zamansızlığıma rağmen bana bu süreçte insan ve bilim insanı nasıl olunur sözlü ve özellikle sözsüz anlattığınız için sonsuz teşekkür ediyor ve en derin saygılarımla bu tezi size ithaf ediyorum.

Hülya KILIÇ YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

RESİMLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xi

ÖZET

xiii

ABSTRACT

xiv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Yağ Dokusunun Yapısı

3

2.2. Yağ Dokusu, Sinir Sistemi ve Denervasyon

7

2.3. Karbonik Anhidrazlar

12

2.3.1.CA II, CAVA, CAVB

15

3. GEREÇ ve YÖNTEM

18

3.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

18

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

19

3.3. Kullanılan Ticari Kitler

20

3.4. Yöntem

20

3.4.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	20
3.5. Dokuda Norepinefrin Ölçümü	21
3.5.1. Norepinefrin Ölçümünde Kullanılan PBS Çözeltilisinin Hazırlanması	21
3.5.2. Homojenizasyon Aşaması	22
3.5.3. Doku Norepinefrin Tayin Aşaması	22
3.6.Yağ Dokusunda Total RNA İzolasyonu	23
3.6.1. Total RNA İzolasyonunda Kullanılan Dietilpirokarbonat (DEPC)'li Suyun Hazırlanışı	23
3.6.2. Retroperitoneal Yağ Dokusundan Total RNA İzolasyonu	24
3.6.3. Total RNA İzolasyonu Sonucu Elde Edilen RNA Miktarının Belirlenmesi	25
3.7. Total RNA'dan komplementer DNA(cDNA) Elde Edilmesi	25
3.8. RT-PCR	26
3.9. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	29
4. BULGULAR	30
4.1. Morfolojik Bulgular	30
4.2. Deney Gruplarının Retroperitoneal Doku Ağırlık Ölçümü Sonuçlar	31
4.3. Retroperitoneal Yağ Dokularında Norepinefrin Ölçüm Sonuçları	31
4.4. Retroperitoneal Yağ Dokularında Gen Expresyonu Sonuçları	32
5. TARTIşMA ve SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR	42
EKLER	52
EK 1. Etik Kurul Onam Formu	52
ÖZGEÇMİř	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	CA izoenzim hücre lokalizasyonları ve doku dağılımları	13
Tablo 2.	CA izoenzimlerinin ilişkili olduğu hastalıklar	14
Tablo 3.	Kullanılan cihazlar, malzemeler ve aletler	18
Tablo 4.	Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	19
Tablo 5.	Kullanılan Ticari Kitler ve ekleri	20
Tablo 6.	cDNA sentezi hazırlığında kullanılan reaktifler ve miktarları	26
Tablo 7.	Gen Ekspresyonu için RT-PCR karışımı	26
Tablo 8.	Gen ekspresyonunda kullanılan primer dizileri	27
Tablo 9.	RT-PCR protokolü	28
Tablo 10.	Retroperitoneal Yağ Doku Ağırlık Sonuçları	31
Tablo 11.	Retroperitoneal yağ dokularında norepinefrin ölçüm sonuçları	31
Tablo 12.	Car2 gen ekspresyonu kat değişim(Fold Change) değerleri	32
Tablo 13.	Car5A gen ekspresyonu kat değişim(Fold Change) değerleri	33
Tablo 14.	Car5B gen ekspresyonu kat değişim(Fold Change) değerleri	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Yağ dokusu tiplerinin morfolojisi	4
Şekil 2.	Adipoz doku duyuşal ve sempatik sinir etkileşimi	6
Şekil 3.	Adipoz doku sinyallerinin sistemik metabolizmayı etkilemesi	8
Şekil 4.	Lipogenez ile ilişkili yolaklar	16
Şekil 5.	Doku norepinefrin düzeyi standart grafiğı	23
Şekil 6.	Car2, Car5A ve Car5B için erime noktası grafiğı	29
Şekil 7.	Car2, Car5A, Car5B ve GAPDH'a ait amplifikasyon grafiğı	29
Şekil 8.	Retroperitoneal yağ doku norepinefrin düzeyleri	32
Şekil 9.	Car2 gen ekspresyon grafiğı	33
Şekil 10.	Car5A gen ekspresyon grafiğı	33
Şekil 11.	Car5A gen ekspresyon grafiğı	34

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Denervasyon öncesi retroperitoneal yağ dokusu ve sinir lifleri	30
Resim 2.	Retroperitoneal yağ dokusu ve denerve edilmiş sinir lifleri	30



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

6-OHDA	6-Hidroksidopamin	
AA	Arachidonic Acid	
AKK	Asetil-Koa Karboksilaz.	
ATP	Adenozin Trifosfat	
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	
CA	Karbonik Anhidraz	
cDNA	Komplementer DNA	
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptid CPTI ve CPTII Karbomoil Sentetaz I ve II DKO Double-Knockout	Fosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit	
ELISA	Enzim linkend immunosorbent assay	
EPA	Eicosapentaenoic Acid	
FFA	Free Fatty Acids	
IL-17	İnterleukin-17	
IL-1 β	İnterleukin-1 Beta	
IL-6	İnterleukin-6	
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi	
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	
MDH	Malat Dehidrogenaz	
MPT	Mitokondri Pirüvat Taşıyıcısı	
MSS	Merkezi Sinir Sistemi	
NE	Norepinefrin	
NGF	Nerve Growth Factor	
NPY	Nöropeptid Y	

NRG4	Adipoz Doku Neuregulin-4
OSS	Otonom Sinir Sistemi
PC	Pirüvat Karboksilaz
PDH	Pirüvat Dehidrogenaz
PEP	Fosfoenolpirüvat
PEPCK	Fosfoenolpirüvat Karboksikinaz
PGE2	Prostaglandin-E2
PK	Pirüvat Kinaz
RNA	Ribonükleik asit
RP	Retroperiton
RT-PCR	Real time-polimer chain reaction
SP	Substans P
TG	Trigliserid
TNF α	Tümör nekrozis faktör alfa
Treg	Düzenleyici T Hücreler
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
UCP-1	Uncoupling Protein-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Formüller

CO ₂	Karbondioksit
H	Hidrojen atomu
HCO ₃	Bikarbonat

ÖZET

Denerve Edilmiş Sıçan Yağ Dokusunda Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi

Sempatik sinir sistemi yağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Yağ doku denervasyon çalışmalarında denerve dokuda lipolizin azaldığı, yağ dokusu kütlesinin arttığı gözlenmiştir. Yağ hücrelerinin boyut artışı aşırı TG depolanmasına bağlı olarak şekillenmektedir. Bu projede de novo lipid sentezinde substrat sağlayıcı CA II, VA ve VB izoenzimlerinin denervasyona bağlı olarak beyaz yağ dokusunda nasıl değiştiği araştırıldı.

Projede 180-220 g 4-6 haftalık 16 adet erkek sıçan kullanıldı ve iki çalışma grubu oluşturuldu.

1.Grup: Sağ retroperitoneal yağ dokusu tamamen denerve edildi ve 1 ay sonra sakrifiye edildi (sol retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmeyip, kontrol olarak kullanıldı).

2.Grup: Sağ retroperitoneal yağ dokusu tamamen denerve edildi ve 3 ay sonra sakrifiye edildi (sol retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmeyip, kontrol olarak kullanıldı).

Sakrifikasyon işlemlerinden sonra her iki retroperitoneal yağ dokusu çıkarıldı ve ağırlıkları tartıldı. Doku örneklerinde cDNA sentezi ve norepinefrin ölçümü yapıldı. Birinci ayın sonunda denerve edilen yağ dokuda Car2, Car5A ve Car5B gen ekspresyonu düzeyi kontrol yağ dokusu ile karşılaştırıldığında artmış olarak bulundu. Üç aylık denervasyonu takiben yapılan ekspresyon çalışmalarında farklılık bulunamadı.

Sonuç olarak denervasyonu takip eden ilk aydaki denerve yağ dokusundaki CA2, Cc5A ve CA5B izoenzimlerinin gen ekspresyonlarının de novo lipid sentezini destekleyecek yönde değiştiği ve bunun da denerve yağ dokusundaki kütle artışına katkı sağladığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Denervasyon, Yağ Dokusu, Karbonik Anhidraz

ABSTRACT

Investigation of Gene Expression of Carbonic Anhydrase Isoenzymes in Denervated Rat in Adipose Tissue

The sympathetic nervous system plays an important role in the regulation of adipose tissue metabolism. In adipose tissue denervation studies, it was observed that lipolysis in denervated tissue decreased and adipose tissue mass increased. The size increase of fat cells is shaped by excessive TG storage. In this project, it was investigated how the CA II, VA and VB isoenzymes, which are substrate providers in de novo lipid synthesis, change in white adipose tissue due to denervation.

In the project, 16 male rats, 180-220 g, 4-6 weeks old, were used and two study groups were formed.

Group 1: Right retroperitoneal adipose tissue was completely denervated and sacrificed 1 month later (left retroperitoneal adipose tissue was not denervated and was used as a control).

Group 2: Right retroperitoneal adipose tissue was completely denervated and sacrificed 3 months later (left retroperitoneal adipose tissue was not denervated and was used as a control).

After sacrifice, both retroperitoneal adipose tissues were removed and their weights were weighed. cDNA synthesis and norepinephrine measurement were performed in tissue samples.

In group 1, the level of Car2, Car5A and Car5B gene expression in the denervated right retroperitoneal adipose tissue was found to be increased when compared to the undervated left retroperitoneal adipose tissue. There was no difference in expression levels after three months of denervation.

As a result, it was concluded that gene expressions of CA2, CCA5A and CA5B isoenzymes in denervated adipose tissue in the first month following denervation changed in a way to support de novo lipid synthesis and this contributed to the mass increase in denervated adipose tissue.

Keywords: Denervation, Adipose Tissue, Carbonic Anhydrase

1. GİRİŞ ve AMAÇ

De novo lipogenez lipid olmayan öncül bileşiklerden lipid moleküllerinin sentezini ifade eder. De novo lipid sentezinin gerçekleştiği başlıca dokular karaciğer ve yağ dokusudur. Yağ dokusunun yapı ve organizasyonu hem hormonal hem de nöral sistemden etkilenecek şekilde şekillenmektedir. Vücutta, beyaz ve kahverengi olmak üzere iki çeşit yağ dokusu bulunur. Her iki yağ dokusu da enerji dengesi ve metabolik düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Salgıladıkları maddeler ile metabolik süreçleri yönetmede etkin rollerinin yanında, beyaz yağ dokusu enerji için yağ depolama ve kahverengi yağ dokusu ise özellikle yenidoğanlarda termogeneze katkı sağlama işlevleriyle öne çıkmaktadır. Sinirsel uyarıların etkisi ile beyaz yağ dokusunda kahverengileşme de meydana geldiği bildirilmektedir (1).

Yağ dokusunun sinir sisteminden innervasyonlara sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Önceleri otonom sistemin parasempatik ve sempatik kısmından sinir lifleri içerdiği öne sürülse de yapılan çalışmalarla geline nokta, yağ dokusunun sempatik sinir sisteminden efferent sonlanmalar aldığını gösteren kanıtlar ön plana çıkmıştır. Yağ dokusunda baskın olan katekolamin norepinefrindir. Sempatik sinir sistemi etkisini yağ dokusunda lipolizi artırma ve yağ doku hücreleri öncüllerinden yağ hücresi oluşum sürecini engelleme şeklinde göstermektedir. Sinir uyarıları aynı zamanda beyin ve yağ dokusu arasındaki iletişimi sağlayarak metabolik düzenlemeye katkı sağlamaktadır. Beyin-yağ dokusu arasındaki iletişimi sağlayan bir diğer sistem duyuşal sinir sistemidir. Duyuşal afferent sinirler beyne yağ dokusu içeriğı ve depo miktarı hakkında bilgiyi taşıdığı öne sürülmektedir (2).

Otonom sinir sisteminin yağ dokusu metabolizması üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalarda denervasyon deneyleri sıklıkla kullanılmaktadır. Denervasyonda sinir lifleri cerrahi veya farmakolojik olarak devre dışı bırakılır. Yapılan denervasyon çalışmalarında denerve yağ dokularında lipolitik faaliyetin azaldığı, denerve dokunun yağ kütlesinde artış olduğu, yağ hücre farklılaşması ve sayısında artış olduğu saptanmıştır. Farmakolojik olarak gerçekleştirilen denervasyon yöntemlerinde (örnek, kapsaisin kullanılarak), denervasyonun geri dönme ihtimalinin kısmen yüksek olması nedeniyle denervasyon yöntemi olarak cerrahi denervasyon sıklıkla tercih edilmektedir. (3)

Karbonik anhidrazlar (CA) (E.C. 4.2.1.1) canlılarda yaygın olarak bulunan ve yapılarında çinko ihtiva eden enzimlerdir. Bugüne kadar tanımlanmış 16 farklı izoenzimi

vardır. İzoenzimlerinin doku ve hücrel kompartımanlardaki dağılımları farklıdır. Vücutta en yaygın olarak eritrosit, karaciğer ve kas dokusunda bulunmaktadır. Karbonik anhidrazların temel görevi karbondioksitin hidrasyon ile bikarbonata çevrilmesini sağlamaktır. Vücut pH'sının düzenlenmesi, karbondioksit homeostazisi, solunum, kemik rezorbsiyonu, kalsifikasyon gibi olaylarda önemli role sahip olmasının yanında aynı zamanda ürünü olan bikarbonat, metabolizmada bazı enzimlerin substratıdır. De novo lipid sentezinde asetil KoA karboksilaz için gerekli olan bikarbonat substratını CA 2 izoenzimi sağlamaktadır. Mitokondride bulunan CA 5A ve CA 5B izoenzimleri de pirüvat karboksilazın katalizlediği reaksiyonda gerekli olan bikarbonat substratını sağlamaktadır (4). Bu çalışmada sempatik sinir sistemi denervasyonunun de novo lipogeneze etkili olan karbonik anhidraz enziminin ekspresyonlarına üzerine etkisinin olduğu hipotezi test edilecektir.

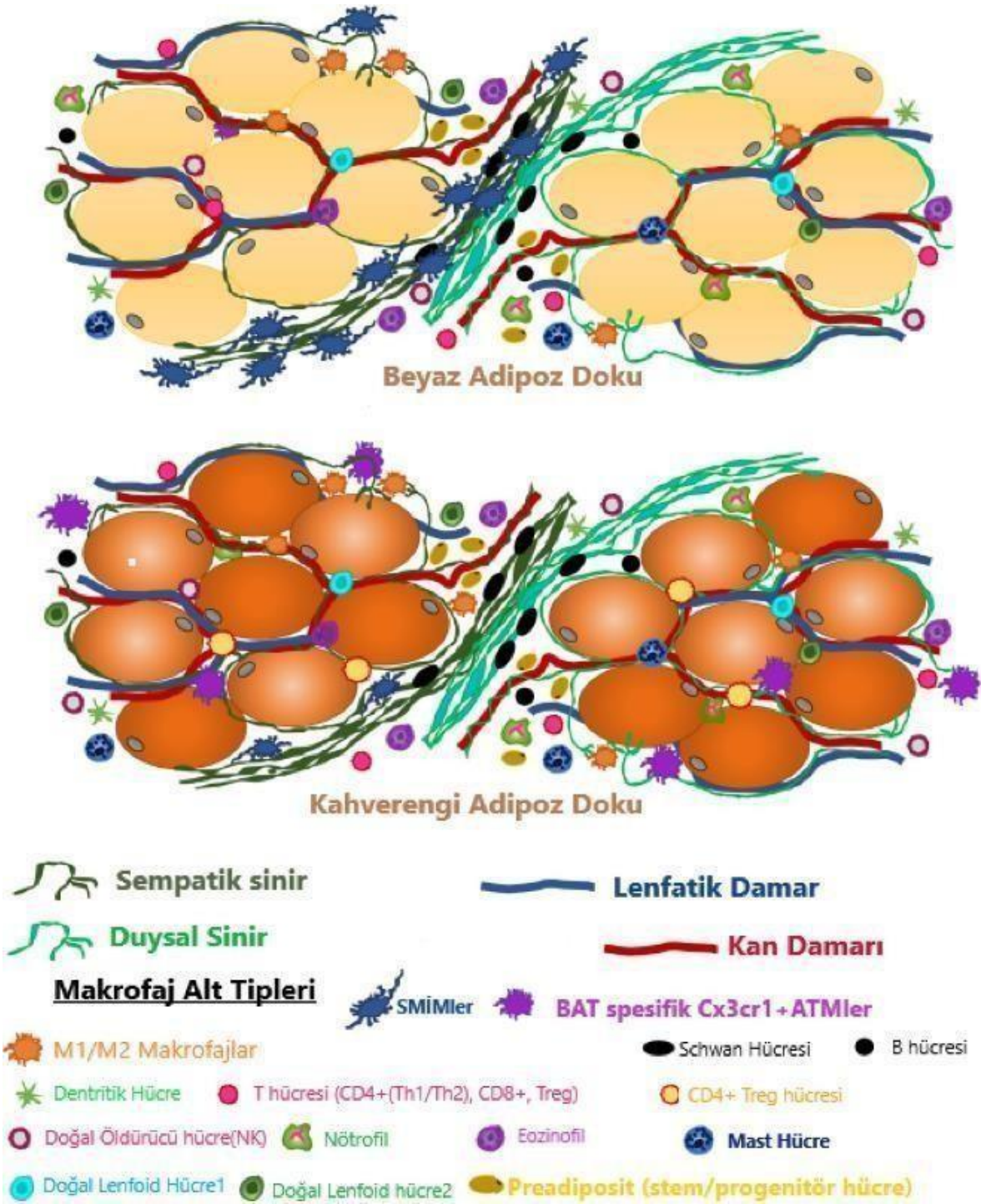
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ Dokusunun Yapısı

Yağ dokusu kompleks ve oldukça aktif bir metabolik/endokrin organdır. Bağı dokusu kategorisinde yer alan yağ doku, adipositler, immün hücreler, stromal vasküler hücreler, sinir hücreleri ve matriksten meydana gelmektedir. 1980'li yılların ortalarına kadar yağ dokusunun sadece enerji ve yalıtım için yağ depolayan bir yapı olduğu düşünülürdü. Ancak özellikle son iki dekada glandüler bir yapıya sahip olan ve salgıladığı adipokinlerle sistemik metabolik fonksiyonlarda önemli etkileri olan bir endokrin organ ve aynı zamanda iskelet kası, karaciğer ve beyin gibi organlar üzerinde olan etkileri ile organizmanın glukoz ve lipid metabolizmasını düzenleyen bir yapı olarak kabul edilmeye başlanmıştır (5).

Organizmada beyaz ve kahverengi olmak üzere iki çeşit yağ dokusu bulunur. Bu sınıflandırma hücre yapısı, yerleşimi, rengi, damarlanması ve fonksiyonlarına göre yapılmaktadır (Şekil 1). Her iki yağ dokusu da enerji dengesi ve metabolik regülasyonda rol oynamaktadır. Hem beyaz hem de kahverengi yağ dokusu esas lipid yüklü hücrelerden oluşur. Beyaz yağ dokusunda tek büyük bir lipid damlacığı var iken kahverengi yağ dokusunda multiloküler küçük lipid damlacıkları bulunur. Yağ dokusunun yağ hücreleri dışında kalan kısmı stromal vasküler fraksiyon olarak adlandırılır. Stromal vasküler fraksiyonda preadipositler ve immün hücreler bulunmaktadır. İmmün hücreler doğal immün sistem hücrelerinden monosit, makrofaj, dentritik hücre, mast hücresi, nötrofil ve innate immün hücreler ihtiva ederken adaptif immün hücreler olan T hücreler, NK hücreler, B hücreleri de yapıda bulunmaktadır. Nörovasküler yapıda kan damarları, lenfatik damarlar ve yoğun bir sinir yapısı bulunmaktadır. Sinirler hem duysal hem de sempatik liflerden oluşur. Yağ dokusunun sinaptik girişleri nasıl aldığı veya direk olarak inerve olup olmadığı henüz netleştirilememiştir (1).

Kahverengi yağ dokusu özellikle yenidoğanlarda termogenezi sağlayan, yapı olarak mitokondriden oldukça zengin multiloküler yağ hücrelerinden oluşmaktadır. Kahverengi yağ dokusunda sempatik sinir sonlanmalarından salınan norepinefrin UCP-1 proteininin aracılık ettiği bir süreçle termogenezi ve enerji dengesini sağlamaya katkıda bulunur. Beyaz adipoz dokunun çeşitli faktörlerle uyarıldığında beyaz yağ dokuda kahverengileşme meydana geldiği belirtilmektedir (1, 2).

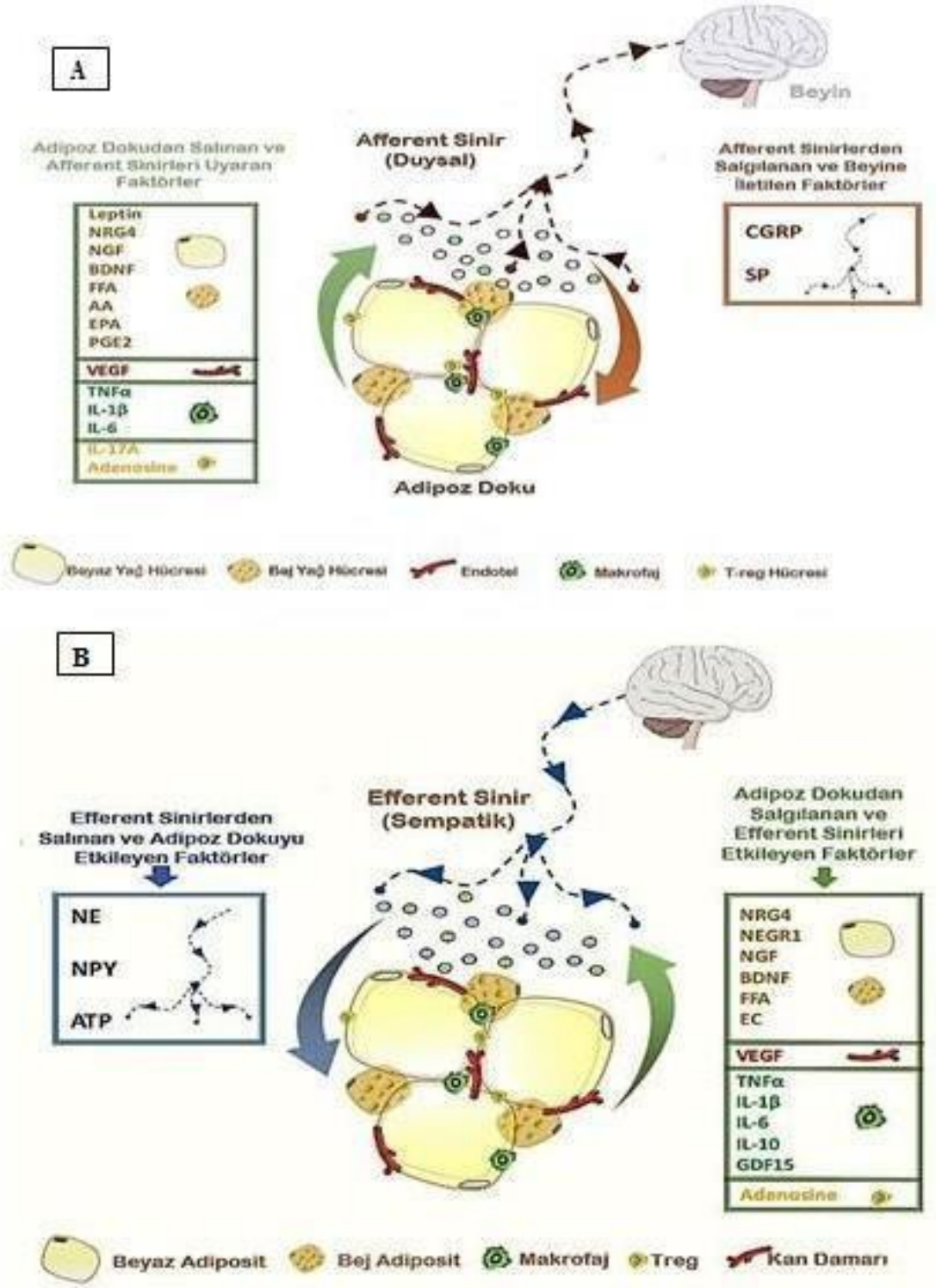


Şekil 1. Yağ dokusu tiplerinin morfolojisi (Blaszkiewicz'den, 1)

Beyaz yağ dokusu ise yapı olarak kahverengi yağ dokusuna göre oldukça az sayıda mitokondri içeren yağ hücrelerinden meydana gelir ve temel fonksiyonu gıdalarla alınan fazla enerjiyi triaçilgliserol şeklinde depolamak ve ihtiyaç durumunda mobilizasyonu sağlamaktır. Dolayısıyla vücutta enerji deposu olarak görev yapmaktadır. Yağ hücreleri

oldukça fazla hipertrofi ve/veya hiperplazi kapasitesine sahiptir. Öyle ki aşırı miktarda yağ depolayan bir beyaz yağ dokusu hücresinin tamamına yakını lipid damlacıkları ile doludur. Beyaz yağ dokusunun vücuttaki yerleşimi derialtı ve iç organların çevresidir. Beyaz yağ dokusu yerleştiği lokalizasyona göre damarlanması, insülin duyarlılığı, inervasyon kapasitesi, metabolik ve hormonal kontrolleri ve hücre sayısı yönünden çok farklıdır. Hem anatomik innervasyon (fibilerin yoğunluğu veya sublokalizasyonları) hem de reseptörlerin nörotransmitter affinitesi yağ depoları arasında farklılık göstermektedir. Beyaz yağ dokusu görünenin arkasında sadece trigliserid değil, gerektiğinde trigliseridlerin kolayca mobilize ve sekrete olabileceği ilişkili proteinlere de sahiptir. Enerji ihtiyacı olduğunda adipositlerde bulunan trigliseridler, lipazlar tarafından hızlıca hidrolize edilerek dolaşıma aktarılırlar (5, 6).

Yağ dokusunun santral sinir sistemi ve hormonlara yanıt verebilen, aynı zamanda salgıladığı protein yapılı faktörlerle organizmanın metabolik süreçlerinde aktif rol alan endokrin bir doku olduğu görüşü leptinin keşfiyle belirmeye başlamıştır (7). Adipoz doku neuregulin-4 (NRG4), nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), free fatty acids (FFA), arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) ve prostaglandin-E2 (PGE2) gibi eikosanoidler, çok sayıda peptid hormon ve adipokinler, (TNF α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), adenozin gibi sitokinler, aktive makrofajlar(MCP-1), lenfositlerden salgılanan düzenleyici T hücreler(Treg) ve doku vaskülaritesini uyaran vascular endothelial growth factor (VEGF) salgılar. Aynı zamanda peptid olmayan biyolojik aktif moleküller olarak bilinen aktive lipid salınımını da gerçekleştirirler. Afferent sinirlerden salgılanan nörotransmitterler calcitonin gene related peptid (CGRP) ve substans P (SP), efferent nöronlardan salgılanan nörotransmitterler nörepinefrin (NE), nöropeptid Y (NPY) ve adenozin trifosfat (ATP)tır. Tüm bu moleküller dokunun metabolik uyarılarına göre salgılanma ritmi gösterirken, orgnizmanın tamamında ise enerji metabolizmasında düzenleyici etki gösterirler. (Şekil 2, 3). (8, 9).



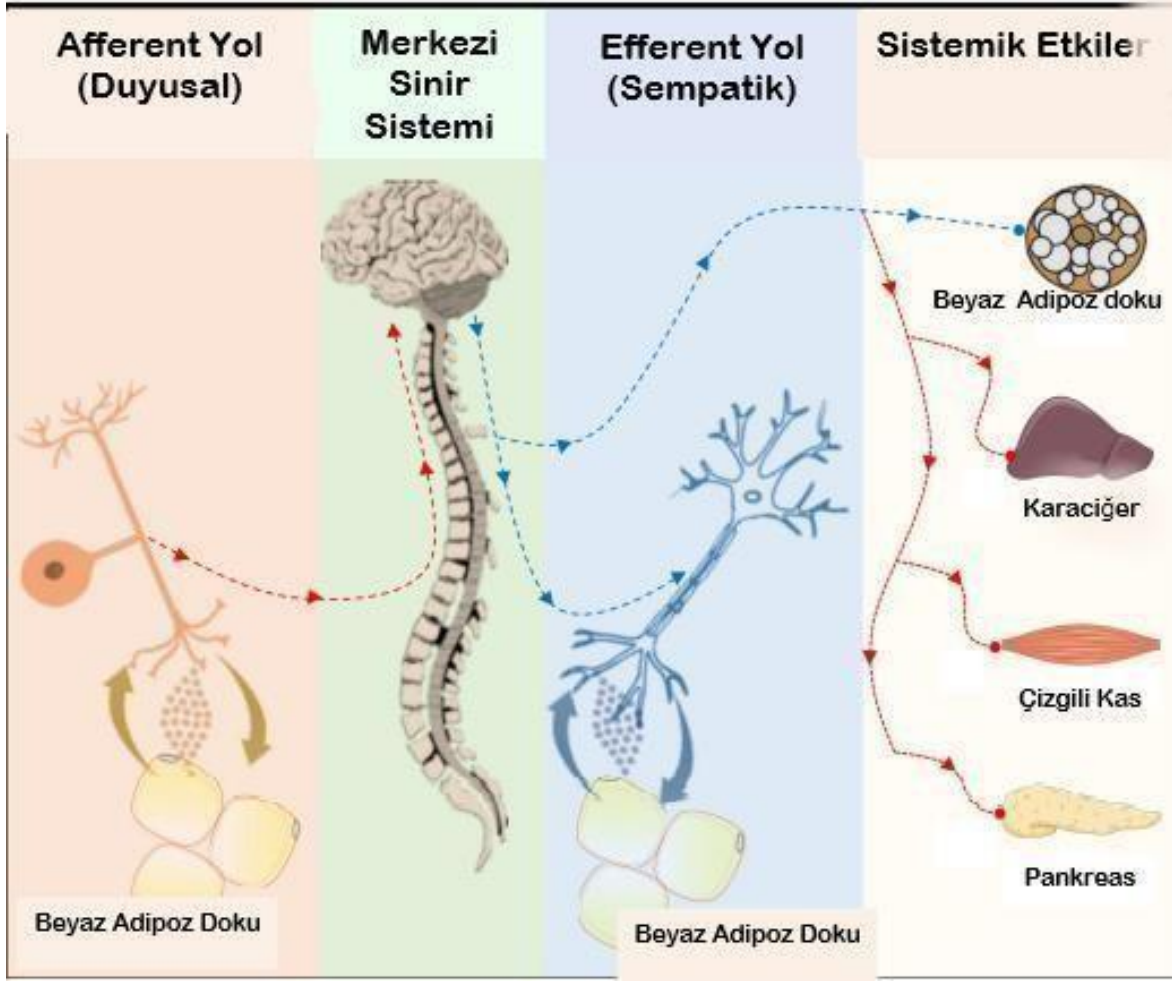
Şekil 2. Adipoz doku duyuşal ve sempatik sinir etkileşim. A: Adipoz doku duyuşal sinir etkileşimi. B: Adipoz doku sempatik sinir etkileşimi (Guilherme'den, 9).

2.2. Yağ Dokusu, Sinir Sistemi ve Denervasyon

Organizmada enerji alımı, harcanması ve depolanmasının düzenlenmesinde merkezi ve otonom sinir sistemi (OSS) birlikte rol oynamaktadır (7).

Sinir sistemi merkezi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki kısma ayrılır. Merkezi sinir sistemini (MSS) oluşturan yapılar beyin ve medulla spinalistir. Periferik sinir sistemi ise MSS hariç vücudun diğer kısımlarında inervasyondan sorumlu olan otonom ve somatik sinir sisteminden meydana gelir. Somatik sinir sistemi istemli hareketlerin gerçekleştirilmesinde etkindir. OSS ise iç organların inervasyonundan sorumludur. OSS hava yolu direncini düzenler, kan akış, kan basıncı, vücut ısısı, sindirim, enerji dengesi, sıvı hacmi, glandüler sekresyonlar, kalp hızı, bağışıklık sistemi, inflamatuvar süreçler, tuz ve su dengesi, cinsel işlev, ürinasyon gibi tüm iç organ faaliyetlerini düzenler. Somatik sistem ise postür ve denge, hareket, istemli kas hareketlerinin tamamını kontrol etmektedir. OSS hormonal kontrole de sahip olan istemsiz vücut fonksiyonlarının sürdürülmesinde görevli sistemdir. Sadece sempatik sistem ile inerve olan kan damarları, pineal bez ve adipoz doku ile sadece parasempatik inervasyona sahip siliyer kaslarla nazofarengeal glandların dışında tüm organlar hem sempatik hem de parasempatik inervasyona sahiptir (10).

Başlangıçta beyaz yağ dokusundaki kan damarları ile yakın ilişkili katekolaminerjik sinir liflerinin yağ dokusunu innerve ettiği bildirilmiştir. Ancak, 1980-1990'lı yıllarda beyaz yağ dokusunun doğrudan innerve edildiğini gösteren nöro-anatomik kanıtlar ortaya çıkmış, sonrasında yapılan çalışmalarda beyaz yağ dokusunun MSS hücre gruplarından da giriş aldığı (efferent) gösterilmiştir. Aynı zamanda beyaz yağ dokusundan çıkan (afferent) sinirlerin duysal sinirler olduğu ve bu yolla beyne yağ dokusunun içeriği hakkında bilgi götürüldüğü belirtilmektedir (1). Yapılan çalışmalar, yağ dokusunun OSS'nin sempatik kısmı tarafından innerve edildiğini destekleyen bulgular sunmaktadır. Son dönemlerdeki çalışmalar beyaz yağ dokusunu innerve eden sempatik tellerin karaciğer gibi metabolik organları da etkilediğini ortaya atmakta, bu nedenle periferik metabolizmanın eş zamanlı kontrolünün sağlanabildiği ifade edilmektedir. Norepinefrin sempatik sinir sisteminin esas nörotransmitteridir. Sempatik sistem adipoz dokuda etkisini β_3 reseptörleri üzerinden göstermektedir (Şekil 3) (9).



Şekil 3. Adipoz doku sinyallerinin sistemik metabolizmayı etkilemesi (Guilherme'den, 9)

Beyin adipoz doku iletişimi iki yolla sağlandığı öne sürülmektedir. İlki adipoz dokudan salgılanan adipokinler hipotalamusta iştahın ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi ile ilgili merkezlere etki gösterir. İkinci yol adipoz dokudaki bulunan ve adipoz dokudan beyine sinyal iletiminde görev alan sensörinöral (duysal) nöronlardır. Adipoz dokuda yer alan afferent uyarı molekülleri sensörinöral sinirler aracılığıyla periferden MSS'ye bilgi iletirler. İletimde görev alan faktör CGRP (calcitonin gene related peptide) adipoz dokuda lipolitik cevabın oluşmasında, immun fonksiyonların düzenlenmesinde etkin rol oynar. Sensörinöral iletişim yolu ile beyine iletilen sinyaller efferent sempatik liflerle periferik cevabın oluşmasını sağlarlar. Sensörinöral sinirlerin uyarılmasını sağlayan adipoz doku kaynaklı moleküller leptinin yanında yağ asitleri, adipoz doku kaynaklı nörotropik faktörler(nöregülin-4(NRG4), beyin kaynaklı nörotrofik faktör

(BDNF) ve sinir büyüme faktörü(NGF), pre-protein konvertaz1(PCSK1)), vasküler endotelyal büyüme faktörü(VEGF), sitokinler(TNF-alfa, IL1 β , IL-6, IL-17A), CGRP, substans P'dir (3, 11, 12). Obezitede gerek sitokin salınımı gerekse serbest yağ asidi artışı dokuda inflamatuvar sitokin salgılanması nedeniyle sensörinöral sinirlerde inflamasyona neden olarak beyin-adipoz doku iletişimini bozduğu öne sürülmektedir. Günümüzde obezitenin kronik düşük düzey bir inflamasyonla seyrettiği artık kabul edilmiştir (13, 14).

Adipoz dokuda sempatik inervasyonda görevli molekül olan noradrenalin özellikle damarlara yakın bölgede bulunan sempatik sinir uçlarından salgılanmaktadır. Salgılanan norepinefrin adipoz dokuda özellikle açlık sırasında lipolizi aktive etmektedir. Adrenal bezden salgılanan norepinefrinin lipoliz üzerinde bir etkisi olmadığı belirtilmiştir (2). Sempatik lifler adipoz doku parankiminde yer alırlar. Sempatik sinirlerden norepinefrin, nöropeptid Y(NPY), ATP, nörotrofik faktörler ((NRG4, nöronal büyüme düzenleyici 1(NEGR1), NGF, BDNF), yağ asitleri, aktive lipidler, endokanabinoidler, büyüme farklılaşma faktörü 15 (GDF15) ve adenozin salgılanmaktadır. Norepinefrin lipoliz, termogenez ve doku remodelingini sağlayan en önemli faktördür. ATP özellikle norepinefrin indüklü termogeneziste ko-transmitter olarak norepinefrinle birlikte yer almaktadır. NPY adipositlerde adrenerjik sinyallere antagonistik özellik göstererek lipolizi baskılamaktadır (15, 16). Yağ asitleri ve biyoaktif lipid moleküllerinin adipoz doku üzerindeki etkileri tam olarak açıklanamamakla birlikte yağ asidi infüzyonunun sempatik uyarının baskılanması şeklinde etkisi olduğu görülmüştür (8, 17). Endokanabinoidler kanabinoid reseptör 1 üzerinden etki gösteren biyoaktif lipid molekülleri olup metabolik disfonksiyona neden olmaktadır. Özellikle visceral yağ dokusundaki artışla endokanabinoid düzeyleri arasında pozitif ilişki görülmüştür. Hayvan modellerinde CB1 inaktivasyonunun adipoz termogenezisini olumlu etkilediği bulunmuştur. (18-21). GDF15 nörotrofik etki göstererek beyinde iştah merkezini baskıladığı ileri sürülmektedir (22, 23). Adenozin adipoz dokuda termogeneziste etkili olan bir moleküldür ve sempatik sistem üzerine presinaptik inhibisyonla norepinefrin salınımını inhibe ettiği belirtilmektedir. Sempatik sistemin adipoz dokuda disfonksiyonu obezite ve metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Hiperinsülinemi adipoz dokuda beta3 adrenerjik reseptörleri baskılayarak lipolizi inhibe etmektedir. Özellikle beyinde insülin reseptör sinyalinin aşırı olması adipoz dokuya iletilecek sempatik sinyalleri azaltmaktadır (24-26).

Yağ dokusunda lipidlerin depolanması iki yolla gerçekleşir. Bunlardan ilki dolaşımda bulunan lipidlerin (TG) lipoprotein lipaz enzimi ile yıkılıp yağ dokusuna alınması ve hücre içinde tekrar trigliseridlere dönüştürülerek depolanması, diğeri de de novo lipid sentezidir. De novo sentezde hücre içinde glukozdan yağ asidi sentezi ve sonrasında trigliserid olarak depolanması söz konusudur. Bu anabolik yolların esas düzenleyici hormonu insülin dir. Bunun yanında katekolaminler de yağ dokusunda lipolitik yolda etkili hormonlardır. İnsülin katekolaminlerden daha çok söz sahibi olmasının yanında insülin etkisi azaldığında katekolamin etkinliği ortaya çıkmaktadır. Beta adrenerjik reseptör uyarımı lipolizi artırırken, alfa adrenerjik reseptör uyarımı lipolizi azaltıcı yönde etki göstermektedir. Yağ dokusundan adiponektin sentezi de sempatik sinir sistemi tarafından baskılanmaktadır (2, 27).

Beyaz yağ dokusu kütlesindeki değişimler, yağ hücrelerinin hem sayıları ve hemde boyutlarının düzenlenmesi ile kontrol edilir. Yapılan çalışmalarda sempatik sinir sisteminin yağ hücresi apoptozu üzerine etkisi belirgin değilken hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını ise kontrol ettiğini göstermiştir. Ortaya çıkan bulgular sempatik aktivasyonun beyaz yağ dokusunun gelişimini baskıladığı yönündedir (2).

Denervasyon çalışmaları 1960'lı yıllarda sempatik sinir denervasyonları ile kullanılmaya başlanmıştır. İlk çalışmalar 6-hidroksidopamin(6-OHDA) kullanılarak kimyasal denervasyon uygulanması şeklinde başlanmıştır (28). Denervasyon deneyleri sinir sisteminin dokular üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılmaktadır. Denervasyon deneyleri sinir sisteminin yağ dokusu üzerindeki etkilerini incelemek için in vivo olarak yapılan ilk çalışmalardır ve tarihçesi 1961'lere dayanmaktadır (29). İlk çalışmalar sempatik sistemin doku üzerindeki genel etkilerine yoğunlaşmıştır. Denervasyonda sinir lifleri cerrahi veya farmakolojik olarak devre dışı bırakılır. Cerrahi denervasyon yağ dokusunda nöral giriş-çıkışı optimal düzeyde ortadan kaldırmaktadır. Cerrahi denervasyon uygulama açısından zorluk içeren bir yöntemdir. Cerrahi denervasyonla birlikte hem duysal hem sempatik sinirler kesilmektedir. Bu nedenle teknik olarak bir grup sinire özel bir yöntem değildir. İşlem sırasında çevre doku ve damar yaralanmaları arzu edilmeyen yan etkileridir. Ancak olumsuz yönlerine rağmen etkiliği %100 olan bir yöntemdir. Farmakolojik denervasyon seçici ve istenen lokalizasyonda denervasyona olanak sağlar. Bu amaçla kullanılan ajanlar 6- OHDA, norepinefrin depolanan vezikülleri harap eder, oksidatif stres

oluşturur ve sinir membranlarında dejenerasyona neden olur. 6-OHDA 10-20 kez 1-2 µL miktarında olmak üzere doku üzerine enjekte edilir. Enjeksiyon başarısı önemli bir etkidir.

Etkisi enjeksiyondan sonra 24 saat içinde görülür ancak %100 etkili değildir, etkinliği %60 civarında kalır. Yaklaşık 4 hafta sonra ise doku rejenerasyonu nedeniyle etkisi geri döner. Bu nedenle dört haftadan uzun süreli denervasyon deneyleri için uygun bir yöntem olarak kabul edilmemiştir (30-32). Bir diğer ajan guanetidindir. Guanetidin postgangliyonik sinir ucunda norpinefrinin yerine geçerek sinir ucundan norepinefrinin geri alımını engeller. Yani norepinefrin ile yarışır. Bu nedenle guanetidin, direk hücreyi parçalayan 6-OHDA'ya göre daha güvenli bir denervasyon sağlamaktadır. Aynı zamanda duysal inervasyonu etkilememektedir. Uygulama yöntemi 6-OHDA ile benzerdir. Etkisi ise 2 haftada ortaya çıkmakta ve literatürde etkinliğinin %20-80 arasında değiştiği belirtilmektedir (33-40). Duyusal denervasyon için kullanılan kapsaisin duysal sinirlerde vaniloid reseptörlere sitotoksik etki göstererek denervasyona neden olur (1). Sitotoksik etkisini hücre içine kalsiyum ve sodyum iyonları girişini artırarak gösterir. Kapsaisin dokuya çoklu şekilde 20µg/µL miktarında enjekte edilir. Duyusal afferent sinirleri etkilerken, efferent sinirlere etkisi yoktur. Bu açıdan sadece duysal denervasyon hedeflenen çalışmalarda kullanılmış bir yöntemdir. Etkisinin %40'ı iki hafta içinde ortaya çıkmaktadır, etkinliği ise cerrahi denervasyona göre en fazla %80 olarak gösterilmiştir (28, 41-44).

Adipoz doku metabolizması ve fonksiyonlarının nöral sistem tarafından nasıl denetlendiğine yönelik yapılan çalışmaların çoğunda cerrahi denervasyon tercih edilmektedir. Doku üzerinden nöral etki kaldırıldığı zaman beyin-yağ dokusu iletişimi kesilmesinin metabolik süreçlerde bozulmayı beraberinde getirdiği gösterilmiştir. Subkutan yağ dokusu denervasyonu birçok taraftan sinir sonlanması aldığı için oldukça zordur. Ancak retroperitoneal yağ doku denervasyonu bu anlamda daha lokalize olduğundan denervasyon çalışmalarında öne çıkmıştır (45).

Ratların beyaz yağ dokusuna yapılan sempatik denervasyon çalışmalarında, obezitede gözlenildiği gibi, öncül yağ hücrelerinin ve olgun yağ hücrelerinin sayısının önemli miktarda artmasını ve TG depolanmasını tetikleyerek yağ pedlerinde belirgin bir artış olduğu gözlemlenmiştir. (45-47). Benzer şekilde duysal denervasyonda da yine yağ doku toplam kütlelerinde artış meydana gelir ancak burada yağ hücre sayısı artışından ziyade, hücrenin boyutunda bir artışın ön planda olduğu ileri sürülmüştür (43, 47). Ayrıca,

norepinefrinin in vitro olarak adiposit öncül hücrelerinin proliferasyonu inhibe ettiği belirtilmektedir (48).

2.3. Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidrazlar (CA EC. 4.2.1.1) aktif bölgesinde prostetik grup olarak üç aminoast kalıntısı tarafından koordine edilen Zn^{+2} içeren ve canlılarda yaygın olarak bulunan enzimlerdir. CO_2 hidrasyonu ve HCO_3^- dehidrasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizlemektedir. Karbonik Anhidraz vücut sıvılarında solunum, asit-baz dengesinin sağlanması, H ve CO_2 dengesi, kemik ve diş rezorbsiyonu, kalsifikasyon, iyon transportu, elektrolit salgısı gibi fonksiyonları icra ederek dokularda birçok önemli rol oynar. Bilinen en temel fonksiyonu CO_2 'nin hücreden dışarı atılmasındaki rolüdür. Kan dolaşımında eritrositlere giren CO_2 'nin %90'ı karbonik anhidrazlar tarafından bikarbonata dönüştürülmektedir. Akciğerlerde bikarbonat tekrar CO_2 'e dönüştürülerek solunum havası ile dışarı atılmaktadır. Metabolik fonksiyonlarda karboksilasyon reaksiyonlarında bikarbonat sağlayıcısı olarak görev yapan karbonik anhidrazlar glukoneogenezis, lipogenezis ve üreogenezis yollarında aktif rol almaktadır. Bu yolaklarda sırasıyla pirüvat karboksilaz (PK), Asetil CoA Karboksilaz (ACC) ve Karbomoil fosfat sentetaz I ve II (CPTI ve CPTII) enzimlerine bikarbonat substratı sağlamaktadırlar. Organizmada bikarbonat karbonik anhidraz bağımlı olarak sentez edilen bir substrattır (49). Kalsifikasyon gerektiren biyolojik olaylarda da karbonik anhidraz karbon tutulumunda görev alan enzimdir. Örneğin kemik ve diş kalsifikasyonlarında veya deniz mercanlarında $CaCO_3$ birikimi için karbonik anhidraz enzimleri rol almaktadır (50, 51).

Karbonik anhidraz gen ailesi α , β , γ , δ , ζ , η , θ , ι olarak adlandırılmış sekiz üyeden oluşur. Birçok organizma birden fazla gen ailesine sahipken insanda karbonik anhidrazı yalnızca α -CA gen ailesi tarafından kodlanır. (52-54). Karbonik anhidrazların memelilerde tanımlanmış 15 farklı izoenzimi vardır (56). Aktif olan oniki izoform (CA I-VA, VB, VI, VII, IX ve XII-XV) ve inaktif üç izoformdan (VIII, X, XI) ibarettir. CA I, CA II, CA III, CAVII, CA XIII sitozolde, CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV hücre membranında, CAVA ve VB mitokondride bulunur ve CAVI tükürükle salgılanır. CA VIII, X ve XI çinko ihtiva etmez, inaktif formlardır. Bu enzimler farklı aktivitelerini aktif bölgelerinde bulunan aminoasit farklılıkları ile gösterirler (49, 55). Karbonik anhidraz izoenzimleri protein

yapıları birbiri ile yüksek oranda homoloji göstermektedirler. Aktif bölgelerindeki aminoasit farklılıkları aktivitelerini etkilemektedir. CO₂ hidrasyon hızı ile değerlendirildiğinde CA II,

IV, VB, VII, IX yüksek hidrasyon aktivitesine sahipken, CA III düşük aktiviteye sahiptir, diğerleri ise orta düzeyde hidrasyon aktivitesine sahiptirler. Karbonik anhidraz izoenzimleri vücutta yaygın doku dağılımı gösterirler. Doku dağılımları ve lokalizasyonları tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. CA izoenzim hücre lokalizasyonları ve doku dağılımları (Chegwidden’den, 57).

İzoenzim	Lokalizasyon	Doku dağılımları
CA I	Sitozolik	Kan, barsak, göz, ter bezleri, adipoz doku, barsak myoepitelyal hücreler, adreal bez zona glomeruloza
CA II	Sitozolik	Yaygın
CA III	Sitozolik	İskelet kası, yağ dokusu, uterus, eritrosit, akciğer, kolon, prostat, testis
CA IV	Membrana bağlı	Böbrek, akciğer, pankreas, barsak, göz, kapiller endotel
CA VA	Mitokondriyal	Karaciğer
CA VB	Mitokondriyal	Yaygın
CA VI	Sekretuar	Tükürük bezleri, meme bezleri
CA VII	Sitozolik	Santral sinir sistemi, aynı zamanda tüm dokularda az miktarda bulunur
CA VIII	Sitozolik	Beyin, özellikle serebellum purkinje ücrelerinde ve yaygın olarak az miktarda tüm dokularda
CA IX	Membrana bağlı	Çeşitli tümör dokuları, gastrik mukoza
CA X	Sitozolik	Beyin
CA XI	Sitozolik	Beyin ancak düşük miktarda tüm dokularda bulunur
CA XII	Membrana bağlı	Yaygın ancak özellikle böbrek, kolon, prostatta bulunur
CA XIII	Sitozolik	Böbrek, beyin, akciğer, barsak, reproduktif organlar
CA XIV	Membrana bağlı	Özellikle böbrek ve kalpte ancak yaygın olarak bulunur

Karbonik anhidrazların izoenzimlerinden CA II, IV, VII solunum ve asit baz düzenlenmesinde; CA II, IV, VII görmede; CA II kemik rezorbsiyonunda; CA II ve V metabolik süreçlerde; CA II ve III kas iskelet fonksiyonlarında; CA IX ve XIII tümör gelişimde rol oynarlar. En yaygın olarak bulunan CA II genel olarak tüm süreçlerde görev almaktadır. CA I eritrositlerde CA II'den yaklaşık beş-altı kat fazla miktarda bulunmasına rağmen aktivitesi CA II'nin yaklaşık %15' i kadardır. Karbonik anhidrazların birçok hastalıkla ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Tablo 2).

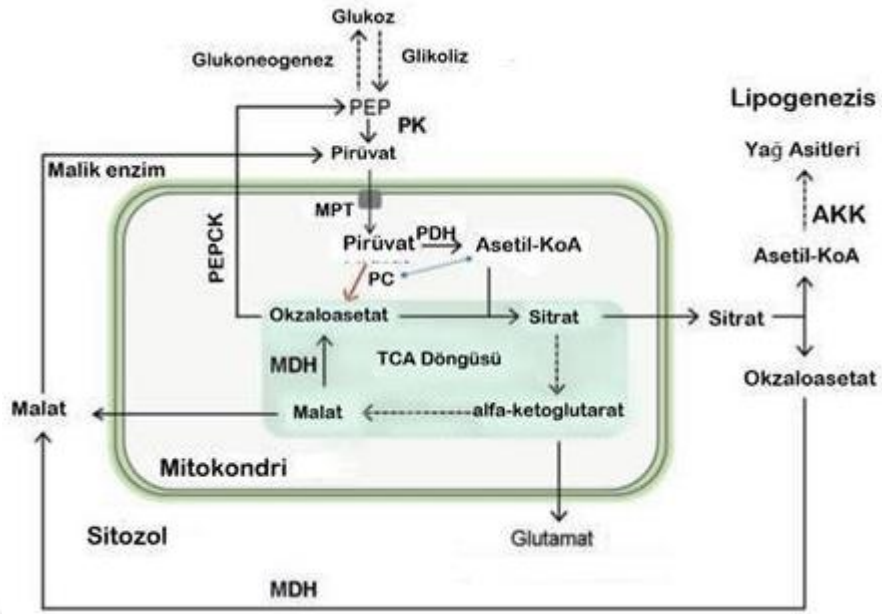
Tablo 2. CA izoenzimlerinin ilişkili olduğu hastalıklar

CA İzoenzimi	İlişkili hastalıklar
CA I	Yüksekliği: Meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, prostat kanseri,sepsis, şistozomiyazis, diyabetik nefropati (58-63). Eksikliği: osteopetrozis, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyon(58).Otoantikörler: Aterosklerotik plak
CA II	(64) Yüksekliği: gastrointestinal stromal tümörler (65), Alzheimer, epilepsi, pulmoner hipertansiyon, psödötümör serebri, akut dağ hastalığı (66-71)
CA III	Düşüklüğü: Etanole bağlı karaciğer hasarı (72-73).
CA IV	Yüksekliği: Akut myokard hasarı, pankreatit (74-75)
CA V	Eksikliği: Neonatal ve erken çocukluk döneminde açıklanamayan letarji, hiperlaktatemi ve hiperamonyemi (76). Yüksekliği: Pankreatik kanserler
CA VI	Dış çürüklerinde ağız içi sıvısında miktarının arttığı (77-79) Otoantikörler:ağız kuruluğu ile seyreden primer veya sekonder nedenliSjögren's hastalığında tükürükte (80,81).
CA VII	Yükseklikği: Kolorektal kanserlerde (82).
CA IX	Meme, böbrek, kolon, over, baş boyun tümörleri, pankreas ve akciğer kanserleri gibi hipoksik solid tümörlerde ekspresyonunun artışı (83-92)
CA XII	İnvaziv meme kanseri ve çeşitli solid tümörlerde, glokomda ekspresyonunda artış (93-97)
CA XIII	Kolorektal kanserlerde ekspresyonun azalmış (Kummola L., 2005), Otoantikörler: primer ve sekonder Sjögren's sendromu (98)
CA XIV	Glioma, melanoma, karaciğer ve uterus kanser tiplerinde ekspresyonunda artış ve nöronlarda otoakntikörünün tespit edildiği (99- 101)

2.3.1. CA II, CAVA, CAVB

İnsan karbonik anhidraz-II (hCA-II), rapor edilen on beş hCA izoformu arasında en baskın fizyolojik izoformdur. Bu izoform beyin, böbrek, mide mukozası, osteoklastlar, RBC'ler, iskelet kası, testisler, pankreas, akciğerlerde bulunur. Ayrıca retina ve lens gibi gözün farklı anatomik ve hücresel bölgelerinde yüksek kullanılabilirliği nedeniyle, göz içi basıncının düzenlenmesinde diğer on iki katalitik olarak aktif hCA izoformundan daha belirgin bir rol oynar (102).

Lipogenezle ilişkili olan yönü CA II sitozolde asetil-KoA karboksilazın substrat sağlayıcısı olmasıdır. Karbonik anhidrazın CA VA ve VB izoformları hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda mitokondrilerde bulunur ve ürogenez, glukoneogenez ve lipogenez gibi biyosentetik süreçlerde rol alırlar. Bu izoenzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar mitokondride pirüvat karboksilaza ve karbomoil fosfatsentetaz I ve II'ye bikarbonat substratı sağlayıcısıdır. De novo lipogenezde gerekli olan asetil-KoA'nın mitokondriden sitozole taşınması gerekir (Şekil 4). Ancak bilindiği üzere mitokondri membranı asetil-KoA'ya geçirgen değildir. Bu nedenle, mitokondri dışına çıkmak için okzaloasetatla birleşerek sitrat oluşturur, sitrat özel taşıyıcısı ile mitokondri membranından sitozole kolaylıkla taşınır. Bu yolda okzaloasetat, pirüvatın karboksillenmesi ile oluşmaktadır. Burada karboksilleyiçi enzim olan pirüvat karboksilaz ile reaksiyonu gerçekleştirirken substrat olarak bikarbonata ihtiyaç duymaktadır. Bikarbonat sağlayıcısı isemitokondride CA VA ve CAVB'dir. Diğer taraftan sitrat sitozolde sitraz liyaz tarafından asetil-KoA'ya dönüştürülür. Asetil-CoA de novo lipid sentezi için gerekli olan temel bileşik olup asetil-KoA karboksilaz enzimi ile malonil-CoA'ya dönüştürülmektedir. De novo lipid sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan bu reaksiyonda yine substrat olarak bikarbonat gerekmektedir. Sitozoldeki substrat sağlayıcı olan enzim ise CA II'dir. Sonuç olarak enerji metabolizmasında, de novo lipid sentezi yapan dokulara karbonik anhidraz izoenzimlerinden CAVA ve VB mitokondride pirüvat karboksilaz için, CA II izoenzimi sitozolde asetil-CoA karboksilaz için gereken bikarbonat substratını sağlar (49).



Şekil 4. Liogenez ile ilişkili yollar. PEP: fosfoenolpirüvat, PK: pirüvat kinaz, MPT: mitokondri pirüvat taşıyıcısı, PDH: pirüvat dehidrogenaz, PC: pirüvat karboksilaz, PEPCK: posfoenolpirüvat karboksikinaz, MDH; malat dehidrogenaz, AKK: aetil-koa karboksilaz. (Valle'den, 103)

Obezitede de novo lipogenezisi baskılayarak antiobezite çalışmalarında asetil-KoA karboksilazın baskılanmasından ziyade mitokondriyal pirüvat karboksilaz baskılanmasının obeziteyi önlemede daha etkin olabileceğine dair sonuçlar bildirilmiştir. CA üzerinden pirüvat karboksilaz baskılandığında mitokondriyal sitrat konsantrasyonunun azaltıldığı, asetil-KoA enziminin baskılanması ile tam tersi olarak sitrat konsantrasyonunun arttığına dair çalışmalar mevcuttur (104, 105). CA VA ve VB mitokondride benzer fonksiyona sahip iki izoenzim olması akıllara aralarında fonksiyonel olarak bir fark olup olmadığı sorusunu getirmektedir. CAVA ve VB üzerinde yapılan bir araştırmada CA VA ve VB genlerinde knock-out edilmiş, CAVA null farede normal fareye göre daha zayıf bir üreme gözlenmiştir. Devamında beslenmedesteği verilen null farelerde kan amonyak düzeyi yüksek, glukoz düzeyi ise normal olarak gözlenmiştir. CA VB null fareler ile yapılan çalışmada normal bir büyüme, normal kan amonyak ve açlık glukozu düzeylerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Her iki geni de silinmiş(double-knockout-DKO) olan farelerde ise şiddetli büyüme-gelişme problemleri ve yalnızcaCA VA null fareye göre çok daha şiddetli bir amonyak düzeyi izlenmiştir. Ayrıca bu farelerebeslenme desteği verildiğinde de yeterli derecede büyüme elde edilememiştir. DKO farelerdeyaşam süresinin kısaldığı ve açlık kan glukoz düzeyinin de belirgin derecede düşük seyrettiğisaptanmıştır. CA VA ve VB birlikte hem ürogenesis hem

de glukoneogenesis yolaklarına katkısağladıkları, CA VA'nın ürogeneziste daha etkin rol oynadığı sonucuna varılmıştır (106).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve aletleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 3’te listelenmiştir

Tablo 3. Kullanılan cihazlar, malzemeler ve aletler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Etüv	Gallenkamp
Vorteks	Nüve, NM 110
ELISA pleyti	Bioscience
Real Time PCR Cihazı	Roche Light Cyclor 480 II
Santrifüj	Eppendorf
Mağnetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipetler	Eppendorf Research
pH metre	Hanna Instruments
El Homojenizatörü	Qiagen TissueLyser II
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
Mikropleyt okuyucu	VERSA max
Deney tüpleri	SH & GLASS
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R Centrifuge
Thermocycler	PE Biosystem
Nanodrop	Thermo
Derin dondurucu	Thermo -86 °C
Steril DNAaz, RNAaz free pipet uçları	Greiner
Çalkalayıcı	Nüve SL 35
ELISA yıkayıcısı	Biotek0

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan kimyasal madde	Üretici firma
Dietil prikarbonat (DEPC)	Sigma
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Lancaster
Etanol	Lancaster
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
İzopropil alkol	Merck
Disodyum Dihidrojen Fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Etidyum bromür	Merck
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	Sigma
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Merck
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	Merck
Carlo Triton X-100	Merck
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	AppliChem
Kloroform	Merck
NaCl	Sigma

3.3. Kullanılan Ticari Kitler

Kullanılan ticari kitler ve üretici firmaları Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan ticari kitler ve üretici firmaları

Kullanılan ticari kitler	Üretici firma
Rat NE ELISA kiti	IBL- Lot no: END171
Tripure RNA izolasyon kiti	Invitrogen Katalogno:11667165001
GenElute™ Mammalian Total Miniprep kiti	Katalog no: TN70 (Missouri, ABD)
DNAaz I çözeltisi	Qiagen (Almanya)
cDNA sentez kiti	Roche- Kat.no 04896866001
DNA Master SYBR Green I	Roche- Kat.no 12239264001
Rat Car2 primer	IDT
Rat Car5A primer	IDT
Rat Car5B primer	IDT
Rat G6PDH primer (housekeeping)	IDT

3.4. Yöntem

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Yapılan deneylerin tümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun onayı ile yapıldı (protokol no: 2018/41).

3.4.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Projede kullanılacak 16 adet erkek Sprague-Dawley ırkı 180-210 gram ağırlıklarında, 4-6 haftalık erkek sıçanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Deney hayvanları biriminden temin edilip yine aynı yerde deneyler için barındırılıp beslendi. Yem ve su ise ad libitum olarak verildi. Sıçanlar rastgele her grupta 8 adet sıçan olacak şekilde 2 gruba ayrılıp kiloları belirlendi.

1. Grup: Sağ retroperitoneal yağ dokusu tamamen denerve edildi ve 1 ay sonra sakrifiye edildi (sol retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmeyip, kontrol olarak kullanılmak üzere alındı).
2. Grup: Sağ retroperitoneal yağ dokusu tamamen denerve edildi ve 3 ay sonra sakrifiye edildi (sol retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmeyip, kontrol olarak kullanılmak üzere alındı).

Sıçanların anestezi altında batinları açıldı, sağ retroperitoneal yağ pedlerini innerve eden sinir lifleri cerrahi olarak kesildi ve yağ pedleri ile bağlantıları kalmayacak şekilde işlem yapıldı (47, 107) Sol retroperitoneal yağ dokusunun sinir liflerine ulaşmak için gerekli manipülasyonlar yapıldı, ancak kontrol olarak kullanılacağından bu dokuda denervasyon işlemi gerçekleştirilmedi. Daha sonra batinları dikilerek kapatıldı. Kontaminasyonu engellemek için, tüm hayvanlara batin kapatılmadan önce tek doz penisilin 1:2 oranında seyreltilerek batin içi uygulandı.

Birinci grup ratlar bir ay sonra, ikinci grup ratlar üç ay sonra tartıldı ve sakrifiye edildi. Her iki retroperitoneal yağ dokuları çıkarıldı ve dokular tartıldı. Tartımdan hemen sonra dokular DNAaz, RNAaz içermeyen steril ependorflara konuldu. Norepinefrin tayini için alınan doku örneği ölçüm yapılana kadar -80 °C saklandı. Car2, Car5A ve Car5B gen ekspresyonu için alınan dokular sıvı azotta saklandı ve aynı gün RNA izolasyonu yapıp cDNA sentezi gerçekleştirildi ve bu haliyle -80 °C de saklandı.

3.5. Dokuda Norepinefrin Ölçümü

Doku norepinefrin tayini ELISA yöntemi ile yapılmıştır. Norepinefrin tayini IBL marka kit ile (Lot no: END 171) kit içeriğinde belirtilen protokole göre yapıldı. Doku önce homojenize edildi, daha sonra ekstrakte edildi ve ELISA protokolü uygulandı.

3.5.1. Norepinefrin Ölçümünde Kullanılan PBS Çözeltilisinin Hazırlanması

PBS (10 mM, pH 7.4) 8.02 g NaCl, 0.18 g KCl, 0.863 g Na₂HPO₄, 0.471 g NaH₂PO₄ tartılarak 900 mL saf suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 7.4'e ayarlanarak saf su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. PBS tamponu çalışmadan 1 gece önce hazırlanıp +4°C'de bekletildi.

3.5.2. Homojenizasyon Aşaması

Retroperitoneal yağ dokusundan yaklaşık 150 mg ependorf içine alındı ve ependorf içine 1mL soğuk PBS tamponu konuldu. İşlemler buz içinde yapıldı. Ependorf içine +4°C’de bekletilen manyetik bilye konuldu, Qiagen TissueLyser II cihazında 3000 rpm’de 20 dakika homojenize edildi. Homojenat 3 tabaka halinde görüldü. En üstte yağ tabakası(supernatan), ortada infranatan ve altta az bir kısım (cidara yapışık vaziyette görünen) hücre tabakası. İnfranatan kısmı kullanılmak üzere ependorflara alındı.

3.5.3. Doku Norepinefrin Tayin Aşaması

Önerilen protokole uygun olarak örnekler ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Prosedür aşağıda belirtilen basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi.

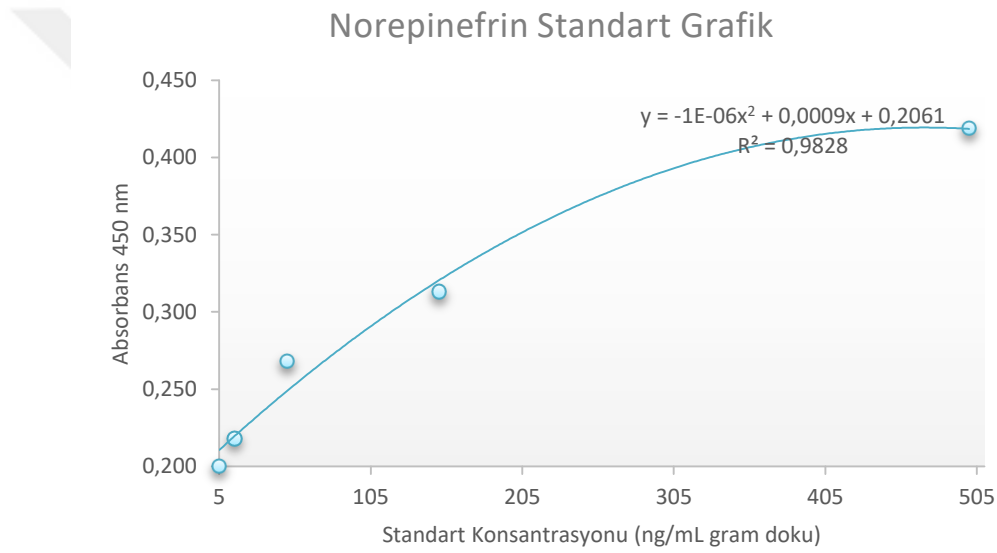
Ekstraksiyon protokolü:

1. Ekstraksiyon pleytinin ilgili oyukları içine her Standart, Kontrol ve ekstraksiyon numunesinden 20 µL pipetlendi.
2. Her kuyucuğa 1 mL Ekstraksiyon Tamponu pipetlendi.
3. Plaka yapışkan folyo ile kaplandı.
4. Bir orbital çalkalayıcıda (600-900 rpm) oda sıcaklığında (18-25°C) 30 dakika ekstrakte edildi. (Ekstraksiyon sırasında sıvının yüzeyi yapışkan folyoyu ıslatmalıdır, ancak sıvı seviyesi kuyunun 2 / 3'ünü geçmemelidir. (Sıçraması sonuçları etkilemez.).
5. Folyo çıkarıldı, kuyucuklardaki sıvı döküldü. Her kuyucuğa 2 mL bidistile su eklendi ve plaka yeni yapışkan folyo ile kapatıldı.
6. Bir orbital çalkalayıcıda (600-900 rpm) oda sıcaklığında (18-25°C) 5 dakika çalkalandı.
7. Beşinci aşama tekrarlandı.
8. Her kuyuya 150 µL Ekstraksiyon Tamponu ve 50 µL Acylation Reagent pipetlendi, pipetlemeden hemen sonra karıştırıldı.
9. Orbital bir çalkalayıcıda (400-600 rpm) oda sıcaklığında (18-25°C) (yapışkan folyo olmadan) 20 dakika ekstrakte edin.
10. Beşinci aşama tekrarlandı.
11. Altıncı aşama tekrarlandı.
12. Beşinci aşama tekrarlandı.

13. Her kuyucuğa 300 µL Release Buffer pipetlendi.
14. Orbital çalkalayıcıda (400-600 rpm) oda sıcaklığında (18-25°C) (yapışkan folyo olmadan) 30 dakika çalkalandı.

Hazırlanan örnekler için önerilen uygulama aynı gün test edilmesidir. Bu mümkün değilse, gece boyunca 2-8 °C'de yapışkan folyo ile kaplı halde saklanması önerilmekte olduğundan hazırlanan ekstraksiyonlar ekstraksiyon pleytinde 2-8°C'de bir gece saklandı.

Ekstrakte edilen örnekler ELISA protokolüne uygun olarak çalışıldı. Norepinefrin standart grafiği Şekil 5'te verilmiştir. Sonuçlar g yaş doku başına verilmiştir.



Şekil 5. Doku norepinefrin düzeyi standart grafiği

3.6. Yağ Dokusunda Total RNA İzolasyonu

3.6.1. Total RNA İzolasyonunda Kullanılan Dietilpirokarbonat (DEPC)'in Hazırlanışı:

%97'lik stok DEPC'den %0.1'(v/v)'lik 500 mL DEPC'li su hazırlandı ve 2 saat süresince 370C'de inkübe edildi. Ardından 20 dk otoklavlandı. Eldi edilen çözeltinin bozulması ve ışıktan etkilenmemesini engellemek için +4oC'de koyu renkli şişede saklandı. Retroperitoneal yağ dokularının parçalanması ve tartımı süresince kullanılan tüm malzemeler distile su ve ardından, dokulardan total RNA izolasyonu aşamasındaki muhtemel RNA kaybını azaltmak amacıyla, DEPC'li su ile muamele edilerek kullanıldı.

3.6.2. Retroperitoneal Yağ Dokusundan Total RNA İzolasyonu

İzolasyon Guang ve Yang'ın geliştirdiği yöntem ile Tripure RNA İzolasyon Kiti ve GenElute™ Mammalian Total Miniprep kiti içeriğinde kullanılan malzemelerle aşağıda verilen aşamalarda gerçekleştirildi.

DNAaz I çözeltisi: Qiagen firması DNAaz seti içinde bulunan reaktifle hazırlandı. Liyofilize DNAaz I 550 µL DEPC'li su ile hafifçe karıştırılarak çözüldü.

DNAaz çalışma çözeltisi: 0.15 M NaCl (Sigma) ile 1:7 oranında karıştırılmasıyla eldi edildi. Bu aşamada DNAaz denatüre olmasını engellemek için vorteksleme yapılmamalıdır. (Burada RDD tamponu ile hazırlanması önerilmekle birlikte elimizde RDD tamponu olmadığından NaCl kullanıldı)

İzolasyon Basamakları

1. 1.5 mL RNAaz içermeyen reaksiyon tüpüne yaklaşık 300 mg yağ dokusu konuldu. Üzerine 1 mL Tripure izolasyon reaktifi (Roche, İsviçre) eklendi ve el homojenizatörü yardımıyla 30 saniye boyunca homojenize edildi.
2. Tüpler 20 dk oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 12000 g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki yağ tabakası atıldı. Ortada kalan hafif pembe renkli tabaka RNAaz içermeyen başka tüpe alındı.
3. Üzerine 200 µL kloroform eklendi ve 15 saniye boyunca elde kuvvetlice çalkalandı (vorteksleme yapılmaz)
4. Oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Ardından 12000 g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi.
5. Üstte kalan renksiz faz reaksiyon tüpüne alındı ve kendi hacmi kadar %70'lik etanol eklendi, vorteksleme yapıldı.
6. Bu GenElute™ Mammalian Total Miniprep kitine geçilir. Etanol içeren karışımın 700 µL'si kit içeriğinde bulunan filtrasyon kolonuna yüklendi ve 12000 g'de 4 °C'de 18 saniye santrifüj edildi.
7. Kolona 250 µL yıkama çözeltisi eklendi ve yine 12000 g'de 4 °C'de 18 saniye santrifüj edildi.
8. Kolona 80 µL DNAaz stok çözeltiden elde edilen DNAaz I çözeltisi eklendi, 15 dakika inkübe edildi, vortekslendi.

9. 250 µL yıkama çözeltisi eklendi ve yine 12000 g'de 4 °C'de 18 saniye santrifüj edildi.
10. Kolon kit içeriğinde bulunan yeni toplama tüplerine alındı.
11. Kolona 500 µL yıkama çözeltisi II eklendi ve 12000 g'de 4 °C'de 18 saniye santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Alttaki sıvı kısım atıldı.
12. Boş kolon kolonda kalan etanolün uzaklaştırılması için 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
13. Kolon reaksiyon tüpüne konulduktan sonra 60 °C'de ısıtılan elüsyon çözeltisinin 100 µL'si kolonun merkezine gelecek şekilde pipetlendi ve hafifçe vortekslendi.
14. Kolon 60°C'de 3 dakika bekletildi, 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
15. Elde edilen RNA numuneler RNAaz/DNAaz'dan yoksun reaksiyon tüplerine alındı.

3.6.3. Total RNA İzolasyonu Sonucu Elde Edilen RNA Miktarının Belirlenmesi

Elde Edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflığının belirlenmesi için bir gösterge olan A260/A280 oranı NanoDrop kullanılarak belirlendi. İzole RNA'lar elüsyon çözeltisinde çözüldüğü için, ölçümde kör olarak elüsyon çözeltisi kullanıldı. Total RNA numuneleri ng/µL cinsinden hesaplandı. Saflık oranı 1.8 civarında bulundu.

3.7. Total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi

Elde edilen Total RNA'lardan cDNA sentezi Roche(İsviçre) marka "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA numunelerinden cDNA sentezi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

cDNA sentezi için gerekli karışım 1.5 mL'lik RNAaz/DNAaz'dan yoksun reaksiyon tüplerinde Tablo 6'da verilen reaktifler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 6. cDNA sentezi hazırlığında kullanılan reaktifler ve miktarları

Raktifler	Hacim (µL)
Su	1

Tampon	4
RNAaz İnhibitörü	0.5
dNTP karışımı (10 mM)	2
Random Hekzamer Primer	2
Revers Transkriptaz (20 U/ μ L)	0.5

Numunelerden elde edilen 10 μ L total RNA'ya hazırlanan karışımdan 10'ar μ L eklendi. PCR cihazı 25°C'de 10 dk, 55°C'de 30 dk ve 85°C'de 5 dk olacak şekilde programlandı. Hazırlanan numuneler cihaza yüklendi ve reaksiyonların sonucunda total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Oluşan cDNA konsantrasyonları (ng/ μ L) ve saflığı Nanodrop cihazında 1.8 civarında olduğu tespit edildi. -80 °C'de gen ekspresyonu yapılarına kadar saklandı. cDNA'ların konsantrasyonları 100 ng/ μ L'ye seyreltildi.

3.8. RT-PCR

Gen ekspresyonu Light Cycler® 480 cihazında, SYBR Green I Master Kiti (Roche) ile gerçekleştirildi. Her bir gen ekspresyonu için; aşağıdaki Tablo 7'ye göre RT-PCR karışımı hazırlandı.

Tablo 7. RT-PCR karışımı hazırlanması

Reaktif	Hacim (1 örnek için gerekli olan)
SYBR GreenER qPCR Supermix	10
10 μ M ileri primer	1
10 μ M geri primer	1
Nukleaz free su	3
cDNA (100 ng/mL)	5

Gen ekspresyonu için kullanılacak primer dizilimleri <https://genome.ucsc.edu>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder> ve <http://bioinfo.ut.ee/primer> 3-0.4.0 programları kullanılarak rat genomuna göre tasarlandı. Gen ekspresyonu analizlerinde, CA II için Car2,

CarVA için Car5A, CAVB için Car5B ve housekeeping olarak G6PDH kullanıldı. Gen dizilerini çoğaltmak için kullanılan primerler dizileri Tablo 8'de gösterilmiştir. SYBR

Green I yöntemi spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında kullanılır. SYBR Green I sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artış ile birlikte okunan floresan miktarı eş zamanlı olarak artar. "SYBR Green I" 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanır ve 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder (128).

Tablo 8. Gen ekspresyonunda kullanılan primer dizileri

Gen	Primer	Primer Dizini
Car2	İleri primer	5'- CAGCCTCTGCTCATATGTTACG -3'
	Geri primer	5'-TTTGTTACGGTGTGCTCAG -3'
Car5A	İleri primer	5'- TAGTGTCTATGACCCGAAGCTG -3'
	Geri primer	5'- AGAGCCCCATTCATCTGTTG -3'
Car5B	İleri primer	5'- GCAGTCACCCATCAACATCC -3'
	Geri primer	5'- TAGTTATGTTCCAGGGGTCCTC -3'
GAPDH	İleri primer	5'- GCAAACAGAGTGAGCCCTTC -3'
	Geri primer	5'- TGGCTGTTGAGGTGCTTG -3'

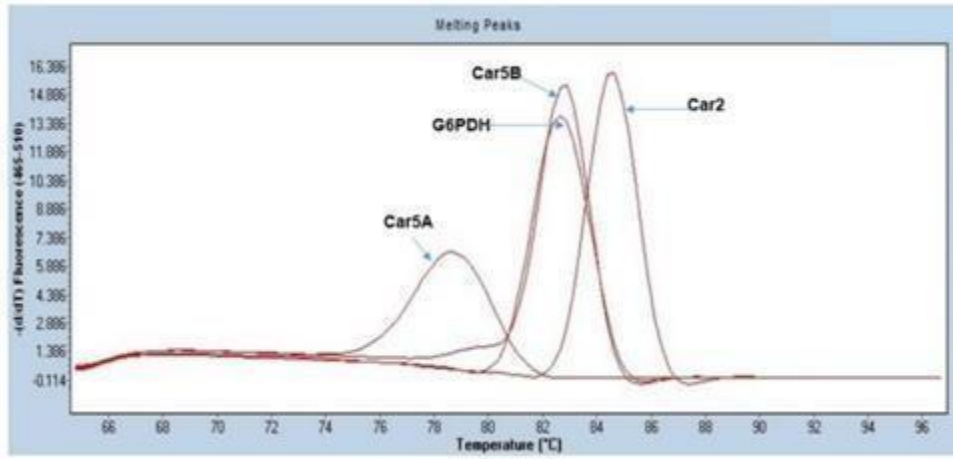
RT-PCR için özel olarak üretilmiş 96 kuyucuklu pleyt her bir numunenin bir hedef ve bir referans geni(G6PDH) için iki reaksiyon olacak şekilde tasarlandı. Ayrıca negatif kontrol olarak PCR saflığında su kullanıldı. Herbir kuyucuğa Tablo 7'de verilen karışımdan eklendi. Tabloda karışım topluca verilmiş olsa da çalışma esnasında ilgili kuyucuklara 3 µL su ve 5 µL cDNA önceden ayrı olarak pipetlendi. Burada amaç cDNA örneklerinin pipetlemeler esnasında dış ortamda fazla tutulmasını ve dolayısıyla bozulmasını engellemek idi. Daha sonra hazırlanan karışımdan 12 µL kuyucuklara pipetlendi. Pleyt kaplama folyosu ile pleyt sıkıca kapatıldı ve 1500 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Pleyt Ligth Cycler® 480 II RT-PCR cihazına yüklendi. RT-PCR protokolü Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. RT-PCR protokolü

Program	Döngü	Analiz modu
Ön inkübasyon	1	Yok

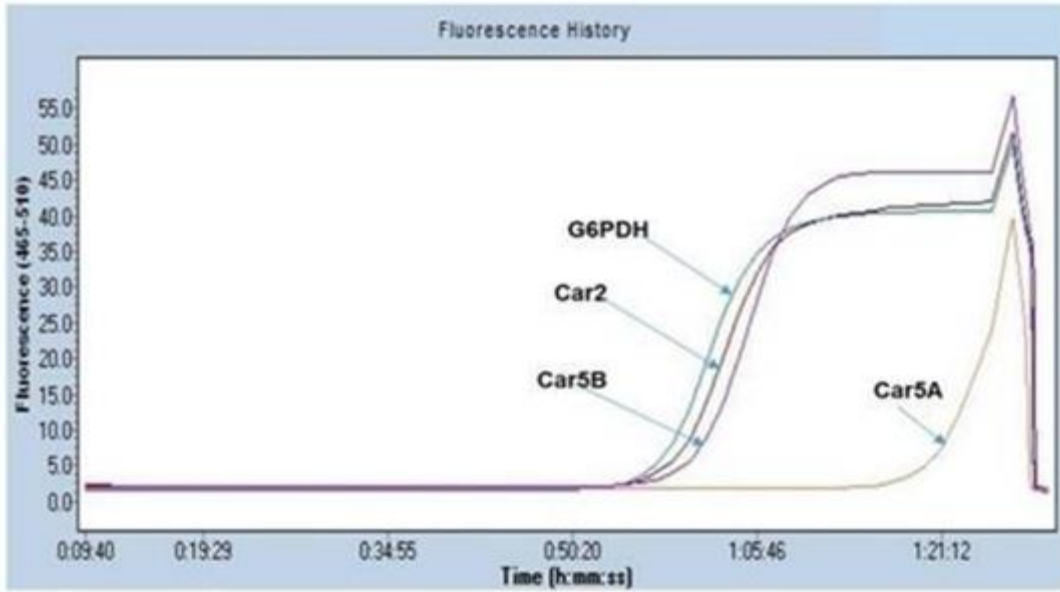
Amplifikasyon	55	Miktar tayini	
Erime eğrisi	1	Erime eğrisi	
Soğuma	1	yok	
Hedef	Elde etme modu	Süre[saat:dk:s]	Sıcaklık artışı[°C/s]
sıcaklık[°C]			
Ön inkübasyon			
95	yok	00:08:00	4.4
Amplifikasyon			
95	yok	00:00:10	4.4
58	yok	00:00:15	2.2
72	tek	00:00:20	4.4
Erime eğrisi			
95	yok	00:00:05	4.4
65	yok	00:01:00	2.2
97	Sürekli	Yok	0.11
Soğuma			
40	yok	00:00:30	1.5

Çalışmada elde ettiğimiz RT-PCR sonuçlarına göre kullandığımız Car2, Car5A ve Car5B primerlerin çalışmamıza uygun olduğu ve yan ürün oluşturmadığı gözlemlendi. Buna ilişkin örnek erime noktası grafiği Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Car2, Car5A ve Car5B için erime noktası grafiği

RT-PCR çalışmasında Car2, Car5A, Car5B ve GAPDH'a ait amplifikasyon grafiği Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Car2, Car5A, Car5B ve GAPDH'a ait amplifikasyon grafiği

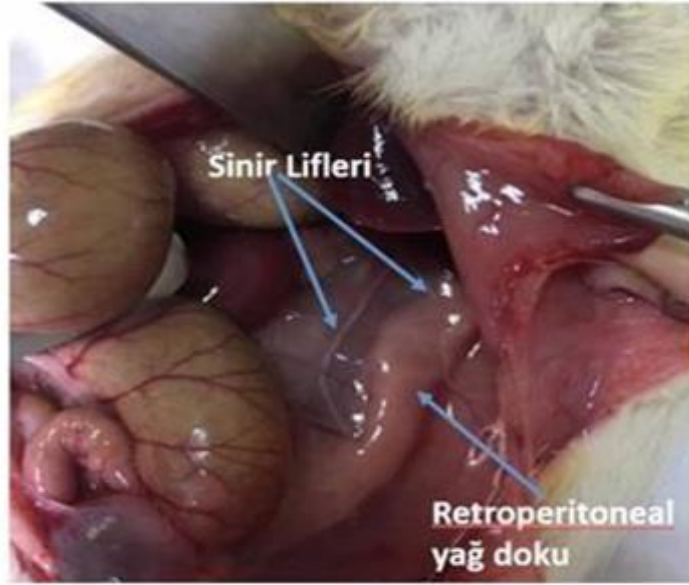
3.9. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak verildi. Grup ortalamalarının karşılaştırılması için Kruskal Wallis testi, Post-Hoc olarak da bağımlı değişkenler arasında Wilcoxon testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gen ekspresyonu hesabında Fold Change kullanıldı.

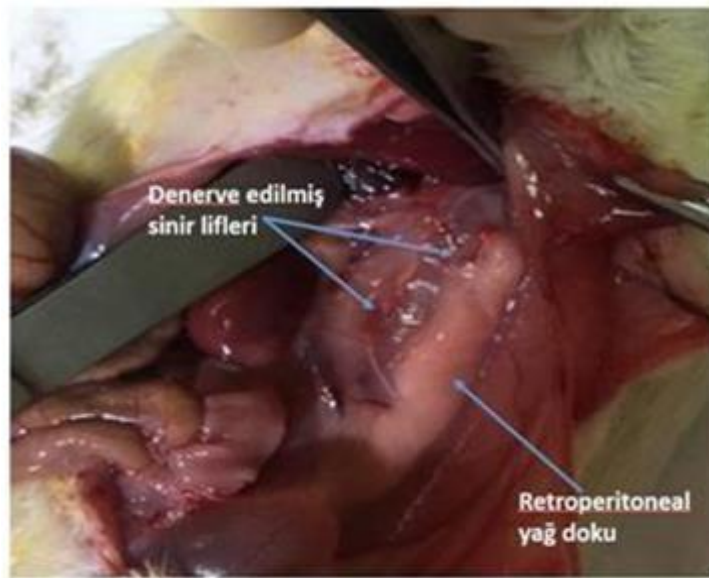
4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Bulgular

İki grup sağ retroperitoneal dokuya giden sinir liflerine denervasyon işlemi yapılarak birinci grup bir ay sonra, ikinci grup üç ay sonra sakrifiye edilerek her iki taraftaki retroperitoneal dokuları alındı. Denervasyon işlemi yapılmadan önce görüntüleri Şekil 8’de ve denerve edilmiş sinir lifleri Şekil 9’da gösterilmiştir.



Resim 1. Denervasyon öncesi retroperitoneal yağ dokusu ve sinir lifleri



Resim 2. Retroperitoneal yağ dokusu ve Denerve edilmiş sinir lifleri

4.2. Deney Gruplarının Retroperitoneal Yağ Doku Ağırlık Ölçümü Sonuçları

Retroperitoneal yağ dokusu ağırlıkları Tablo 10’da verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, bir aylık denervasyon grubunda Denerve edilen ve kontrol doku ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p= 0.024$). Üç aylık denervasyon grubunda denerve edilen ve kontrol doku ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.436$).

Tablo 10. Retroperitoneal yağ dokusu ağırlık sonuçları (gram)

	Kontrol	Denerve edilen	p
1. Grup	0.68±0.27	0.88±0.32	0.024
2. Grup	1.41±0.43	1.61±0.36	0.436

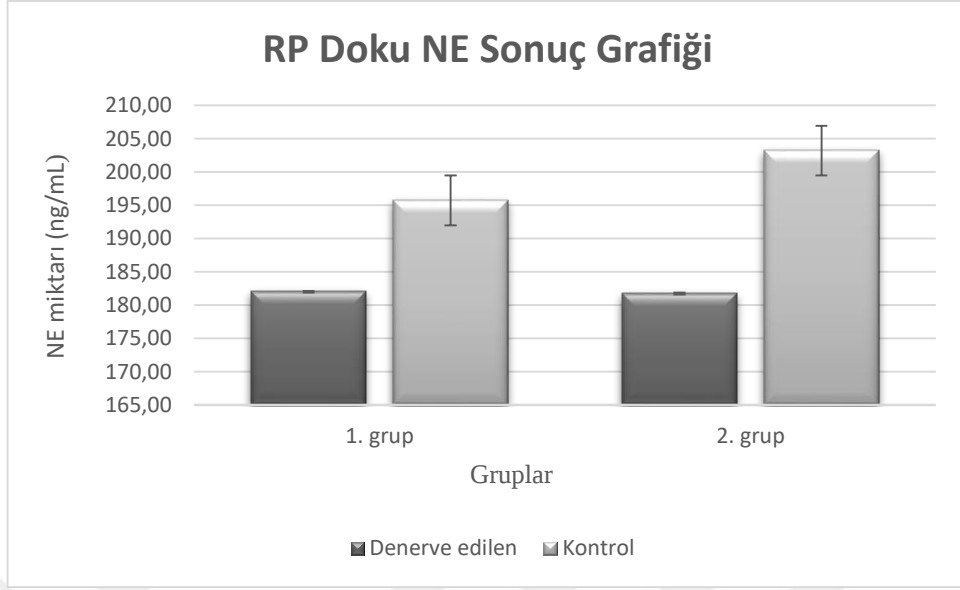
4.3. Retroperitoneal Yağ Dokularında Norepinefrin Ölçüm Sonuçları

Denervasyon markırı olan NE’nin, denerve edilmiş sağ RP doku ile kontrol dokusunda anlamlı fark belirlendi ($p<0.05$). Sonuçlar Şekil 8 ve Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Retroperitoneal yağ dokularında norepinefrin ölçüm sonuçları

	Kontrol (ng/g yağ doku)	Denerve edilen (ng/g yağ doku)	p
1.Grup (1Aylık)	195.74±10.88	182.01±3.55	0.018*
2.Grup (3Aylık)	203.20±16.76	181.75±1.81	0.017**

*: 1.grup kontrole göre **: 2.grup kontrole göre



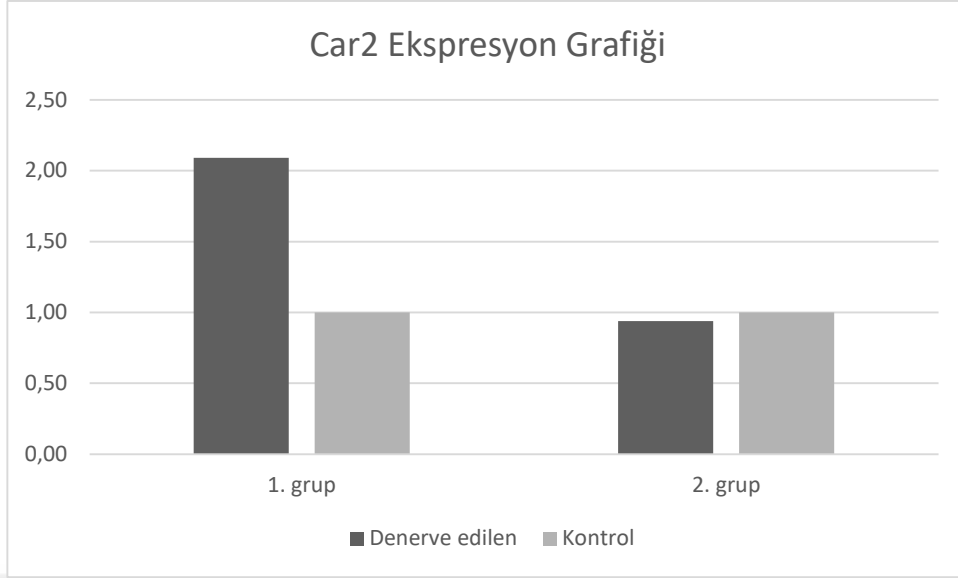
Şekil 8. Retroperitoneal yağ doku norepinefrin düzeyleri

4.4. Retroperitoneal Yağ Dokularında Gen Ekspresyonu Sonuçları

Car2 gen ekspresyonu birinci grupta hayvanlarda denerve edilmiş tarafta 2,09 kat yüksek bulundu. İkinci grupta ise bu değer 0,94 olarak bulunmuştur. Car5A gen ekspresyon kat değerlerinde denerve edilmiş tarafta 1,98 kat yüksek bulundu. İkinci grupta ise bu değer 0,71 olarak bulunmuştur. Car5B birinci grupta kat değişim değeri 2,58 iken ikinci grupta belirgin bir 1,37 bulundu. Gen ekspresyon değerleri Tablo 12,13 ve 14'te; grafikler Şekil 11,12 ve 13'te gösterilmiştir.

Tablo 12. Car2 gen ekspresyonu kat değişimi (Fold Change) değerleri

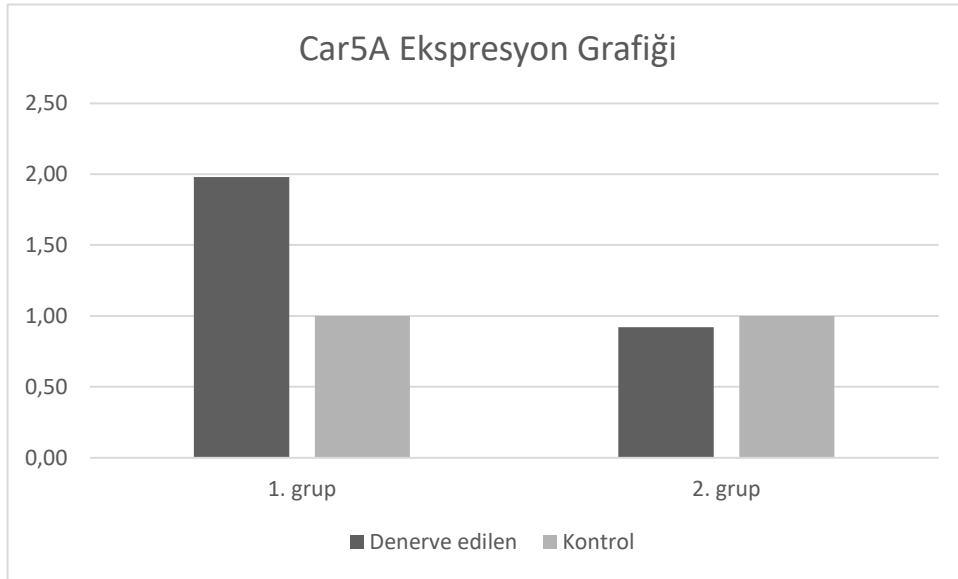
	Kontrol	Denerve Edilen
1. Grup	1	2,09
2. Grup	1	0,94



Şekil 9. Car2 gen ekspresyon grafiği

Tablo 13. Car5A gen ekspresyonu kat değişimi (Fold Change) değerleri

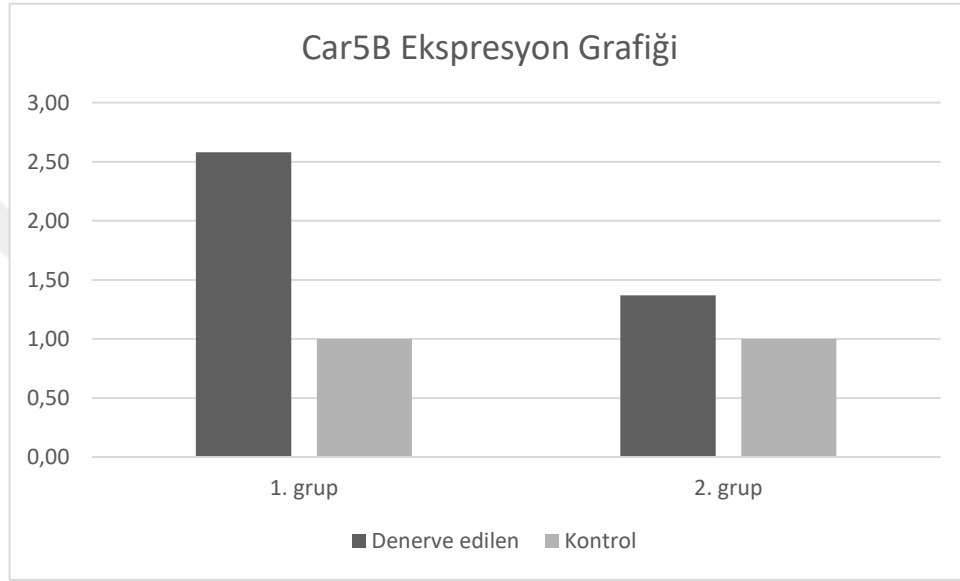
	Kontrol	Denerve Edilen
1. Grup	1	1,98
2. Grup	1	0,92



Şekil 10. Car5A gen ekspresyon grafiği

Tablo 14. Car5B gen ekspresyonu kat değişimi (Fold Change) değerleri

	Kontrol	Denerve Edilen
1. Grup	1	2,58
2. Grup	1	1,37



şekil 11. Car5B gen ekspresyon grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Beyin ile beyaz yağ dokusu arasındaki bilinen iletişim ağı, sempatik eferent nöronlar, yağ dokusundan dolaşıma salınan faktörler ve santral sinir sistemine giden afferent sinir ağlarından oluşmaktadır. Beyaz yağ dokusunda yapılan histofloresans çalışmalar (108-111), elektron mikroskopi çalışmaları (110) ve bir sempatik sinir belirteci olan tirozin hidroksilaz kullanılarak yapılan immunhistokimyasal çalışmalarla (43, 47, 112, 113) sempatik inervasyon kanıtlarına ulaşılmıştır. Beyaz yağ dokusunda sempatik sistem eferent nöronları ile duyuşsal afferent nöronlar bulunmaktadır. Beyaz yağ dokusunun metabolik durumu duyuşsal nöronların ulaştırdığı sinyallerle beyine bildirilir. Sempatik sinirler dokuya salgıladıkları katekolaminlerle beyaz yağ dokusunda lipolizi artırırılar. Burada katekolamin etkisinin yalnızca lipoliz ile kalmadığı beraberinde öncül adiposit hücrelerin proliferasyonunu baskılayarak yağ dokusu kütleşinde ve hücre sayısında azalmayı sağladığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (2).

Adipoz doku inervasyonu konusu OSS'nin hangi kısmından sağlandığına dair yapılan çalışmalar sürmektedir. Sadece sempatik ve hem sempatik hem de parasempatik inervasyona sahip olduğu şeklinde iki farklı görüş mevcut olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda “psödorabies virüsü ile transnöronal retrograde tracing” yönteminin ortaya çıkışı ile adipoz dokunun sempatik sinir sistemi eferent nöronlarıyla inerve edildiğini kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. Yaygın görüş sempatik inervasyona sahip olduğu ve parasempatik inervasyona sahip olmadığı yönündedir (114). Dikkat çekilmesi gereken nokta adipoz dokunun yerleşim yerine göre (visseral, derialtı, alt abdomen, orta ve üst abdomen vb) OSS sonlanmalarının değişebileceğidir. Örneğin abdominal organlar yoğun vagal uyarılar almaktadır ve aynı zamanda yoğun sempatik sinir sonlanmalarına da sahiptirler. Bu organların çevresinde bulunan yağ dokusu lipotoksik özellikleriyle Tip2 diyabette öne çıkmaktadır (115)

Beyaz yağ dokusunda lipoliz, insülin hormonu ve katekolaminler arasındaki denge ile sağlanmaktadır. İnsülin antilipolitik etkiye sahip iken katekolaminler lipolizi desteklemektedir. İnsülin organizmada enerji düzenlenmesi ve lipid metabolizması ile doğrudan ilişkili bir anabolik hormondur. Katekolaminler ise lipid metabolizması açısından beta reseptörleri vasıtasıyla lipid mobilizasyonu yönünde çalışan katabolik hormonlardır (116).

Denervasyon çalışmaları dokuların metabolik aktivitesi üzerinde sinir sisteminin etkilerini araştırmaya yönelik olan çalışmalardır. Yağ dokusu üzerinde yapılan denervasyon çalışmalarında genellikle bir veya birkaç farklı lokalizasyondaki yağ dokusu sinirleri kesilerek yapılmaktadır. Çalışmalar lipolitik/antilipolitik aktivite, hücre sayı ve boyutundaki değişimler, metabolik kapasite değişimleri üzerine yoğunlaşmaktadır (27). Denervasyon cerrahi veya kimyasal olarak yapılabilen, böylece farklı sinir hücre gruplarının farklı etkileri üzerinde çalışılabilmektedir. Sempatik denervasyon çalışmalarında denervasyon başarısı doku norepinefrin düzeyi ölçümü ile yapılabilen iken, duysal sinir denervasyonunun başarısını CGRP, Nöropeptid Y gibi hormonlarla yapılabilmektedir. Bunların yanında doku ağırlıklarının ölçümü de önemli ipuçları sunmaktadır (117).

Bu çalışmada cerrahi denervasyon yaparak retroperitoneal yağ dokusuna gelen ve giden tüm sinirleri denerve ettik. Denervasyon başarısını doku norepinefrin düzeyini ölçerek değerlendirdik. Gruplar arasında doku norepinefrin düzeyinde denerve edilen doku ile kontrol doku arasında anlamlı fark bulundu. Beklenildiği gibi denerve edilen dokuda kontrol tarafa göre doku norepinefrin düzeyini düşük olarak gözlemledik (Tablo 10, Şekil 12) (sırasıyla 1 ve 2. Grup $p=0.017$ ve 0.018). Denervasyonu takip eden 1. ve 3. aydaki doku norepinefrin düzeyi denerve edilen tarafta sırasıyla 181.75 ve 182.01 ng/mL bulundu. Bu veriye doku ağırlık sonuçlarını da ekleyecek olursak; Doku ağırlıklarını değerlendirdiğimizde 1. grupta denervasyonu takip eden 1. ayda doku ağırlığı ortalaması kontrol tarafta 0.22 g düşük iken, 2. Grupta takip eden 3. ayda doku ağırlığı ortalaması kontrol tarafta 0.20 g düşük olarak tartıldı. Yüzde olarak düşünüldüğünde 1. gruptaki artış 1 ayda %33 iken, 2. Gruptaki artış 3 ayda %14'tür. (Tablo 10) Böylece 2. gruptaki hayvanların vücut ağırlık artışı devam etmesine rağmen esasen denerve yağ dokunun ağırlığındaki artışın bir süre sonra yavaşladığı izlenmiştir. Sonuç olarak denervasyon zaman içerisinde farklı metabolik mekanizmalar ile doku düzeyinde kompanse edilmiş olabilir. Literatürde bir bölge yağ dokusunun (örneğin inguinal, retroperitoneal vb) denerve edilmesinin başka bir bölge yağ dokusunda artışa neden olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur (21). Vurgulanan nokta normal şartlar altında beyne giden sinyaller sonucu beyin vücut toplam yağ kapasitesinin belirli bir seviyede tutulmasını sağlama yeteneğine sahip olduğu görüşü ortaya atılmıştır (30). Retroperitoneal yağ dokusu artışı birinci grupta anlamlı farklı bulunmuş, ikinci grupta ise bu fark ortadan kalkmıştır. Farkın ortadan kalkmasına rağmen ratların toplam ağırlığının

haftasına göre beklenen artışa sahip olması beyin ve toplam vücut yağ dokusu arasındaki çapraz iletişimden bahsedilebilir.

Ayrıca denervasyona bağlı vücut ağırlı değişiminde denervasyonun süresi, lateral veya bilateral uygulanması ve bu süreçte vücuttaki enerji dengesine bağlı değişikliklerde etkili olabilir. Denervasyonu takiben yağ dokusundaki ağırlık artışının, denervasyonun yağ dokusunda obeziteyi taklit ettiğini göstermektedir. Kahraman ve ark. farklı enerji durumlarında (yüksek yağlı diyet ve kontrol diyeti) denervasyonun genel metabolik durumu etkilerini araştırdıkları uzun süreli (70 gün) araştırmada, bilateral olarak retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmiş kontrol diyeti ile beslenen sıçanlarda vücut ağırlıklarında, adipokin seviyelerinde ve kan TG konsantrasyonunda artışlar tespit etmişlerdir. Pozitif enerji dengesinde ise (yüksek yağlı diyet kullanımı) denervasyona bağlı olarak vücut ağırlıklarında ve adipokin seviyelerinde düşüşler gözlemlenmiştir. Bu durum değişen enerji seviyelerinde denervasyonun farklı mekanizmaları kullandığını göstermektedir (126).

Yağ dokusunda, yağ sentezi iki yolla meydana gelir. Bunlardan biri dolaşımdan lipoprotein lipaz vasıtasıyla lipoprotein içeriğinde bulunan yağ asitlerinin hücreye alınması ve bu yağ asitlerinden hücre içinde trigliserid sentezlenmesidir. Bir diğer yol hücre içinde de novo lipid sentezidir. De novo sentezde hücre içinde lipid dışı moleküllerden (glukoz, aminoasit gibi) yağ asidi sentezi gerçekleştirilir. Hücrenin enzim düzeyi ve enerji kapasitesine göre hücre içinde sentez artmakta veya azalabilmektedir (2, 27). Yağ asidi sentezi sitozolde gerçekleşir. Sentezde hız kısıtlayıcı basamak olan asetil-CoA karboksilaz reaksiyonu için bikarbonata ihtiyaç vardır. Sitozolde bikarbonat sağlayan reaksiyon CA II tarafından katalizlenen karbondioksit hidrasyonu reaksiyonudur (49). Enerji fazlalığı durumunda yağ asidi sentezinin devamlılığı için mitokondri içindeki asetil CoA'nın sitozole çıkması gerekmektedir. Bu taşıma sırasında asetil CoA'nın sitrata dönüşümü için gerekli bikarbonat CA 5A ve CA 5B tarafından sağlanır. Bu enzimlerin de novo lipid sentezi, glukoz homeostazi ve üre sentezi gibi metabolik süreçlerde önemli rolleri olduğu bilinmekle birlikte (118) yağ dokusu denervasyon çalışmalarında karbonik anhidraz izoenzim gen ekspresyonlarının araştırıldığı çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Yağ dokusunda gerçekleştirilen gen ekspresyonu çalışmalarında çoğunlukla GAPDH, Beta aktin ve 18 s rRNA genleri housekeeping gen olarak kullanılmış ve normalizasyonlar bu genler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ancak, Kafeterya diyeti ve denervasyonun gen ekspresyonları çalışmalarında kullanılan housekeeping genlerin değişiminin incelediği çalışmada,

denervasyonun GAPDH gen ekspresyonlarında ciddi değişikler yaptığını gösterilmiştir (127). İncelenen 11 gen içersinde retroperitoneal yağ dokusunda denervasyon sonrası stabilitesi en az olan genlerden biri GAPDH dır. Çalışma denervasyonu takiben 7 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Daha uzun dönemde ilgi genlerin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda 1 aylık ve 3 aylık grupları içerdii için literatür uyumu için GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır (128).

Çalışmamızda, CA II izoenziminin denerve yağ dokuda birinci Grupta 2.09 kat artmış olduğunu bulduk. İkinci grupta ise belirgin bir fark gözlemlenmedi (Tablo 12, Şekil 13). Bu durum denervasyonla birlikte yağ dokusunda erken dönemde de novo lipid sentezinin artışı destekler niteliktedir. Diğer çalışmalarda ve bu çalışmada da gözlenen denervasyon sonrası yağ dokuda meydana gelen kütle artışında yağ asitlerinin sentezinin destekleyecek şekilde Car2 gen ekspresyonu artışı ile gerçekleşmiş olabilir. Ancak, birinci grupta meydana gelen bu değişikliğin üçüncü grupta oluşmadığını gözlemledik. Bu durum yukarıda da bahsedildiği gibi organizmanın kompanzasyon mekanizmalarını devreye sokması ya da sentez kapasitesinin belirli bir noktadan sonra durması nedeniyle meydana gelmiş olabilir. Aynı zamanda doku ağırlık artışının azlığı bu durumu destekler. Car5A gen ekspresyonu birinci grupta 1,98 kat artmakla birlikte ikinci grupta fark gözlenmedi. Car5B gen ekspresyonu ise birinci grupta denerve dokuda 2.58 kat artmış olarak, ikinci grupta ise 1.37 kat arttığı gözlenmiştir. Mitokondriyal izoformlar olan CA 5A ve CA 5B'nin glukoneogenez, lipogenez ve ürejeniz süreçlerinde rol aldığı bildirilmektedir (4). Bir aylık denervasyon grubunda her üç gendeki ekspresyon artışı lipogenezi destekler niteliktedir. Üç aylık denervasyon grubunda ise Car2 ve Car5A'da belirgin farklılık gözlenmemiştir. Mitokondrial karbonik anhidraz izoenzimlerinin doku dağılımları farklıdır. CA5 VA karaciğer ve iskelet kasında bol bulunurken katalitik olarak daha yüksek aktiviteye sahip olan CA VB izoenzimi daha geniş bir doku dağılımı göstermektedir. Dahası CA VB izoenziminin katalitik domaini CA VA izoenzime göre genetik olarak daha korunmuş bulunmaktadır. Doku dağılımı ve domainler arasındaki korunma farkı nedeniyle bu iki izoenzimin farklı metabolik yolları destekleyecekleri ileri sürülmüştür (118). Üre devrinin ilk reaksiyonunu katalizleyen mitokondrial karbamoil fosfat sentetaz için gerekli olan bikarbonat iyonunun CA VA enzimi tarafından sağlanması buna duruma bir örnektir (119). Dikkat çekici bir nokta olarak sempatik uyarımın beyaz yağ dokusunda kahverengileşmeye neden olduğu bildirilmiştir (1). Sempatik sistemin hücre kompartımanları arasında farklı etkiler

oluşturduğuna dair çalışmalar sınırlıdır ancak kahverengileşmede artışa neden olması hücrenin mitokondri sayısında artışa neden olduğu yani sempatik uyarımın mitokondri fonksiyonları üzerine etkili olduğu çıkarımına götürebilir. Nitekim travmatik sinir yaralanmalarında ve kas hastalıklarında mitokondrial fonksiyon kayıplarından dolayı kas atrofisinin meydana geldiği ileri sürülmektedir (120). Bu çalışmalarda denervasyon tarafından indüklenen mitokondri içerik kaybı, kütle kaybı ve oksidatif süreçlerde bozulmalar öne sürülmekle birlikte olayın başlatıcısının denervasyon olduğu belirtilmektedir. Benzer şekilde yağ dokusundaki denervasyonu mitokondri içeriğinde değişikliklere sebep olması uzun dönemde CA VA ve VB deki değişikliklerin tam olarak lipogenezi destekleyecek şekilde gelişmemesine sebep olmuş olabilir. CA VB özellikle glukoneogenez ve lipogeneze artışa neden olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca organizmada tek fonksiyonun iki benzer izoenzim tarafından gerçekleştirilmesi pek olağan bir durum değildir. Bu durum izoenzimlerin hücre içinde metabolizmanın farklı yönlerinde baskın olduğu ve gerektiğinde diğer izoenzimi kompanse edebileceğini akla getirir. Burada vurgulamak istediğimiz nokta organ düzeyinde izoenzim dağılımlarının farklı olabileceği, dolayısıyla metabolizmanın değerlendirilmesinde bütüncül bir yaklaşımın doğru olacağıdır.

Çalışmamızda üçüncü ayda Car2 ve Car5A ekspresyonları kontrol tarafla benzer şekilde bulunmuş olup; Car5B'nin 1.37 kat daha yüksek olması her ne kadar mitokondriyal asetil-KoA çıkışını destekliyor olsa da sitozolde de novo lipogenezi destekleyecek bulguya rastlanmamıştır. Bu durumu aydınlatmak için de novo lipogeneziste hız kısıtlayıcı basamağı katalizleyen asetil-KoA Karboksilaz enziminin ekspresyon ürünlerine bakılması yerinde olacaktır. Yine ekspresyonların protein ürününe dönüşüp dönüşmediği sorusu da önemlidir. Zira CA VB ekspresyonu artmıştır ancak enzim miktarı ve hatta aktivite tayini ile değerlendirmek gerekli olabilir. Yine de sonuç olarak CA5A'nın ve 5B'nin aynı doku kompartımanında farklı enzimlere farklı afinite gösterdiği barizdir. Bu minvalde lipogenez (ve glukoneogenez) yollarında mitokondriyal Asetil-KoA dönüşümü için substrat sağlayıcı olarak ağırlıklı izoenzim CA VB denilebilir. Spesifik olarak CA izoenzimlerin aktivitesini ölçecek yöntemler maalesef günümüzde halen geliştirilememiştir. Birçok araştırmacı spesifik izoenzim aktivitesi yerine toplam CA aktivitesini ölçmektedir. Bölümümüzde yağ dokusu denervasyonunun yapıldığı bir tez çalışmasında, gen ekspresyon çalışmalarımızı doğrulayacak şekilde denerve yağ dokularında toplam CA aktivitesi yüksek bulunmuştur (121-125)

Çalışmamızda, retroperitoneal yağ dokusunda denervasyonu takip eden ilk aydaki denerve yağ dokusundaki Car2, Car5A ve Car5B izoenzimlerinin gen ekspresyonlarının de novo lipid sentezini destekleyecek yönde değiştiği ve sonuçta denerve yağ dokusundaki kütle artışına katkı sağladığı; üçüncü ayda ekspresyon düzeylerinin bazal seviyeye yakın olmasının adipoz doku ile beyin arasındaki iletişimin önemini ortaya çıkarmaktadır. Adipoz dokudan salgılanan faktörlerin beyine iletilmesi sonucu ortaya çıkan sinyaller hem hormonal hem de nöral iletimle ilgili dokulara ulaştırılmakta ve böylece metabolik adaptasyon sağlanmaktadır. Dokulardaki metabolik değişiklikler akut ve ilerleyen dönemde farklı özellikler gösterebilir. Ani değişikliklere akut dönemde verilen yanıt, beyin-doku arasındaki iletişimin neticesinde organizmanın tümüne etki eden sinyaller aracılığıyla düzenlenir. Çalışmamızda sempatik ve afferent nöral sinyalin kesilmesi ile dokuda akut dönemde lipogenezisi artırmıştır. Ancak dokudan kaynaklanan diğer hormonal sinyallerin beyine iletilmesi dokunun ileri dönem adaptasyonunu sağlamış olabilir. Nöral ve hormonal sinyaller birlikte organizmada homeostazisi sağlar. Sonuç olarak metabolizmada meydana gelen değişikliklerden kaynaklanan sinyaller ayrı ayrı farklı etkilere sahip olsa da sağlıklı bir organizmada homeostazis, beyin-doku iletişimi vasıtasıyla organizmanın bütününde tesis edilir.

Öneriler:

Denervasyonun, lipid sentezinde etkili diğer enzimlere (piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz gibi) etkileri incelenebilir.

Yağ dokusu kütle artışında de novo sentezin yanı sıra ekzojen lipidlerin dokuda birikmesine bağlı bir artış da gerçekleşebilir. Bu haliyle denerve yağ dokularında lipoprotein lipaz durumu değerlendirilebilir.

Yağ dokuları arasında, visseral ve subkutan yağ dokularında metabolik farklılıklar bulunduğu için, farklı yağ padlerinde denervasyona bağlı lipid metabolizması araştırılabilir.

Çalışmamız sağlıklı ve herhangi bir diyet uygulanması yapılmayan deneklerde yapılmıştır. Metabolik homeostazisin bozulduğu bir çalışma ile, beyin-doku etkileşimleri incelenebilir.

CA inhibitörleri kullanılarak yağ dokusu metabolizması incelenebilir.

Gen ekspresyonlarının yanında ilgili enzimlerin western blot ile protein miktar tayini yapılabilir.

Özellikle mitokondriyal izoenzimlerin ekspresyon ve miktarları tayin edilirken denervasyonla mitokondri sayısı değişimi, uncoupling protein ekspresyonları ve protein miktarları tayin edilebilir.



6. KAYNAKLAR

1. Blaszkiewicz M, Willows JW, Johnson CP, Townsend KL (2019). The Importance of Peripheral Nerves in Adipose Tissue for the Regulation of Energy Balance. *Biology* 12: 8.
2. Bartness TJ, Liu Y, Shrestha YB, Ryu V (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front. Neuroendocrinol* 35: 473-493.
3. Harris RBS (2018). Denervation as a tool for testing sympathetic control of white adipose tissue. *Physiol Behav* 190: 3-10.
4. Queen A, Khan P, Azam A, Hassan MI (2018). Understanding the role and mechanism of carbonic anhydrase V in obesity and its therapeutic implications. *Curr Protein Pept Sci* 19(9): 909-923.
5. Frühbeck G (2008). Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders.* 456: 1-22.
6. Lee YH, Mottillo EP, Granneman JG (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta* 1842(3): 358-369.
7. Kershaw EE, Flier JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2548-2556.
8. Guilherme A (2017). Adipocyte lipid synthesis coupled to neuronal control of thermogenic programming. *Mol Metab* 6: 81–796.
9. Guilherme A, Henriques F, Bedard AH, Czech MP (2019). Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 15(4):
10. Wehrwein EA, Oler HS, Barman SM (2016). Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol* 6(3): 1239-1278.
11. Ryu V, Garretson JT, Liu Y, Vaughan CH, Bartness TJ (2015). Brown adipose tissue has sympathetic-sensory feedback circuits. *J Neurosci* 35(5): 2181-2190.
12. Garretson JT, Szymanski LA, Schwartz GJ, Xue B, Ryu V, Bartness TJ (2016). Lipolysis sensation by white fat afferent nerves triggers brown fat thermogenesis. *Mol Metab* 5(8): 626-634.
13. Zanos TP, Silverman HA, Levy T (2018). Identification of cytokine-specific sensory neural signals by decoding murine vagus nerve activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(21): E4843-E4852.

14. Reilly SM, Saltiel AR (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 13(11): 633-643.
15. Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X (2008). Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J* 22(7): 2452-2464.
16. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome [published correction appears in *Nat Med* 13(9): 1120
17. Migrenne S, Cruciani-Guglielmacci C, Kang L, Wang R, Rouch C (2006). Fatty Acid Signaling in the Hypothalamus and the Neural Control of Insulin Secretion. *Diabetes* 55: S139–S144.
18. Ruiz de Azua I, Mancini G, Srivastava RK (2017). Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *J Clin Invest* 127(11): 4148-4162.
19. Côté M, Matias I, Lemieux I (2007). Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes* 231(4): 692-699.
20. Di Marzo V, Côté M, Matias I (2009). Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia* 52(2): 213-217.
21. Wagner IV, Perwitz N, Drenckhan M, Lehnert H, Klein J (2011). Cannabinoid type 1 receptor mediates depot-specific effects on differentiation, inflammation and oxidative metabolism in inguinal and epididymal white adipocytes. *Nutr Diabetes* 1: e16.
22. O’Rahilly S (2017). GDF15 — from biomarker to allostatic hormone. *Cell Metab* 26: 807–808.
23. Strelau J, Schober A, Sullivan A, Schilling L, Unsicker K (2003). Growth/differentiation factor-15 (GDF-15), a novel member of the TGF-beta superfamily, promotes survival of lesioned mesencephalic dopaminergic neurons in vitro and in vivo and is induced in neurons following cortical lesioning. *J Neural Transm Supp* 65: 197–203.
24. Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I (2014). Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 516(7531): 395-399.
25. Dobson JGJ (1983). Mechanism of adenosine inhibition of catecholamine-induced responses in heart. *Circ Res* 52: 151–160.
26. Rongen GA, Lenders JW, Lambrou J (1996). Presynaptic inhibition of norepinephrine release from sympathetic nerve endings by endogenous adenosine. *Hypertension* 27(4): 933-938.

27. Pénicaud, L. and Lorsignol, A. (2013). Chatting between the brain and white adipose tissues. In: Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue. In: Bastard JP, Fève B. Physiology and physiopathology of adipose tissue. 171-181.
28. Bennett T, Burnstock G, Cobb JL, Malmfors T (1970). An ultrastructural and histochemical study of the short-term effects of 6-hydroxydopamine on adrenergic nerves in the domestic fowl. *Br J Pharmacol* 38:802–809.
29. Mazzucchelli MV, Confalonieri C, Schlechter P (1961). The nervous system and lipid metabolism of adipose tissue. 2. Influence of denervation on the lipogenetic activity of adrenocortical hormones. *Metabolism* 10: 330-4.
30. Harris RB (2012). Sympathetic denervation of one white fat depot changes norepinephrine content and turnover in intact white and brown fat depots. *Obesity* 20(7): 1355-1364.
31. Thureson-Klein A, Lagercrantz H, Barnard T (1976). Chemical sympathectomy of interscapular brown adipose tissue. *Acta Physiol Scand* 98: 8–18.
32. Finch L, Haeusler G, Thoenen H (1973). A comparison of the effects of chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine in newborn and adult rats. *Br J Pharmacol* 47: 249–260.
33. Demas GE, Bartness TJ (2001). Novel method for localized, functional sympathetic nervous system denervation of peripheral tissue using guanethidine. *J Neurosci Methods* 112: 21–28.
34. Mitchell JR, Oates JA (1970). Guanethidine and related agents. I. Mechanism of the selective blockade of adrenergic neurons and its antagonism by drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 172: 100–107.
35. Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Caramia F (1972). Structural and ultrastructural changes in developing sympathetic ganglia induced by guanethidine. *Brain Res* 43: 515–525.
36. Picklo MJ (1997). Methods of sympathetic degeneration and alteration. *J Auton Nerv Syst* 6: 111–125.
37. Evans BK, Heath JW, Burnstock G (1979). Reinnervation following guanethidine-induced sympathectomy of adult rats. *J Neurocytol* 8: 381–400.
38. Rooks C, Bennet T, Bartness TJ, Harris RB (2004). Compensation for an increase in body fat caused by donor transplants into mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R1149–1155.
39. Nascimento FP, Magnussen C, Yousefpour N, Ribeiro-da-Silva A (2015). Sympathetic fibre sprouting in the skin contributes to pain-related behaviour in spared nerve injury and cuff models of neuropathic pain. *Mol Pain* 11: 59.

40. Consigny PM, Davalian D, Donn R, Hu J, Rieser M, Stolarik D (2014). Chemical renal denervation in the rat. *Cardiovasc Intervent Radiol* 37: 218–223.
41. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531–543.
42. Cervero F, McRitchie HA (1982). Neonatal capsaicin does not affect unmyelinated efferent fibers of the autonomic nervous system: functional evidence. *Brain Res* 239: 283–288.
43. Shi H, Song CK, Giordano A, Cinti S, Bartness TJ (2005). Sensory or sympathetic white adipose tissue denervation differentially affects depot growth and cellularity. *Am J Physiol* 288: R1028–R1037.
44. Garofalo, MA, Kettelhut IC, Roselino JS, Migliorini RH (1996). Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *Journal of the Autonomic Nervous System* 60: 206–208.
45. Bowers RR, Festuccia WT, Song CK, Shi H, Migliorini RH, Bartness TJ (2004). Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(6): R1167–R1175.
46. Cousin B, Casteilla L, Lafontan M (1993). Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology* 133(5): 2255–2262.
47. Foster MT, Bartness TJ (2006). Sympathetic but not sensory denervation stimulates White adipocyte proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: 1630–1637.
48. Jones DD, Ramsay TG, Hausman GJ, Martin RJ (1992). Norepinephrine inhibits rat pre-adipocyte proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16(5): 349–354.
49. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 7: 168–81.
50. Del Prete S, Vullo D, Zoccola D (2017). Kinetic properties and affinities for sulfonamide inhibitors of an α -carbonic anhydrase (CruCA4) involved in coral biomineralization in the Mediterranean red coral *Corallium rubrum*. *Bioorg Med Chem* 25: 3525–30.
51. Del Prete S, Vullo D, Caminiti-Segonds N (2018). Protonography and anion inhibition profile of the α -carbonic anhydrase (CruCA4) identified in the Mediterranean red coral *Corallium rubrum*. *Bioorg Chem* 76: 281–7.
52. Nocentini A, Supuran CT, Capasso C. (2021). An overview on the recently discovered ι -carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem* 36(1):1988- 1995.

53. Thiry A, Supuran CT, Masereel B, Dogné JM (2008). Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs. *J Med Chem* 51(11): 3051-3056.
54. So AK, Espie GS, Williams EB, Shively JM, Heinhorst S, Cannon GC (2004). A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. *J Bacteriol* 186(3):623-630.
55. De Simone G, Supuran CT (2009). Drug design of antiobesity carbonic anhydrase inhibitors. *Drug design of Zinc-Enzyme inhibitors*. 1st ed. New Jersey: Wiley, 39-72.
56. Supuran CT (2021). Emerging role of carbonic anhydrase inhibitors. *Clin Sci* 135(10): 1233-1249.
57. Chegwiddden WR, Carter ND (2021). *The Carbonic Anhydrases: Current and Emerging Therapeutic Targets*. Progress in Drug Research. 1st edition, Switzerland: Springer.
58. Sly WS, Hu PY (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem* 64: 375–401.
59. Lee HS, Shin HS, Kang UB (2015). Multiple biomarker set for breast cancer diagnosis, method of detecting the same, and diagnosis kit for breast cancer using antibody against the same. Patent no: US20150024960.
60. Wang DB, Lu XK, Zhang X (2016). Carbonic anhydrase 1 is a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 37(1): 553–9.
61. Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y (2012). Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol* 2012: 768190.
62. Kardoush MI, Ward BJ, Ndao M (2017). Serum Carbonic Anhydrase 1 is a Biomarker for Diagnosis of Human *Schistosoma mansoni* Infection. *Am J Trop Med Hyg* 96(4): 842–849.
63. Granier C, Molina F, Salvétat N (2016). Early prediction markers of diabetic nephropathy. Patent no: EP2963422.
64. Cloufent-Sanchez G, Deramchia K, Jacobin AJ (2013). Antibodies for molecular imaging of vulnerable plaques in atherosclerosis. Patent no: WO2011IB03011.
65. Parkkila S, Lasota J, Fletcher JA (2010). Carbonic anhydrase II. A novel biomarker for gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 23(5): 743–50.
66. Jang BG, Yun SM, Ahn K, Song JH, Jo SA, Kim YY, Kim DK, Park MH, Han C, Koh YH (2010). Plasma carbonic anhydrase II protein is elevated in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 21(3): 939-45.

67. Provensi G, Carta F, Nocentini A, Supuran CT, Casamenti F, Passani MB, Fossati S (2019). A New Kid on the Block? Carbonic Anhydrases as Possible New Targets in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 20(19): 4724.
68. Heming N, Urien S, Faisy C (2012). Acetazolamide: a second wind for a respiratory stimulant in the intensive care unit? *Crit Care* 16(4): 318.
69. Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R (2013). Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 23(6): 717-24.
70. Hudalla H, Michael Z, Christodoulou N, Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Filatava EJ, Dieffenbach P, Fredenburgh LE, Stearman RS, Geraci MW, Kourembanas S, Christou H (2019). Carbonic Anhydrase Inhibition Ameliorates Inflammation and Experimental Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 61(4): 512-524.
71. Thurtell MJ, Wall M (2013). Idiopathic intracranial hypertension (pseudotumor cerebri): recognition, treatment, and ongoing management. *Curr Treat Options Neurol* 15(1): 1- 12.
72. Kharbanda KK, Vigneswara V, McVicker BL (2019). Proteomics reveal a concerted upregulation of methionine metabolic pathway enzymes, and downregulation of carbonic anhydrase-III, in betaine supplemented ethanol-fed rats. *Biochem Biophys Res Commun* 381(4): 523–7.
73. Carter WG, Vigneswara V, Newlaczyl A (2015). Isoaspartate, carbamoyl phosphate synthase-1, and carbonic anhydrase-III as biomarkers of liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 458(3): 626–31.
74. Nam SU, Noh JH, Kim BJ (2013). A Marker for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. Patent no: KR2013141044.
75. Nishimori I, Miyaji E, Morimoto K (2005). Serum antibodies to carbonic anhydrase IV in patients with autoimmune pancreatitis. *Gut* 54(2): 274–81.
76. Van Karnebeek CD, Sly WS, Ross CJ (2014). Mitochondrial carbonic anhydrase VA deficiency resulting from CA5A alterations presents with hyperammonemia in early childhood. *Am J Hum Genet* 94(3): 453–61.
77. Parkkila S, Parkkila AK, Vierjoki T (1993). Competitive time-resolved immunofluorometric assay for quantifying carbonic anhydrase VI in saliva. *Clin Chem* 39(10): 2154.
78. Borghi GN, Rodrigues LP, Lopes LM (2017). Relationship among alpha amylase and carbonic anhydrase VI in saliva, visible biofilm, and early childhood caries: a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 27(3): 174–182.
79. Zaidel L, Miller S, Carpentier G (2013). Diagnostic methods. Patent no: WO2013095367.

80. Beckman KA, Luchs J, Milner MS (2016). Making the diagnosis of Sjogren's syndrome inpatients with dry eye. *Clin Ophthalmol* 10: 43–53.
81. Ambrus JL, Shen JL. Method of diagnosing Sjogren's disease. Patent no: EP20110735215 2011.
82. Chu C-M, Chang Y Genetic marker for detecting colorectal cancer and method using the same. TW20130113645 2013.
83. Ilies MA, Vullo D, Pastorek J (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of tumor-associated isozyme IX by halogenosulfanilamide and halogenophenylaminobenzolamide derivatives. *Journal of medicinal chemistry* 46(11): 2187–96.
84. Kanfar N, Tanc M, Dumy P (2017). Effective Access to Multivalent Inhibitors of Carbonic Anhydrases Promoted by Peptide Bioconjugation. *Chemistry* 23(28): 6788–6794.
85. Lomelino C, McKenna R (2016). Carbonic anhydrase inhibitors: a review on the progress of patent literature (2011–2016). *Expert Opin Ther Pat* 26(8): 947–56.
86. Supuran CT, Winum JY (2015). Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update. *Future Med Chem* 7(11): 1407–14.
87. Nocentini A, Supuran CT (2018). Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008–2018). *Expert Opin Ther Pat* 9: 1–12.
88. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J (2014). Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcell Biochem* 75: 199–219.
89. Yang X, Minn I, Rowe SP (2015). Imaging of carbonic anhydrase IX with an ¹¹¹In-labeled dualmotif inhibitor. *Oncotarget* 6(32): 33733–42.
90. Groves K, Bao B, Zhang J (2012). Synthesis and evaluation of near-infrared fluorescent sulfonamide derivatives for imaging of hypoxia-induced carbonic anhydrase IX expression in tumors. *Bioorg Med Chem Lett* ;22(1): 653–7.
91. Krall N, Pretto F, Mattarella M (2016). A ^{99m}Tc-Labeled Ligand of Carbonic Anhydrase IX Selectively Targets Renal Cell Carcinoma In Vivo. *J Nucl Med* 57(6): 943–9.
92. Minn I, Koo SM, Lee HS, et al (2016). [⁶⁴Cu]XYIMSR-06: A dual-motif CAIX ligand for PET imaging of clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 7(35): 56471–56479.
93. Ondriskova E, Debreova M, Pastorekova S (2015). Tumor-Associated Carbonic Anhydrases IX and XII 2015 In: *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts - From Theory to Medical and Industrial Applications*. Amsterdam: Elsevier pp. 169–205.

94. Moon YR, Ji GY (2016). Antibody binding to carbonic anhydrase and use thereof. US201615344764.
95. Watson PH, Chia SK, Wykoff CC (2003). Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *British Journal Of Cancer* 88: 1065.
96. Scozzafava A, Supuran CT (2014). Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. *Subcell Biochem* 75: 349–59.
97. Mincione F, Scozzafava A, Supuran CT (2007). The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as anti-glaucoma agents. *Curr Top Med Chem* 7(9): 849–854.
98. Pertovaara M, Booterabi F, Kuuslahti M, et al. (2011). Novel carbonic anhydrase autoantibodies and renal manifestations in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology* 50(8): 1453–7.
99. Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H (2012). Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1918–23.
100. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2: 6(269).
101. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* (5): 401–4.
102. Ghorai S., Pulyab, S., Ghosha, S., Pandac, P (2020) Balaram Ghoshb, Shovanlal Gayen. Structure-activity relationship of human carbonic anhydrase-II inhibitors: Detailed insight for future development as anti-glaucoma agents. *Bioorganic Chemistry* 95: 103557.
103. Valle M (2017). Pyruvate Carboxylase, Structure and Function. In *Macromolecular Protein Complexes*. Editors: Harris, J.R. and Marles-Wright, J. Switzerland: Springer.
104. Lynch CJ, Fox H, Hazen SA, Stanley BA, Dodgson S, Lanoue KF (1995). Role of hepatic carbonic anhydrase in de novo lipogenesis. *Biochem J* 310 :197-202.
105. Hazen SA, Rowe WA, Lynch CJ (1995). Monolayer cell culture of freshly isolated adipocytes using extracellular basement membrane components. *J Lipid Res* 36(4): 868-75.
106. Shah GN, Rubbelke TS, Hendin J (2005). Targeted mutagenesis of mitochondrial carbonic anhydrases VA and VB implicates both enzymes in ammonia detoxification and glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(18): 7423-7428.
107. Bartness TJ, Kay Song C, Shi H, Bowers RR, Foster MT (2005). Brain-adipose tissue cross talk. *Proc Nutr Soc* 64(1): 53-64.

108. Diculescu I, Stoica M (1970). Fluorescence histochemical investigation on the adrenergic innervation of the white adipose tissue in the rat. *J Neurovisc Relat* 32: 25–36.
109. Rebuffe-Scrive M (1991). Neuroregulation of adipose tissue: molecular and hormonal mechanisms. *Int J Obesity* 15: 83–86.
110. Slavin BG, Ballard KW (1978). Morphological studies on the adrenergic innervation of white adipose tissue. *Anat Rec* 191: 377–389.
111. Wirsén C (1964). Adrenergic innervation of adipose tissue examined by fluorescence microscopy. *Nature* 202: 913.
112. Giordano A, Frontini A, Murano I, Tonello C, Marino MA, Carruba MO, Nisoli E, Cinti S (2005). Regional-dependent increase of sympathetic innervation in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *J Histochem Cytochem* 53: 679–687.
113. Giordano A, Song CK, Bowers RR, Ehlen JC, Frontini A, Cinti S, Bartness TJ (2006). White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol* 291: R1243–R1255.
114. Qi Zhu, Bradley J. Glazier, Benjamin C. Hinkel, Jingyi Cao, Lin Liu, Chun Liang and Haifei Shi (2019). Neuroendocrine Regulation of Energy Metabolism Involving Different Types of Adipose Tissues. *Int J Mol Sci* 20(11): 2707
115. Matias I, Gonthier MP, Orlando P (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91(8): 3171–3180.
116. Cignarelli A, Genchi VA, Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F (2019). Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int J Mol Sci* 20(3): 759.
117. Vaughan CH, Zarebidaki E, Ehlen JC, Bartness TJ (2014). Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Methods Enzymol* 537: 199–225.
118. Nishimori I, Vullo D, Innocenti A, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. The mitochondrial isozyme VB as a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J Med Chem* 48(24): 7860–7866.
119. Díez-Fernández C, Rüfenacht V, Santra S (2016). Defective hepatic bicarbonate production due to carbonic anhydrase VA deficiency leads to early-onset life-threatening metabolic crisis. *Genet Med* 18(10): 991–100
120. Tamura Y, Kitaoka Y, Matsunaga Y, Hoshino D, Hatta H (2015). Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle. *The Journal of physiology* 593(12): 2707–2720.

121. Berthoud HR, Fox EA, Neuhuber WL (2006). Vagaries of adipose tissue innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(5): R1240-R1242.
122. Giordano A, Song CK, Bowers RR (2006). White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(5): R1243-R1255.
123. Kreier F, Buijs RM (2007). Evidence for parasympathetic innervation of white adipose tissue, clearing up some vagaries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(1): R548-R554.
124. Brower M, Grace M, Kotz CM, Koya V (2015). Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Lab Anim Res* 31(4):166-173.
125. Selvi Y (2019). Denervasyona Bağlı Retroperitoneal Yağ Dokusundaki total karbonik anhidraz aktivite değişikliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
126. Kahraman C, Rendi TA, Sağlam N (2022). Reciprocal Effects of Adipose Tissue Denervation and High Fat Diet on Serum Metabolic Parameters and Adipokine Levels in Rats: A Long Term Study. *J Evol Biochem Phys* 58: 410–417.
127. Marques-Oliveira GH, Silva TM, Valadares HMS (2019). Identification of Suitable Reference Genes for Quantitative Gene Expression Analysis in Innervated and Denervated Adipose Tissue from Cafeteria Diet-Fed Rats. *Lipids* 54(4): 231-244.
128. Günel T (2007). Quantitative Analysis Of Gene Expression “Real-Time PCR”: Scientific Letter. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 27: 763-767